

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590248

研究課題名(和文) 体内時計の中核である視交叉上核における入力系及び同調機構の形態学的解明

研究課題名(英文) Morphological approach to mechanisms of light input and synchronization to the circadian oscillator

研究代表者

長野 護 (NAGANO, Mamoru)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80155960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：視交叉上核における入力系および同調機構を検討した。その結果、視交叉上核は周期の異なる2領域、最内側領域に周期の短い領域と外側領域に長い周期を持つ細胞群がそれぞれ存在することが明らかとなった。そして、これらの領域間においてcAMPを同期シグナルとしていることが考えられた。また、視交叉上核への光シグナルの入力制御機構の1つであるゲート機構の位相を規定しているのは視交叉上核の背内側部であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms of light input and synchronization in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Using rPer2 promoter::Luciferase rat, we have found that the SCN is divided into two regions in relevance to period length. One of which showed medial region of the SCN containing oscillators with a period shorter than 24 hours (SPR) and lateral region with a period longer than 24 hours (LPR). And we have found that synchrony between SPR and LPR is possibly attained by cAMP signaling. Then, We observed Per1 and cFos induction in the SCN by light when the environmental LD cycle (12:12-h) was abruptly changed to dissociate the dorsomedial SCN (DMSCN) and ventrolateral SCN (VLSCN). As a result, the phase shifting of the gate corresponded well with that of the DMSCN. The finding suggested that the DMSCN determines the phase of the gate.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織・発生)

キーワード：視交叉上核 同調機構

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類においては、体内時計の中核である視交叉上核が網膜からの光情報入力に同調し、環境の時間的変化への適応や体内の多様な生理機能の概日リズムの制御に関係している。この視交叉上核の個々の神経細胞は、非同期の状態では多様な周期の概日リズムを発振することが明らかになっている。よって、視交叉上核が単一周期を発振かつ安定したリズム維持のためには細胞間のコミュニケーションが必要である。一方、我々は、視交叉上核において、明暗環境の変化に対して直ぐに腹外側部（光反応領域）が同調し、その後背内側部（非光反応領域）が腹外側部に同期することや視交叉上核は幾つかの異なった機能を有する領域から構成されていることを明らかにした。他の研究者らも、培養系実験により視交叉上核全体において幾つかの異なった位相周期を示す領域の存在を報告している。このことから、視交叉上核における同調機構は、視交叉上核全体における小領域間の同期と個々の細胞レベルにおける同期の両相において検討する必要がある。この小領域間の細胞の位相を調節する情報伝達を担う分子としては、神経ペプチドが考えられ、腹外側部にはVIP、GRP細胞が、背内側部にはAVP細胞が局在する。我々は、これらペプチドの受容体細胞の局在を *in situ* hybridization (ISH) で検討し、VIPが腹外側部から背内側部への情報伝達分子であることを示した。また、Per2::lucトランスジェニックラットを用いての視交叉上核のスライス培養実験で、視交叉上核におけるVIP-VPAC2を介しての情報伝達が背内側領域に局限していることを検証した（背内側部と腹外側部に分離してVPAC2のアゴニストであるVIPを投与すると背内側部のみ位相前進を起こした）。しかし、視交叉上核における領域間の情報伝達の全体像を明らかにするためにはより包括的な情報の探索と応答性の解析が必要である。

すでに我々はラット視交叉上核の包括的遺伝子解析を行い腹外側部及び背内側部に局限して発現する受容体を抽出している。そこで、これらのデータを基に形態学的手法とスライス培養実験を用いて、視交叉上核における情報伝達の発信領域と受信領域を定め

ることができ視交叉上核内部のネットワークを明らかにできると考えた。これらの研究を速やかに遂行することで、視交叉上核における入力系および同調機構の解明に取り組む。

## 2. 研究の目的

### (1) 視交叉上核における同期機構の解明

哺乳類概日リズムの中核である視交叉上核 (SCN) は、構成するそれぞれの神経細胞が固有の周期を持って概日リズムを発振している。そして、これらの神経細胞間の同期によって同周期の概日リズムを刻んでいる。しかし、SCN組織切片の長期間培養で、振動の減衰が観察され、薬物添加による再同調では振動が回復することから細胞間の脱同期の結果と考えられる。そこで、Per2::lucラットのSCN組織培養を作製し、CCDカメラによって各領域の周期変化を追跡し、細胞間がどのように脱同期するかを観察する。次に、SCNの細胞間の同期にはcAMPによる位相伝達が必要であることが報告されていることから、このシグナル伝達系を攪乱した際にSCN内の周期や位相がどのような影響を受けるかについて検索する。これらの研究を進めていき、視交叉上核における同期機構を明らかにしていく。

### (2) 視交叉上核における入力シグナルの調節機構の解明

光によって体内時計中核であるSCNの概日リズムがシフトする。この際、主観的夜の光照射はシフトを生じ、SCNでのcfos, Per1遺伝子の誘導を伴う。一方、主観的昼の光照射に対して体内時計位相は変化せずcfos, Per1遺伝子も誘導されない。このように光入力があってもSCNがシフトしない機構をゲートと呼ぶ。このようにSCNには、光シグナルを制御する機構が備わっており、この入力シグナルの調節機構を明らかにするため、このゲートの位相

