

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590240

研究課題名（和文）体内時計中枢の細胞間同期機構－視交叉上核の細胞多様性をふまえて－

研究課題名（英文）Synchronization among heterogeneous oscillator cells in the suprachiasmatic nucleus, the circadian center.

研究代表者

重吉康史（SHIGEYOSI YASUFUMI）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20275192

研究成果の概要（和文）：体内時計中枢である視交叉上核における細胞間同期機構を検討した。その結果、背内側部および腹外側側部という機能が異なる2つの領域を同期しているのがVIPとVpac2受容体を用いた細胞間の情報伝達であることが示唆された。また、視交叉上核が周期の異なる2領域に分割できることが明らかになった。これを数値的にシミュレーションしたところ、視交叉上核に見られる位相波現象を再現することができた。

研究成果の概要（英文）：To know the intercellular system that keeps the synchrony among oscillator neurons in the SCN, we developed two projects to delineate the intrinsic synchronizing systems. We got two bland new findings. (1) Synchrony between dorsomedial SCN (DMSCN) and ventrolateral SCN (VLSCN) is possibly attained by VIP and VPAC2 system. (2) We found that the SCN is divided into two parts in relevance to period of circadian rhythm. Medial small part containing oscillators with a period less than 24 hours and the rest of the SCN with a period longer than 24 hours.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：視交叉上核・サーカディアンリズム・体内時計・概日リズム・同期

1. 研究開始当初の背景

視床下部に存在する視交叉上核は末梢臓器を含めた体内時計の階層構造の最上位に位置する中枢時計である。視交叉上核からは末梢の自発運動、睡眠覚醒、体温、ホルモン分泌など末梢のリズム現象を支配している。視交叉上核から発振される概日リズムは通常では約24時間を周期とし、

安定している。視交叉上核の細胞の個々が概日リズムの発振能があることが知られている。視交叉上核の細胞はWelsh, Honmaらによって行われた分散培養によって各々の細胞が、リズム情報を交換できない状況下において各々の発振細胞は多様な周期を生み出すことが明らかになった。すなわち、生体の視交叉上核の内部では細胞間でのリズム情

報の交換によって、視交叉上核全体での同期を達成していると考えられる。一方、申請者らは時差症候群の機序を検討する過程で視交叉上核の小領域、すなわち背内側部と腹外側部に脱同期から同期を生じる過程を明らかにした。視交叉上核の腹外側部には網膜からの直接の投射があり、環境の光情報を直接受ける。背内側部には直接の投射がほとんど存在しない。すなわち、視交叉上核において光情報が直接入力する部位と間接的にしか入力されない部位が存在する。興味深いことにこのような入力機構の二重性が、時差症候群（時差ぼけ）を生じていることを申請者らは明らかにした（J. Neurosci. Nagano et al. 2003）。明暗周期のシフトが生じたとき網膜からの投射の無い背内側部は最大で一日二時間しか変位しない。よって、環境のリズムと体内時計のずれを解消するのに一週間から二週間かかる。それが時差症候群を生じる。一時的に生じた体内時計と環境のリズムのずれは最終的に解消される。これは腹外側部に局在する体内時計の位相を背内側部に伝える機構が存在することを示唆する。腹外側部から背内側部には非常に密な神経投射が存在することが知られているが、いかなる神経伝達物質を用いた神経結合によって同期が達成されているのかは明らかになっていない。

視交叉上核においては、多様な概日周期を持つ発振細胞群が同期して、安定した周期をもつ概日リズムを発振している。同期機構が破綻した際には、視交叉上核の神経細胞は固有の周期のリズムを発振する。また、一部の発振細胞が外部からの入力によって位相がシフトし、視交叉上核内部が脱同期状態となった際には、固有の同期機構で、再同期にいたる。再同期には数日から二週間を要する。このような細胞間の同期機構は現在のところ体内時計中枢である視交叉上核にのみ認められており、長期にわたって安定したリズムを生み出すために必須の機構であると考えられている。

2. 研究の目的

視交叉上核内に存在する神経細胞間の同期が達成できているかについては殆ど知られていない。とくに我々は明暗サイクルの迅速なシフトによる内的脱同期がいかにして再同期するかについての検討を進めようと考えていた。現在まで腹外側部が背内側部に情報を与えるメカニズムに

