

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670878

研究課題名(和文) 時間医学を考慮した小児歯科治療-夜間の処置は歯髄炎を誘発するか

研究課題名(英文) Pediatric dentistry and Chronomedicine

研究代表者

西出 真也(Nishide, Shinya)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40451398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生理機能にみられる概日リズムは、自律振動する全身の細胞リズムが統合され形成される。個々の細胞リズムは時計遺伝子群の周期的な転写、翻訳、翻訳後修飾から構成される負のフィードバックにより生じる。中でも転写因子CLOCK-BMAL1二量体は標的分子の転写量を約24時間周期で制御し、リズム発振に中心的な役割を果たす。

本研究ではCLOCKおよびBMAL1の蛍光タンパク質融合タンパク質を作製し、生きた細胞内における局在を可視化した。CLOCKの多くは核に局在したが、一部の分画は細胞質に局在した。細胞内小器官マーカーを用いた検証の結果、細胞質に局在するCLOCKは小胞体に集積することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms are crucial factors in the regulation of a wide range of physiological processes. The systemic circadian system can be broken down into cellular rhythms, which are maintained by periodic changes in the status of a set of clock genes and proteins. Such proteins oscillate not only at the levels of their expression but also at those of posttranslational modification. In this study, I have constructed fluorescent biosensors for clock proteins, CLOCK, and BMAL1, and observed their subcellular localization and interaction in living cells. CLOCK localized in the cytosol as well as the nucleus, and cytosolic CLOCK accumulated in the endoplasmic reticulum (ER). Deletion of N- or C-terminus of CLOCK changed its subcellular distribution and colocalization with the ER marker in a deleted region-dependent manner.

研究分野：小児歯科学、生理学

キーワード：炎症反応 概日リズム 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年社会の24時間化が進み、コンビニエンスストアや飲食店等を昼夜を問わず利用できるようになった。これにより我々の生活は便利になったが、一方で睡眠障害等のリズム障害の増加という弊害をもたらしている。歯科医院の夜間診療も増加しており、小児であっても夜間に受診することは珍しくない。申請者のこれまでの研究により、夕食・就寝時刻が遅い子は歯蝕発生リスクが高いことが示されており、夜型の生活習慣が口腔の健康・発育に及ぼす影響が懸念される。

多くの生理機能には24時間周期の生体リズム(概日リズム)が観察され、その中枢は視床下部に存在する。しかし細胞にリズムを作る時計遺伝子の振動は全身の組織においても観察され(Nishide, *Am J Physiol*, 2013, in press; Nishide, *Genes Cells*, 2006)、例えば一日のうち午後に最大になる唾液分泌量など、必要な時刻にその機能が発揮されるよう制御していると考えられる。

近年、単球やマクロファージ、好中球等の炎症細胞の活性が時計遺伝子により制御されること(Nguyen, *Science*, 2013; Lam, *Nature*, 2013; Casanova-Acebes, *Cell*, 2013)、夜行性動物であるマウスのサルモネラ菌に対する炎症反応は休息期である昼間(昼行性動物では夜間に相当)に大きいこと(Bellet, *PNAS*, 2013)、など炎症反応に時刻依存性があることが相次いで報告された。

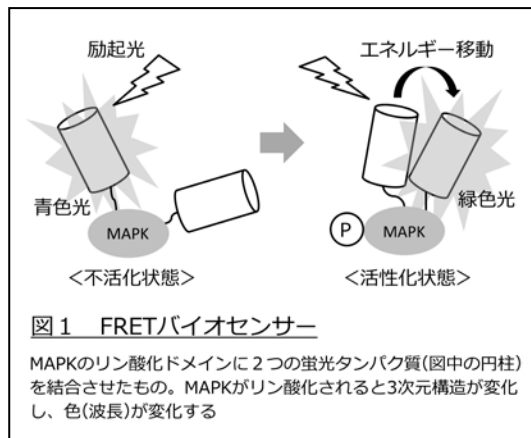
2. 研究の目的

上記の知見から歯髄炎にも一日のうち罹患・進行しやすい時間帯があると考えられる。生活歯髄切断や覆髄、充填後に歯髄炎を発症すると根管治療が必要になるが、昼行性であるヒトでは炎症反応は夜間に強いことが予想され、歯科治療はできるだけ昼間に行うべきではないかと申請者は考えた。本研究は夜間の歯科診療が生活の夜型化を招くのみならず、歯髄組織に直接的な為害作用をもたらす可能性を検討するために行った。

3. 研究の方法

まず生きた細胞の概日リズムを可視化するバイオセンサーを作製した。核内でヘテロ二量体形成し転写因子として働く時計遺伝子 **Bmal1** および **Clock** にそれぞれ蛍光タンパク質 **Venus** および **SECFP** を融合させたバイオセンサーを作製した。このバイオセンサーにより生きた細胞内における局在を可視化でき、異なる2種の蛍光タンパク質が近接した際に起こるエネルギー移動、FRET

