

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861780

研究課題名(和文) 社会的適応困難の要因となる生体リズム内の脱同調機構の解明

研究課題名(英文) Internal de-synchronization among multiple circadian oscillators.

研究代表者

高須 奈々 (Takasu, Nana)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・特別研究員(RPD)

研究者番号：30467394

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)：視床下部視交叉上核は体内時計の中枢であり、外部環境からの時間情報がない状態でも生体内で時を刻み概日リズムは継続する。視交叉上核以外にも脳内には概日リズムを刻む神経核が見出されており、弓状核はその一つである。特殊な環境条件、例えば摂食タイミングを制限する環境下では、一部の生理機能リズムが視交叉上核リズムから乖離することが知られており、生体リズムの内的脱同調と呼ばれる。本研究では、視交叉上核と弓状核における遺伝子発現概日リズムの特性を比較し、内的脱同調の成因メカニズムを探索した。

研究成果の概要(英文)：The circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is responsible for controlling behavioral activity rhythms, such as a free running rhythm in constant darkness. There are several circadian oscillators in other brain regions including the arcuate nucleus (ARC). In specific conditions such as food anticipatory activity rhythms in the context of timed restricted feeding, an alternative circadian pace-making system has been assumed by means of circadian oscillators like the SCN. Consequently, an internal de-synchronization might be occurred within a body. We investigated circadian rhythms in the SCN and extra-SCN region of the ARC by analyzing PER2::LUCIFERASE expression in specific regions from wild-type C57BL/6, Cry1^{-/-}, and Cry2^{-/-} mice. Interestingly, the periods in the ARC of both genotypes were identical to those in the SCN. Moreover, the amplitudes of PER2::LUC rhythms in the ARC of all animals were decreased compared to those in the SCN.

研究分野：環境生理学

キーワード：概日リズム 体内時計 社会的時差ボケ 内的脱同調 視交叉上核 弓状核

1. 研究開始当初の背景

近年、社会的時間(時計の時刻)と生理的時刻との乖離を「社会的時差ボケ(ソーシャルジェットラグ)」とみなして、様々な生活習慣病、精神疾患のリスクファクターとなりうる可能性が示されている。社会的時差ボケでは、不顕的に特定の脳神経機能や生理機能リズムが乖離する「内的脱同調」が生じている可能性が指摘される。我々は発達期における社会適応と生理機能適応について、概日リズム障害の視点から療育の新たな側面と可能性を提言している(Takasu et al. 2011 *Jpn Dent Sci Rev*)。

視床下部視交叉上核は体内時計の中核であり、外部環境からの時間情報がない状態でも生体内で時を刻み概日リズムは継続する。視交叉上核以外にも脳内には概日リズムを刻む神経核が見出されており、弓状核はその一つである。摂食タイミングを制限する環境下では、一部の生理機能リズムが視交叉上核リズムから乖離することが知られており、生体リズムの内的脱同調と呼ばれる。しかしながら内的脱同調の成因メカニズムは明らかでない。

2. 研究の目的

通常、視床下部視交叉上核は生理機能や行動にみとめられる概日リズムのペースメーカー機能を担う。概日リズムは一細胞レベルで発振し、時計遺伝子群 (*Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry*) が形成する転写/翻訳フィードバックループが概日リズムの分子発振メカニズムであると考えられている。概日リズムの一細胞内発振機構の発見は、それまでの視交叉上核がほぼ唯一の概日時計であるとの概念を一変させた。すなわち、視交叉上核以外の神経核も、概日リズムのペースメーカーとして機能しうるということが現実味を帯びてきた。しかしながらこれまでのところ視交叉上核以外に概日ペースメーカーとして機能する神経領域や神経回路は同定されていない。我々は、視交叉上核を実験的に破壊したマウスを時間制限給餌条件下におくことで、給餌時刻を予知するかのような給餌時刻前行動リズムを示すことを報告した。時計遺伝子 *Cry1KO* マウスの給餌予知行動リズムは野生型マウスの予知行動リズムに比べて短周期を示し、*Cry2KO* マウスの給餌予知行動リズムは長周期を示した (¹Takasu et al. 2012 *PLoS ONE*)。これらの結果より、予知行動を駆動する概日ペースメーカーは *Cry* 遺伝子欠損によって概日周期が変化することが予想される。視床下部弓状核はレプチンやインスリンに反応性をしめし、摂食調節やエネルギーバランスの維持に重要な機能を果たしていることが知られている。そこで、本研究では、視床下部弓状核の概日リズム特性を調べた。体内時計中枢である視交叉上核と、視交叉上核外における概日ペースメーカーの候補部位における時計遺伝子発現概日リズム