ついて明らかになっていない。このような視交叉上核に内在する同期を保持するシステムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. 体内時計中枢の内部で各細胞を同期している分子を探索するために、視交叉上核に特異的に発現する遺伝子および、視交叉上核の小領域である腹外側部と背内側部におのおのの限局する発現遺伝子の包括的遺伝子発現解析をDNA microarrayを用いて行った。これによって抽出された遺伝子について in situ hybridization および免疫組織化学を用いて局在を検討した。腹外側部、背内側部に明瞭に局在する遺伝子を選択した。

これらのリガンドについて発光モニター系を用いて、概日リズムの位相の変位量を検討した。領域ごとに細切したのち、リガンドを添加し、その際の位相変位を計測した。

2. 視交叉上核内の細胞間、領域間同期の機構を Per2::dluc ラットの視交叉上核スライス培養を用いて検討した。細胞内の cAMP を高濃度に維持し、視交叉上核の細胞間同期を破壊する目的で Forskolin の継続投与を行った。一細胞ごとの概日リズムを観察するため冷却 CCD カメラを用いた。

4. 研究成果

1. 体内時計中枢の内部で各細胞を同期している分子を探索するために、視交叉上核に特異的に発現する遺伝子および、視交叉上核の小領域である腹外側部と背内側部におのおのの限局する発現遺伝子の包括的遺伝子発現解析をDNA microarrayを用いて行った。それによって、 $P < 0.0001$ の条件にて約2000個の遺伝子を抽出した。同時に、このデータベースを基に視交叉上核に内在するリガンド、受容体のセットを見いだした。これらの遺伝子については、実際に視交叉上核に限局して発現していることを明らかにするために、in situ hybridization法による局在検索を行った。この検索でもっとも、明瞭に選択の要諦を満たしたのが、腹外側部に特異的に発現するVIPであり、背内側部に特異的に発現するVpac2 (Vip2) 受容体であった。この遺伝子の発現分布から、腹外側部と背内側部の非同期が生じた際にVIP/VPAC2受容体を用いて、同期状態を回復することが示唆された。

これに基づいて、視交叉上核スライス培養を用いた薬剤効果の検討に入った。(1) このプロセスにおいて必要とされるPer2プロモーター::迅速分解型ルシフェラーゼ遺伝子導入ラット (Per2::dlucアステラス製薬より提供) の提供を

受けいつでも使用できる環境が整った。(2) 視交叉上核のスライス培養を行い、Photomultiplier Tubeで発光を検出することによって、視交叉上核概日リズムの位相変位を時系列で追跡することが可能となったこと。(3) 本研究の目的である、体内時計の操作を行うためには、体内時計中枢である視交叉上核に候補薬剤を作用させその効果を検証することが所要時間の短縮になると判断した。

ここで、Vpac2受容体を含む背内側部のみ、Vpac2受容体がほとんど発現しない腹外側部からの切片を作成しおのおのの切離切片へのVIPの概日リズムに対する作用を観察した。

VIPを背内側部だけに作用させたの切片では10時間以上の位相変位を生じた。一方、背側部と腹外側部を切り離さずにVIPを作用させると、位相変位は最高でも数時間に留まった。また、腹外側部を単独で切離し、VIPを作用させると、位相変位はほとんど生じなかった。よって、VIPは背内側部に限局した作用を示す。この結果はin situ hybridizationでVpac2受容体が背側部に限局して発現するとの所見を支持する。また、背内側部の位相変位の幅が腹外側部からの入力によって影響を受けていることを示唆する。これらの検討をまとめるとVIPが、腹外側部から背内側部に作用することによって、視交叉上核内の腹外側部と背内側部の同期が達成されていると考えられた。

2. 視交叉上核内の細胞間、領域間同期の機構をPer2::dlucラットの視交叉上核スライス培養を用いて検討した。細胞内のcAMPを高濃度に維持し、視交叉上核の細胞間同期を破壊する目的でForskolinの継続投与を行った。視交叉上核の画像を解析する際、小さなグリッド領域の周期、位相を個別に検討した。その結果24h未満の周期をもつ背側部の内側の小領域と、それ以外のすべての領域を占める24時間より長い周期を示す領域に分割できることが明らかになった。このような観察において、位相波が生じる機序を突き止めるために数値的シミュレーションを行った。

これらの結果は、すでに複数回学会で報告している。また、来年度に英文論文としての報告を予定している。

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)

[雑誌論文] (計9件)