を規定しているのがSCNの背内側部(DMSCN)あるいは腹外側部(VLSCN)かを検討する。

### (3) 視交叉上核における出力機構の解明

SCN からの制御がおよぶ領域の多くは室傍核領域(PVNR)を経由することから、PVNR が SCN からの情報を受けて修飾し、他の領域に出力していると考えられる。そこでSCN 組織スライスを用いてどのような機構で PVNR に情報を伝えているのかを調べて、SCN における出力機構を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

### (1) 視交叉上核における同期機構の解明

Per2::luc トランスジェニックラットからの視交叉上核(SCN)の前額断組織切片を作成し、高感度 CCD カメラによって周期変化を追跡し、細胞間がどのように脱同期するかを観察する。つぎに、新生児 Per2::luc トランスジェニックラット SCN 組織スライスの発光を測定し、続いて cAMP シグナルを受容体非依存的に活性化するホルスコリンを継続的に作用させることで同期シグナルを攪乱し、SCN を縦横 10×10 区画に分割した小領域についてそれぞれ位相と周期の解析を行う。さらに、SCN 組織スライスを眼科用メスで内側 1/3 と外側 2/3 に分割し、それぞれの周期を測定して、内側と外側領域の同期シグナルを遮断した状態での周期を調べる。

### (2) 視交叉上核における入力シグナルの調節機構の解明

ラットの明暗サイクルを 10 時間後退させて、視交叉上核腹外側部(VLSCN)と背内側部(DMSCN)に脱同期を生じさせた後、30 分間の光照射による SCN における cfos、Per1 遺伝子の誘導を経時的に観察する。そして、明暗サイクルシフト後における光による VLSCN での cfos 遺伝子発現誘導の位相変位を DMSCN と VLSCN におけるそれぞれの Per1 遺伝子発

現サイクルの位相変位と比較し、VLSCN と DMSCN のいずれにゲート位相が一致するかを検討する。

### (3) 視交叉上核における出力機構の解明

Per2::luc ノックインマウスから視交叉上核(SCN)と室傍核下部領域(SPVN)を含んだ脳組織スライスを作製し、高感度 CCD カメラを用いて 2 領域の発光リズムを同時に測定する。つぎに SPVN が発光リズムを維持するためには、SCN からのなんらかのシグナルが必要であることを確認するために、SPVN を単独で培養し高感度 CCD カメラで観察した後、SCN と共培養を行い、SPVN の発光リズムが回復するかを調べる。また、2 領域を含んだ脳組織スライスで発光リズムが継続していることを確認しながら物理的に神経連絡を切断し、2 領域の振動がどうなるかを調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 視交叉上核における同期機構の解明

Per2::luc トランスジェニックラットの視交叉上核(SCN)組織培養を作製し、高感度 CCD カメラによって周期変化を追跡し、細胞間がどのように脱同期するかを観察した結果、切片作製数日後において周期が大きく異なる細胞が現れ、このとき視交叉上核背内側部(DMSCN)の最背内側部では 24 時間よりも短い周期の細胞が、また視交叉上核腹外側部(VLSCN)では 24 時間よりも長周期の細胞が存在することが明らかとなった。つぎに、新生児 Per2::luc トランスジェニックラット SCN 組織スライスの発光を測定し、SCN を縦横 10×10 区画に分割した小領域についてそれぞれ位相と周期を求めたところ、培養下においても同期状態を維持し、均一な周期を示した。一方、位相については DMSCN の最背内側部から外側方向に向かって位相の遅れが存在し、位相波として観察された。続いて、cAMP シグナルを受容体非依存的に活性化す

るホルスコリンを SCN 組織スライスに継続的に作用させることで同期シグナルを攪乱し、周期と位相の解析を行った結果、新生児のラット SCN は組織スライス作製後の培養下において同期していたがホルスコリン存在下では SCN の細胞間および領域間の同期状態が失われていることを発見した。このとき最背内側部の位相波の起点に相当する領域で 24 時間よりも周期の短い領域 (SPR) が存在し、外側部分に 24 時間よりも長い周期をもつ領域 (LPR) が存在することが明らかになった。また、SPR は SCN で Per 遺伝子発現が内側から外側へと位相差を持って伝播する位相波の起点領域と一致していた。また、Per1, Per2 遺伝子の発現解析からこの位相差は短日条件から長日条件に変化させた際には拡大しており、位相波が日長時間の認識に重要な役割をもつことが考えられた。さらに、SCN 組織スライスにおいて SPR と LPR との間を物理的に切断し、同期シグナルを遮断した状態での周期を調べるため、Per2::luc トランスジェニックラット SCN 組織スライスを眼科用メスを用いて内側 1/3 と外側 2/3 に分割し、それぞれの周期を測定したところ、内側領域の周期は  $23.72 \pm 0.22$  h であったのに対して、外側領域の周期は  $24.55 \pm 0.2$  h を示し、有意に内側領域の周期が短いことが明らかになった。また、in situ hybridization により、SPR は、AVP とその受容体発現細胞の共存領域、LPR は、GRP とその受容体発現細胞の共存領域に相当することを示唆する結果を得た。以上の結果から視交叉上核の同期シグナルのやり取りを化学的及び物理的な方法で阻害することにより視交叉上核内側部には短周期の領域が存在し、外側部に長周期の領域が存在することが明らかになった。また、これらの領域間において cAMP を同期シグナルとしていることが考えられた。

