

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860163

研究課題名(和文)哺乳類の概日活動リズム制御機構における新規松果体液性因子の探索

研究課題名(英文)Search of the novel pineal humoral factor in a mammalian circadian system

研究代表者

池上 啓介 (IKEGAMI, Keisuke)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：10709330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：松果体はメラトニン以外の液性因子も合成分泌するにもかかわらず、それらの生理機能はほとんど明らかになっていない。メラトニン産生CBA/Nマウスとメラトニン欠損C57BL/6マウスを用いて、松果体除去が概日リズムに及ぼす影響を解析したところ、松果体除去は時差ぼけの回復を加速し、光刺激に対する時計中枢であるSCN の感受性を増加させることが分かった。この変化を生じた物質を探索すると、松果体によって分泌されるメラトニン前駆体セロトニンが脳髄液を介してSCNに作用し、光に対する感受性を抑制していることを発見した。メラトニン以外の松果体液性因子における生理機能の解明は初めてである。

研究成果の概要(英文)：The functions of humoral factors except melatonin in the pineal body on the light entrainment of the circadian rhythm have not been fully investigated. In melatonin-proficient CBA/N or melatonin-deficient C57BL/6 mice, pinealectomy induced faster resetting for jet-lag. Administration of melatonin to the pinealectomized CBA/N mice did not modify the recovery from the jet lag. 5-HT showed apparent effects on the light resetting process. 5-HT delayed the resetting of locomotor activity rhythm after an abrupt shift of LD cycle, and attenuated the pinealectomy-enhanced phase shift of the circadian locomotor activity as well as c-Fos induction in the SCN after a light pulse during the night. In contrast, 5-HT synthesis inhibitor generated increase of the phase shift as well as increase in c-Fos induction by light. The findings suggest that pineal 5-HT suppresses light entrainment by attenuating the light signal transduction to the central circadian clock in the SCN.

研究分野：動物生理学

キーワード：松果体 視交叉上核 概日時計 メラトニン

1. 研究開始当初の背景

松果体は、脳にある内分泌器官であり主にメラトニンを分泌合成している。メラトニンは日周リズムを持っており、発生起源をたどれば頭頂眼である。鳥の松果体は時計機能を有しており、概日ペースメーカーであるが、哺乳動物では時計機能は消失し、視床下部の視交叉上核 (SCN) が唯一の概日ペースメーカーである。松果体から分泌されるホルモンで代表的な液性因子がメラトニンである。松果体はメラトニンの他にセロトニンやヒスタミン、ノルアドレナリンなど様々な物質を合成分泌している内分泌器官である。しかし、メラトニン以外の多くの液性因子の機能はほとんどわかっていない。申請者は予備的実験でメラトニン以外の松果体分泌因子がマウスの概日活動リズムおよび光による自発的行動の抑制に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

これまで、松果体除去・メラトニン受容体変異マウスとメラトニン投与による情動・不安行動に及ぼす矛盾が指摘されてきた (Weil et al., Brain Res Bull 2006)。また、メラトニン欠損マウス (C57BL/6) における日照時間や明暗周期を変化させるとうつ様行動を示すことが報告された (LeGates et al., Nature 2012; Otsuka et al., PLoS One 2012)。さらに、メラトニン欠損 BALB/c マウスでは松果体除去により寿命が延びることが知られており、メラトニン以外の松果体因子の生理学的な効果が示唆された。松果体除去は活動リズムの同調に必要な光受容器が発現している網膜神経節細胞 (RGC) から視交叉上核への神経投射に影響を与え、SCN の発火を抑制するが、同様に RGC の投射を受け行動などに影響を与える外側膝状体 (IGL) の発火には影響を与えないことが知られており、SCN に影響を与えることが示唆された (Gonzalez and Dyball, J Neuroendocrinol 2006)。マウスを用いた先行研究で、恒明条件下では SCN の個々の神経細胞の概日リズムは維持されるが、神経細胞間の脱同調の割合が増加することで活動リズムが無周期になることが示された (Ohta et al., Nat Neurosci 2005)。申請者の予備実験で、松果体除去したメラトニン産生マウス (CBA/N) が恒明条件下で 100% 無周期になり、3.5 : 3.5 時間短周期明暗条件 (T7) の条件下でも概日性活動リズムが消失することを明らかにした。また、T7 で暗期での活動量が顕著に上昇していたので、光感受性が変化している可能性が示唆された。1 時間光照射による自発的行動の抑制 (マスキング) も松果体除去で増加し光感受性が上昇した。