の特性を比較し、内的脱同調の成因メカニズムを探索した。

3. 研究の方法

(1) 視交叉上核と弓状核における PER2 発現: 12 時間明期/12 時間暗期の 24 時間明暗サイクルでマウスを飼育した。恒常暗環境に移し、3 日目の本来点灯時刻および本来消灯時刻に脳を採取し、免疫染色法にて視交叉上核と弓状核における PER2 発現を調べた。

(2) *CryKO* マウスの輪回し行動表現型:

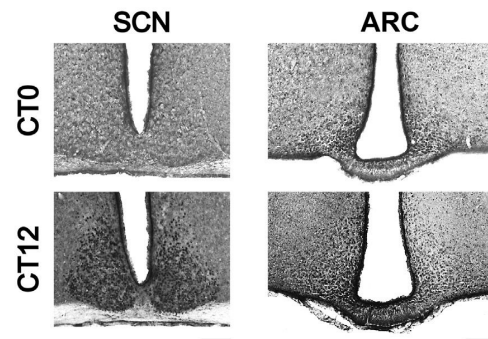
野生型 PER2 生物発光レポーターマウスと、同レポーター *Cry1KO* または *Cry2KO* マウスの輪回し行動概日リズムを比較した。各遺伝型マウスは回転輪ケージで 12 時間明期/12 時間暗期の 24 時間明暗サイクルで個別に飼育した。明暗サイクル下での輪回し行動を観察したのちに、恒常暗環境に移行し、輪回し行動概日リズムを測定した。

(3) 視交叉上核と弓状核における PER2 発光レポーター発現リズム: 野生型 PER2 生物発光レポーターマウスと、同レポーター *Cry1KO* または *Cry2KO* マウスから視交叉上核、弓状核を切り出し、生体外(培養皿内)における生物発光変動を測定した。生物発光計測は光電子増倍管(浜松ホトニクス:H9319-11)を用いて 1 週間行った。

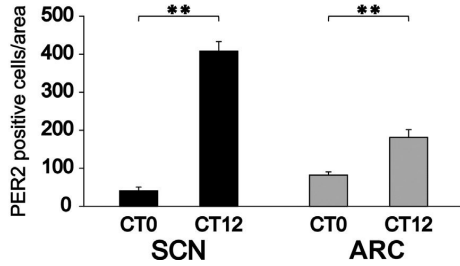
(4) 視交叉上核と弓状核における概日リズム特性の比較: 野生型、*Cry1KO* または *Cry2KO* マウスの視交叉上核と弓状核における生物発光レポーター概日リズム特性について、概日周期、リズム振幅、リズム減衰を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 視交叉上核と弓状核における PER2 発現: 視交叉上核および弓状核における PER2 発現を免疫染色法にて調べた。視交叉上核では概日時刻 0 (CT0; 元の点灯時刻に相当) における PER2 免疫陽性細胞がほとんど検出できなかった。一方 CT12 (元の消灯時刻に相当) では、視交叉上核領域全域に PER2 発現が認められた。また、弓状核では CT0 における PER2 免疫陽性細胞は神経核を構成する一部の神経細胞に局限していた。一方 CT12 で