(Förster resonance energy transfer、図1)を利用して **Bmal1** と **Clock** の二量体形成のタイミングを解析した。



時計遺伝子 **Rev-erb α** 発現を蛍光タンパク質でモニターするバイオセンサー(University of Geneva, Prof. U. Schibler より供与)を用いて細胞の概日リズムを確認した。**Rev-erb α** は生体内で昼に発現が上昇する遺伝子であるため、このセンサーは細胞内の時刻情報を得る「時計の針」として利用することができる。

MAPKファミリー分子である **ERK1**, **JNK1** の活性化ドメイン配列を改良型FRETシステム(京都大学・松田道行先生より供与)に組替えたバイオセンサーを作製した。このセンサーによりMAPK活性を高感度で検出できる

次に細胞の炎症反応にリズムがあることを証明するため、作製したMAPKバイオセンサーをマウス線維芽細胞に電気穿孔法にて導入した。細胞を通常法に従いデキサメタゾンによりリズム同調させ、炎症刺激を模倣した刺激を時刻を変えて行った。

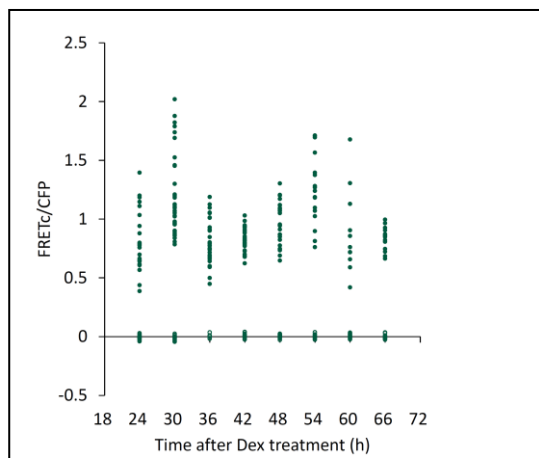
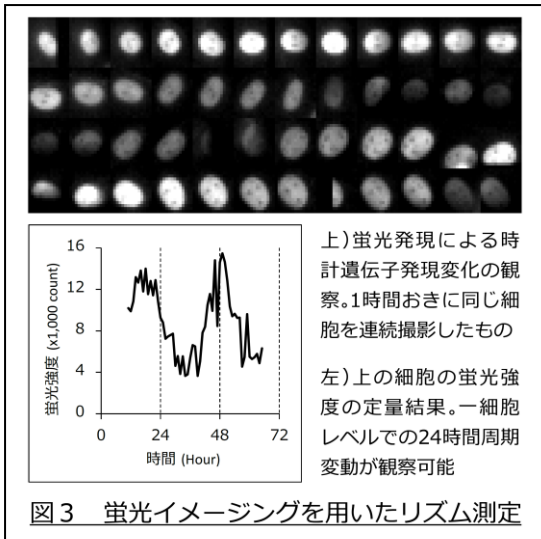


図2 Bmal1-Clock二量体形成のリズム

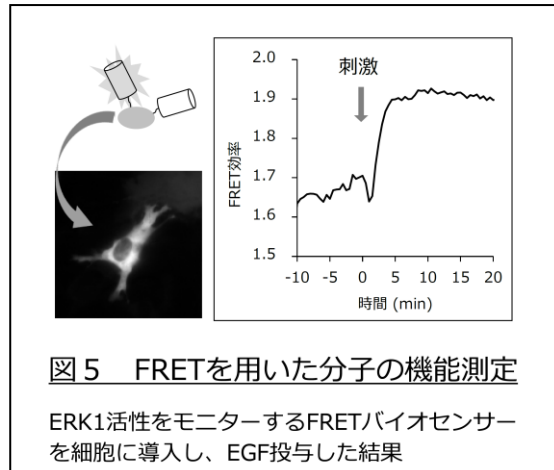
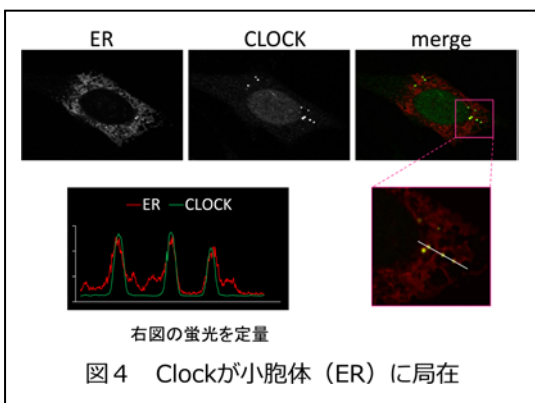
横軸はデキサメタゾン刺激からの時間を表す。約24時間周期のFRET効率上昇が観察された