2. 研究の目的

本研究では、概日時計や光感受性に及ぼす新たな松果体液性因子を探索し、松果体の新た

な生理機能の発見と臨床応用に展開するための基礎となる研究を行った。おもに下記の 2 つを目的に実施した。

(1) 松果体除去による光感受性への影響を明らかにする。

(2) 松果体除去による SCN における概日リズムの影響を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究はまず松果体除去による概日活動リズムの消失が、SCN と関与することを明らかにするため、明暗(12 時間明期 12 時間暗期)環境を 6 時間ずつ前後させる時差ぼけ実験を実施し再同調までの行動位相の変化を解析した。また光情報は網膜で受け取ると同時に、時計中枢である SCN に伝達されるので、網膜および SCN 両方における光感受性を神経活性化マーカー *c-Fos* 遺伝子や光誘導性の時計遺伝子 *Per1* 発現、および行動テストによるマスキング試験で検証した。これらの実験はメラトニン産生 CBA/N マウスとメラトニン欠損 C57BL/6 マウスおよび網膜変性 CBA/J マウスを用いてメラトニンの関与も解析した。また、免疫組織化学や *in situ* hybridization 法を用いてその詳細を明らかにし、薬理的に回復効果を検証した。

4. 研究成果

松果体除去すると恒明条件下でより低い照度で概日性活動リズムが無周期になることを明らかにした。このことは光に対する感受性が上昇していることを示唆した。3.5 : 3.5 時間短周期明暗条件 (T7) の条件下でも活動リズムが消失することは予備実験の段階で分かっていたが、松果体除去マウスの SCN スライス培養における *Per2::luc* の発光リズムを解析すると SCN の時計も消失しており、光により時計がリセットされる網膜の概日時計においてもリズムを失っていた。しかし、12 時間明期 12 時間暗期の飼育下では除去による影響は、リズムの周期や振幅ともに見られなかった。このことは、SCN スライスそのものが、切り出しにより松果体除去の条件に近くなっているためと考えられる。

これらの実験から、松果体除去マウスは SCN の網膜からの光刺激に対する感受性が上昇しているか、網膜における光感受性そのものが上昇している可能性が示唆された。そこでまず、メラトニン産生 CBA/N マウスとメラトニン欠損 C57BL/6 マウスを用いて、松果体除去が概日リズムに及ぼす影響を解析したところ、松果体除去は明暗環境を 6 時間前後させる時差ぼけ実験において再同調を加速させ (図 1) 光刺激に対する行動リズムの位相反応 (図 2) やマスキング実験では時計中枢である SCN および光受容器官である

網膜における感受性を増加させることが分かった。この結果は、松果体が網膜の光感受性と SCN における感受性両方を抑制する働きを持っていることを示唆している。そこで、次にそれぞれ同じ因子によるものなのか異なる因子による効果であるかを検証した。

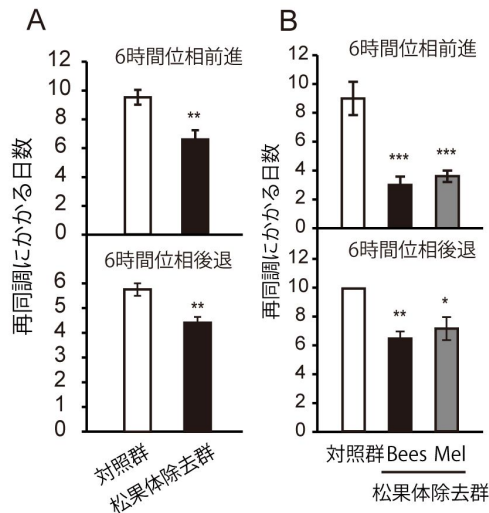


図1 松果体除去による時差ぼけへの影響

まず、SCN への感受性を抑制する効果がある松果体因子を明らかにするため、松果体より分泌されるメラトニンおよびその前駆体であるセロトニン (5HT) を松果体除去マウスに投与して検討を行った。5HT は縫線核から分泌され、気分にも影響を与えるが、SCN に作用して網膜からのグルタミン酸や PACAP の刺激を抑制する働きがあることが知られている。これまでの知見で、メラトニンは jet-lag に影響に対して矛盾した報告がされていたが、メラトニン投与や埋込は Jet-lag への再同調速度に影響を与えなかった。この結果と、メラトニン欠損マウス (C67BL/6J) でも松果体除去により時差ボケが早く回復したことから、メラトニン以外の液性因子が関与していることが判明した。そこで、長年、脳髄液に分泌されるもののその生理機能が分かっていなかった松果体 5HT に着目した。5HT 受容体は SCN にも強く発現していることが知られているが、松果体除去マウスに 5HT を jet-lag 時に連続投与すると明暗周期シフト後、再同調に要する期間が延長した。このことはメラトニン欠損マウスでも確認された。さらに、光刺激による活動リズムの位相変位量や SCN における光誘導性 *c-Fos* および *Per2* 遺伝子の発現誘導も 5HT 投与により低下し、5HT 合成阻害剤により増加した。これらの結果は、松果体セロトニンが脳髄液を介して SCN に作用し、網膜からの光情報の入力を防ぎ、個体における光位相反応を抑制していることを示唆している。実際、脳髄液中の 5HT は除去により 40%ほどに低下する。メラトニン以外の松果体液性因子における