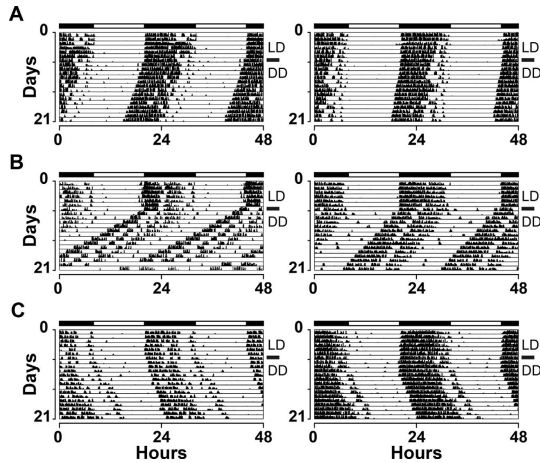


は、免疫陽性細胞は弓状核全域に分布していた。両神経核における PER2 免疫陽性細胞数をカウントすると、どちらの神経核においても主観的朝に発現細胞数が少なく、主観的夜に細胞数が多い統計学的に有意な昼夜差を認められた。



脳サンプル採取時の環境光サイクルは恒常暗にしていることから、この昼夜差は内因性の発現リズムに起因しているものと考えられる。

(2) *Cry0* マウスの輪回し行動表現型:

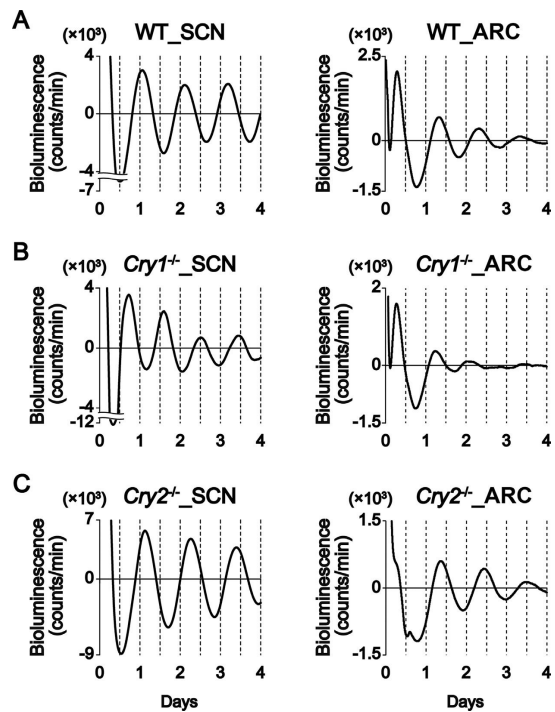


PER2 生物発光レポーターを導入(ノックイン)したマウス行動概日リズムの解析を行った。明暗サイクル下では、何れの遺伝型マウスも夜間に盛んに輪回し行動を行う明瞭な夜行性リズムを示した。恒常暗環境下で平均 23.8 時間の輪回し行動概日周期を示した野生型マウス群と比較して、*Cry1* 欠損マウスは行動概日リズム周期の短縮(22.5 ± 0.5 時間)をきたし、*Cry2* 欠損マウスは行動概日リズム周期の延長(24.4 ± 0.2 時間)をしめた。

(3) 視交叉上核と弓状核における PER2 発光レポーター発現リズム:

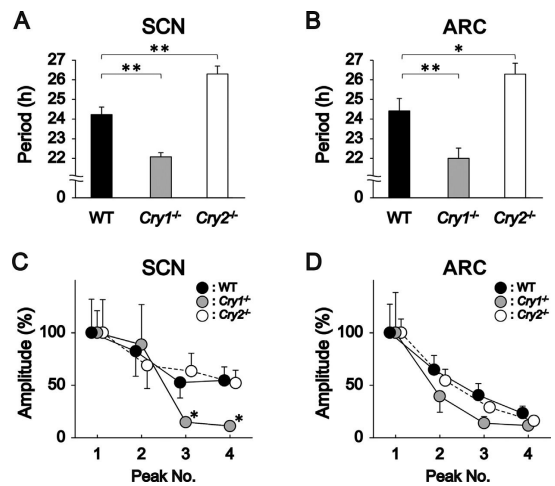
12 時間明期/12 時間暗期の 24 時間明暗サイクルで飼育した野生型 PER2 生物発光レポーターマウスと、同レポーター *Cry1*KO または *Cry2*KO マウスより全脳を採取し、組織スライサーを用いて厚さ 300 μ m の脳切片を作成した。実体顕微鏡下で、視交叉上核および弓状核を特定し、同神経核領域を切り出し、生物発光基質(ルシフェリン)を含む培養液を用いて生体外における PER2 発光レポーター発