4. 研究成果

BMAL1 および CLOCK に蛍光タンパク質を結合したバイオセンサー Venus-BMAL1、SECFP-CLOCK を細胞に発現させた結果、BMAL1 と CLOCK の核内における二量体形成には時刻依存性があり、転写活性が抑制される時間帯にピークをもつ概日リズムを示した (図2)。また時計遺伝子 Rev-erba のバイオセンサーによっても細胞のリズムを確認した (図3)。

BMAL1 および CLOCK の局在解析の結果、両タンパク質ともに核に多く集積していたが、CLOCK は細胞質にも存在し顆粒状の構造を示した。BMAL1、CLOCK は細胞内において核以外に局在をもつことが知られていなかったため、様々な細胞内小器官の蛍光マーカーを用いた解析を行ったところ、CLOCK は小胞体 (ER) に局在することが明らかとなった (図4)。CLOCK の顆粒形成は概日リズムを示し、そのピークは BMAL1-CLOCK 二量体形成のピークと一致した。以上の結果より時計タンパク質 CLOCK は細胞内において時刻依存的に小胞体に局在し、BMAL1 は CLOCK 依存的に小胞体に輸送されることが明らかとなった。CLOCK が細胞内局在を変化させることで



リズム形成に関与している可能性、あるいは周期的に変化する未知の分子により細胞内を輸送されている可能性が考えられる。

MAPK バイオセンサーを導入した細胞に EGF 刺激を行ったところ直後に FRET 効率が上昇した (図5)。FRET 効率の上昇は MAPK の活性化 (リン酸化) を反映している。MAPK の反応性は同調刺激から 36 時間後に上昇する概日リズムを示した (図6)。上記の時刻は先行研究における炎症反応が大きい時間帯と矛盾がなく、様々な条件下における炎症応答を調べるためのモデル実験系を確立できた。現在様々な物質に対する炎症応答を解析している。今後時計遺伝子センサーと同時に導入した細胞を用いて炎症反応後の概日リズム変化も解析する予定である。

過去に申請者は、小児のリズムは外的刺激に対して攪乱されやすいことを示した (Nishide, Eur J Neurosci, 2008)。炎症の時刻依存性を考慮し、処置のタイミングや内容を決定することは小児歯科診療において特に意義がある。

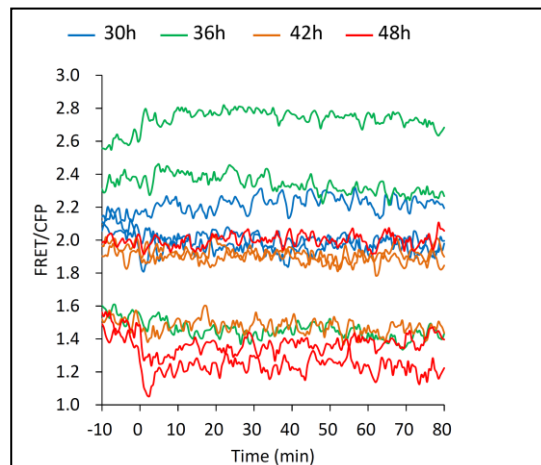


図6 MAPK反応の時刻依存性

横軸はEGF刺激からの時間を表す。デキサメタゾン投与36時間後にEGF投与するとMAPK活性が上昇するが、48時間後の投与では活性が減少する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計7件)

1. Nishide S. Fluorescence bioimaging of intracellular dynamics of the clock proteins. 第58回歯科基礎医学会学術大会 8月25～26日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)、2016.
2. 西出真也. ライブセルイメージングの口腔疾患予防への応用. 第58回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム「若手の口腔生理学研究最前線」 8月24日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)、2016. (招待講演)
3. 西出真也、藤岡容一郎、堀内浩水、堀口美香、佐藤絢、ネパール プラバ、王婧、南保明日香、大場雄介. 蛍光バイオセンサーを用いた時計タンパク質BMAL1-CLOCKの細胞内動態の解析. 第68回日本細胞生物学会大会 6月15～17日 京都テルサ (京都府・京都市)、2016.
4. Nishide S, Fujioka Y, Nanbo A, Ohba Y. Subcellular localization of the clock proteins, BMAL1 and CLOCK. 第93回日本生理学会大会 3月22～24日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)、2016.
5. Nishide S. Circadian profiling of a dimerization of BMAL1 and CLOCK and their subcellular localization by FRET biosensor. 第57回歯科基礎医学会学術大会 9月11～13日 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)、2015.
6. 西出真也、藤岡容一郎、南保明日香、大場雄介. 蛍光イメージングを用いた時計タンパク質の細胞内局在解析. 第95回北海道医学大会生理系分科会 9月5日 旭川医科大学 (北海道・旭川市)、2015.
7. Nishide S, Fujioka Y, Nanbo A, Ohba Y. Circadian profiling of an interaction between BMAL1 and CLOCK by FRET bioimaging. 第92回日本生理学会大会 3月21～23日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)、2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西出 真也 (NISHIDE, Shin-ya)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40451398