生理機能の解明は初めてであり、気分を与える影響が非常に重要であることが知られているセロトニンが作用している事実は、松果体の気分を与える影響を考えるうえで重要になってくる。また脳内では縫線核のセロトニンの機能しか分かっていなかったが、本研究により松果体セロトニンとの使い分けも重要になる。今後は松果体特異的にセロトニン合成を抑制する変異マウスを作出し解析することが重要となる。

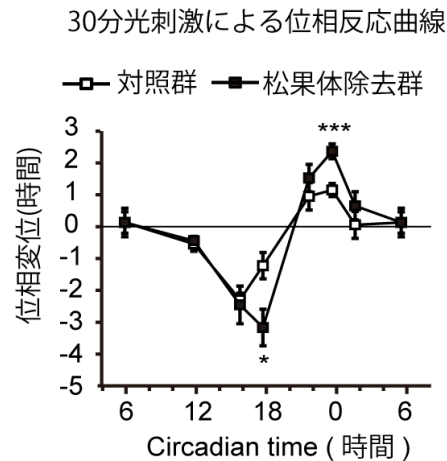


図2 松果体除去による光位相反応への影響

次に網膜の光感受性に対する松果体の影響を検証した。当初、光感受性にはメラトニンはあまり関与しないと考えて研究を実施してきた。しかし、マスキングや短周期明暗条件 T7 など様々な光反応試験を行ったところ SCN への光入力ではセロトニンが関与していることが分かったが、網膜の光感受性にはメラトニンが関与している可能性を発見した。マスキングはメラトニン産生マウスにおける松果体除去では顕著にみられたが、メラトニン欠損マウスでは松果体除去によるマスキングへの影響なかった。メラトニンは網膜でも産生されるが、これらの実験から松果体のメラトニンがマスキングにおける光感受性を抑制していることを示唆した。さらに、メラトニン産生網膜変性マウスや網膜が変性した老齢マウス (メラトニン産生) におきてもマスキングが増幅したことから網膜内顆粒層または神経節細胞層に松果体メラトニンが作用していることが示唆された。実際免疫組織化学解析により、メラトニン受容体が網膜神経節細胞に発現していることを明らかにした。薬理的に松果体除去マウスへのメラトニン投与によりレスキューもされた。松果体除去は光受容体の発現を有意に抑制させることも判明し、メラトニン投与により発現が回復したことから、網膜における光受容体の発現に影響を及ぼすことで網膜における光感受性を制御していることが示唆された。これらの結果はメラトニンと新規

液性因子との相互作用や使い分けなどの可能性も示唆されたので、現在解析中である。

これらの結果から、松果体除去マウスは T7 環境下で行動リズムが無周期になるがこれは網膜および SCN における光感受性が増加したことにより、SCN におけるリズムが不安定化したことが原因と考えられる。事実、時計遺伝子 *Per2* のプロモーターにルシフェラーゼを導入したマウス (Per2:luc マウス) を用いて、光情報を受容する網膜神経節細胞 (RGC) の一次投射領域である SCN のスライス培養を実施したところ、SCN 単独では周期や振幅には松果体除去による影響は確認できなかったものの、松果体と共に共培養するとリズムの減衰が抑制される傾向がみられた。これらは、松果体が光感受性や体内時計の安定性に影響を及ぼすことを示唆し「概日時計の維持と光感受性の制御」という新しい松果体の機能の一端を解明できた。

近畿大学医学部 助教

研究者番号：10709330

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Keisuke Ikegami, Mitsugu Sujino, Mamoru Nagano, Yasufumi Shigeyoshi. Pineal serotonin modulates photic entrainment of the circadian center. SRBR meeting 2016, Florida, USA, 2016 年 5 月 22 日

Keisuke Ikegami, Mitsugu Sujino, Mamoru Nagano, Yasufumi Shigeyoshi. Functional analysis of pineal serotonin in mice. The 64th NIBB Conference Evolution of Seasonal Timers Okazaki Conference Center (Okazaki), Aichi, Japan, 2016 年 4 月 22 日

池上啓介、重吉康史 マウスにおける松果体セロトニンの生理機能解析 第 22 回日本時間生物学会、伊藤国際学術研究センター(東京)、2015 年 11 月 21 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 啓介 (IKEGAMI, Keisuke)