現リズムを測定した。視交叉上核と弓状核では、どちらも安定した生物発光概日リズムを計測することが可能であった。



(4) 視交叉上核と弓状核における概日リズム特性の比較:

視交叉上核における PER2 発現概日リズムは、野生型、*Cry2*KO で安定したリズム振幅を示したのに対し、*Cry1*KO では当初の 2 サイクル以降、リズム振幅の減弱が認められた。一方、弓状核では何れの遺伝型においてもリズム振幅の減衰が認められ、遺伝型間における差異はみとめなかった。概日周期は野生型に対して *Cry1*KO では周期の短縮、*Cry2*KO では周期の延長が認められたが、両神経核間の周期に差異は認められなかった。



以上の結果より、弓状核が示す概日リズム特性は視交叉上核と類似しており、視交叉上核外ペースメーカーの候補となりうる (Uchida *et al.* 2016 *Neurosci Lett*³)。一方で、ペースメーカーとしての機能同定には

いまだ不十分な点があり、今後の課題である。生体における「内的脱同調」の成因解明に向けて更なる検討が必要である。

<引用文献>

Takasu NN. *et al.* Importance of regular lifestyle with daytime bright light exposure on circadian rhythm sleep-wake disorders in pervasive developmental disorders. *Jpn Dent Sci Rev*, 47: 141-149. (2011)

Takasu NN. *et al.* Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock-deficient mice. *PLoS ONE*, 7: e48892. (2012)

Uchida H. *et al.* Cryptochrome-dependent circadian periods in the arcuate nucleus. *Neurosci Lett*, 610: 123-128. (2016)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

Nakamura TJ, Takasu NN, Nakamura W. The suprachiasmatic nucleus: age-related decline in biological rhythms. *J Physiol Sci*, 査読有, DOI 10.1007/s12576-016-0439-2. (2016)

Uchida H, Nakamura TJ, Takasu NN, Todo T, Sakai T, Nakamura W. Cryptochrome-dependent circadian periods in the arcuate nucleus. *Neurosci Lett*, 査読有, 610: 123-128. (2016)

Yamanaka Y, Hashimoto S, Takasu NN, Tanahashi Y, Nishide SY, Honma S, Honma K. Morning and evening physical exercise differentially regulate the autonomic nervous system during nocturnal sleep in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 査読, 309: R1112-21. (2015)

Takasu NN, Nakamura TJ, Tokuda IT, Todo T, Block GD, Nakamura W. Recovery from age-related infertility under environmental light-dark cycles adjusted to the intrinsic circadian period. *Cell Rep*, 査読有, 12: 1407-1413. (2015)

[学会発表](計 6件)

中村 渉、高須奈々、内因性概日リズムに最適化した環境明暗サイクルによる加齢性不妊症状の改善、第93回日本生理学会大会、2016年3月22日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

草野慎之介、中西祐一郎、中村孝博、高須奈々、中村 渉、視交叉上核の概日リズム位相後退が引き起こす“社会的”時差ボケ、第11回環境生理学プレングレス、2016

年3月21日、北海道大学(北海道・札幌市)

Takasu NN, Nakamura W. Recovery from age-related infertility under environmental light-dark cycles adjusted to the intrinsic circadian period. International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases, 2015年12月10日、大阪大学(大阪府・吹田市)

高須奈々、中村孝博、草野慎之介、中西祐一郎、徳田功、中村 渉、マウス概日行動リズムの加齢変化と“社会的”時差ボケ、第22回日本時間生物学会学術大会、2015年11月22日、東京大学(東京都・文京区)吉田尚起、高須奈々、松本光平、徳田功、中村孝博、中村 渉、マウス輪回し行動リズムの加齢変化、第10回環境生理学プレングレス、2015年3月20日、ホテル北野プラザ六甲荘(兵庫県・神戸市)

高須奈々、松本光平、野田陽平、中村孝博、中村 渉、概日リズムを攪乱する“社会的”時差ボケ、第21回日本時間生物学会学術大会、2014年11月8日、九州大学(福岡県・福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~chrono/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高須 奈々 (TAKASU, Nana)

大阪大学・大学院歯学研究科・特別研究員
研究者番号: 30467394