## (2) 視交叉上核における入力シグナルの調節機構の解明

ラットの明暗サイクルを変化させて強制的に視交叉上核 (SCN) に脱同期を生じさせた後、光による SCN における cfos、Per1 遺伝子の誘導を経時的に観察し、視交叉上核腹外側部 (VLSCN) と背内側部 (DMSCN) のいずれにゲート位相が一致するかを検討した。明暗サイクルを 10 時間後退させるとラット SCN での Per1 遺伝子発現サイクルの位相において、VLSCN は直ぐに新しい明暗サイクルに同期するが、DMSCN は 1 日約 2 時間程度しか位相変位を起さず 2 領域間に脱同期が生じる。この明暗サイクルシフト後において光による VLSCN での cfos 遺伝子発現誘導の位相変位を DMSCN と VLSCN におけるそれぞれの Per1 遺伝子発現サイクルの位相変位と比較した結果、DMSCN における位相変位と類似していた。このことから、SCN において DMSCN がゲートの位相を規定していることが明らかとなった。

## (3) 視交叉上核における出力機構の解明

視交叉上核 (SCN) と室傍核下部領域 (SPVN) の時刻情報伝達機構を解明するために、Per2::luc ノックインマウスから SCN と SPVN を含んだ脳組織スライスを作製し、高感度 CCD カメラを用いて 2 領域の発光リズムを同時に測定した。その結果、SCN と SPVN の発光リズムは逆位相であった。SCN では背内側部より発光リズムの振動が、遅れて腹外側部の振動が起こる。さらに遅れて SPVN の振動が起きていることが分かった。つぎに、SPVN を単独で培養し高感度 CCD カメラを用いて振動を測定した結果、SPVN の発光リズムは弱い振動を示し、その振動は直ぐに減衰した。また SCN との物理的連絡を切断することによっても SPVN の発光リズムは消失した。そこで、

発光リズムが消失した SPVN を SCN と共培養することによって発光リズムの回復を試みた。Per2::luc ノックインマウスからの SPVN の単独培養スライスに発光しない野生型マウスの SCN を並べて共培養を行った。その結果、SPVN は単独培養と比較して大きな振幅の発光リズムを示した。この結果から、SPVN の振動には SCN からのシグナルが必要である事が明らかとなった。

#### 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)

- ① Koinuma S, Asakawa T, Nagano M, Furukawa K, Sujino M, Masumoto KH, Nakajima Y, Hashimoto S, Yagita K, Shigeyoshi Y. Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center. Eur J Neurosci. 査読有 38, 2013 2832-41 doi: 10.1111/ejn.12308.
- ② Hamada Y, Saigoh K, Masumoto KH, Nagano M, Kusunoki S, Shigeyoshi Y. Circadian expression and specific localization of a sialyltransferase gene in the suprachiasmatic nucleus. Neurosci Lett. 査読有 535, 2013, 12-7. doi: 10.1016/j.neulet.2012.12.032.
- ③ Sujino M, Furukawa K, Koinuma S, Fujioka A, Nagano M, Iigo M, Shigeyoshi Y. Differential Entrainment of Peripheral Clocks in the Rat by Glucocorticoid and Feeding. Endocrinology. 査読有 153, 2012, 2277-86. doi: 10.1210/en.2011-1794.

- ④ Kasukawa T, Masumoto KH, Nikaido I, Nagano M, Uno KD, Tsujino K, Hanashima C, Shigeyoshi Y, Ueda HR. Quantitative expression profile of distinct functional regions in the adult mouse brain. PLoS One. 査読有 6, 2011, e23228. DOI: 10.1371/journal.pone.0023228  
他5件

[学会発表] (計 7 件)

- ① 長野 護  
ラットの体内時計中枢である視交叉上核における光入力制御機構の局在  
第 19 回日本時間生物学会大会  
2012 年 09 月 15 日北海道大学 (札幌)
- ② 長野 護  
哺乳類体内時計中枢視交叉上核における光入力制御機構の局在  
第 117 回日本解剖学会  
2012 年 3 月 28 日 山梨大学 (山梨県)  
他 5 件

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
長野 護 (NAGANO, Mamoru)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80155960
- (2) 研究分担者  
鯉沼 聡 (KOINUMA, Satoshi)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 10340770
- 研究分担者  
升本 宏平 (MASUMOTO, Kohei)  
近畿大学・医学部・助教  
研究者番号: 60580529