- ①Fuke S, Kubota M, Kasahara T, Shigeyoshi Y, Kato T. Regional variation in mitochondrial DNA copy number in mouse brain. *Biochim Biophys Acta*. 2010 1807(3):270-4 査読有り
- ②Masumoto KH, Ukai-Tadenuma M, Kasukawa T, Nagano M, Uno KD, Tsujino K, Horikawa K, Shigeyoshi Y, Ueda HR. Acute Induction of Eya3 by Late-Night Light Stimulation Triggers TSH β Expression in Photoperiodism. *Curr Biol*. 2010 20(24):2199-2206 査読有り
- ③Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y. Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *proc Natl Acad Sci U S A* 2010 107(8):3846-51 査読有り
- ④Yagita K, Yamanaka I, Koinuma S, Shigeyoshi Y, Uchiyama Y. Mini Screening of Kinase Inhibitors Affecting Period-length of Mammalian Cellular Circadian Clock. *Acta Histochem Cytochem*. 2009 27;42(3):89-93. 査読有り
- ⑤Mamoru Nagano, Akihito Adachi, Koh-hei Masumoto, Elizabeth Meyer-Bernstein, and Yasufumi Shigeyoshi rPer1 and rPer2 induction during phases of the circadian cycle critical for light resetting of the circadian clock, *Brain research* 2009 1289:37-48 査読有り
- ⑥Nitta Y, Shigeyoshi Y, Nakagata N, Kaneko T, Nitta K, Harada T, Ishizaki F, and Townsend J. Kinetics of blood glucose in mice carrying hemizygous Pax6. *Exp. Anim*. 2009 58(2):105-112 査読有り
- ⑦Koinuma S, Yagita K, Fujioka A, Takashima N, Takumi T, Shigeyoshi Y. The resetting of the circadian rhythm by Prostaglandin J(2) is distinctly phase-dependent. *FEBS Lett*. 2009 583(2):413-8 査読有り
- ⑧Kumaki Y, Ukai-Tadenuma M, Uno KD, Nishio J, Masumoto KH, Nagano M, Komori T, Shigeyoshi Y, Hogenesch JB, Ueda HR. Analysis and synthesis of high-amplitude Cis-elements in the mammalian circadian clock *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 105(39) 14946-51 査読有り
- ⑨Takahashi Y, Takahashi M, Carpino N, Jou ST, Chao JR, Tanaka S, Shigeyoshi Y, Parganas E,

Ihle JN. Leukemia inhibitory factor regulates trophoblast giant cell differentiation via Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3-suppressor of cytokine signaling 3 pathway. Mol Endocrinol. 2008 22(7) 1673-81 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

- ① 重吉康史 A mechanism coupling two major subregions of the mammalian central circadian pacemaker 米国神経科学学会サンディエゴ 2010年11月15日
- ② 重吉康史 視交叉上核内の小領域の機能特異性日本生化学会大会 神戸市 2009年10月21日
- ③ 重吉康史 Distinct oscillation characteristics among subregions of the suprachiasmatic nucleus. International Symposium on Biological Rhythm, Sapporo, 札幌 2009年8月2日
- ④ 重吉康史 Two distinct oscillators in the suprachiasmatic nucleus IX. Congress of the European Biological Rhythm for Chronobiology Strassbourg, France 2009年8月26日
- ⑤ 重吉康史 シンポジウム 「生理機能を支配する末梢の時計：生物リズム研究の新展開」第85回日本生理学会大会 3/25 2008 京王プラザホテル
- ⑥ 重吉康史 「Kallmann 症候群の分子機序」第41回発育異常研究会 2008年6月2日大阪

〔図書〕(計3件)

- ① 重吉康史 「Kallmann 症候群の分子機序」 The Review of Medicine and Pharmacology Pharma Medica 2008 V26 No9 P172-174 メディカルレビュー社 2008 9/10 発行
- ② 重吉康史・筋野貢・堀川和政 概日リズムと睡眠 脳と栄養ハンドブック P29-240 2008 10/16 発行
- ③ 重吉康史 ウェルネスのススメ 最近睡眠不足で困っているのですが何か対策はありますか? Wellness News V56 P14 学生健保共済会 2008 10/1 発行

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重吉康史 (SHIGEYOSHI YASUFUMI)
近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20275192

(2) 研究分担者

藤岡厚子 (FUJIOKA ATSUKO)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：30077664
長野護 (NAGANO MAMORU)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：80155960
鯉沼聡 (KOINUMA SATOSHI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：10340770
筋野貢 (SUJINO MITSUGU)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：30460843

(3) 連携研究者

()

研究者番号：