

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08163

研究課題名(和文) 哺乳類中枢時計における測時領域の形態機能学的解析

研究課題名(英文) Histological and functional analysis in the subregion of mammalian circadian center

研究代表者

鯉沼 聡 (KOINUMA, Satoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10340770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類は安定した約24時間の周期を示す内因性の生物時計をもっている。この機能を支えているのは視床下部にある視交叉上核(SCN)である。我々はこれまでにSCNの背内側領域にこの周期よりも短いリズムを発振する細胞群が存在することを明らかにし、その領域を起点とする位相波(時計遺伝子の発現が内外側方向に伝播する波)に着目してきた。今回、これまでに知られていた内外側方向への位相波の他に吻尾軸方向の位相波の広がりが存在することが、マウスSCNを用いた組織化学的な検索によってわかり、生理学的機能の不明な位相波について基礎的な理解が深まった。

研究成果の概要(英文)：Mammals have an intrinsic biological clock that shows a stable period of about 24 hours. Underlying this function is the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus. We have elucidated that there are cell groups that oscillate rhythms shorter than this period in the dorso-medial region of the SCN (DM-SCN). And we have focused on a phase wave (the expression of the clock gene propagates from medial to lateral SCN) originating from DM-SCN. The presence of spreading of phase wave in the rostro-caudal axis direction in addition to the phase waves towards the lateral sides which was known so far was found by histochemical analysis using the mouse SCN. This result will deepen the basic understanding of the physiologically unknown function of the phase wave.

研究分野：時間生物学

キーワード：視交叉上核 概日リズム 位相波 Per2

## 1. 研究開始当初の背景

生物は様々な方法で地球の24時間周期に自らの体内時計を合わせている。この中で、光はもっとも強い同調因子として知られている。哺乳類では、眼から入った光刺激は網膜から視神経を通り、視床下部に存在する体内時計の中核である視交叉上核(SCN)の腹外側部に入力され、その後、出力領域である背内側部を経て同調シグナルが全身に送られる。SCNは左右一対の約一万個の細胞からなる神経核で、構成する神経細胞は単一細胞の段階から概日リズムを発振することが知られているが(Welsh et al. Neuron 1995)、その周期は一定ではなくばらばらしている。これら単一の神経細胞が領域ごとに密集してSCNのサブ領域を形成、さらにサブ領域が集まるとSCNを形成するという階層構造ができ上がると、それぞれの細胞や領域間での同期が起こり、安定したリズムを発振するようになる。SCNのサブ領域としては3種類の神経ペプチドの発現が腹外側部と背内側部に明確に限局していることから、この2領域の同期機構について詳しく調べられてきた。申請者らも腹外側と背内側の領域が、明暗周期の変更時にそれぞれの位相が分離することを見出し、このずれが時差ボケの原因であることを明らかにした(Nagano et al. J Neurosci. 2003)。また、腹外側と背内側のトランスクリプトーム解析と組織学的検索をおこなったところ、腹外側に限局的に発現するVIPに対して、その受容体Vpac2は相補的に背内側に局在し、VIPの一方方向的な情報伝達経路が存在することを見出した。VIPやVpac2の遺伝子欠損マウスにおいてはSCNの神経細胞間で非同期になるなど、SCNはサブ領域間のやりとりをリズム同調の基盤としている。したがって、SCNを包括的に理解するためにはサブ領域の働きを解明することが重要である。最近、申請者らは時計遺伝子Per2プロモーターの制御下でホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を発現するPer2::Lucトランスジェニック・ラットのSCN組織スライス培養を用い、VIP等の下流にある二次情報伝達物質cAMPを活性化剤フォルスコリンによって恒常的に賦活化することで情報伝達系を攪乱した。その結果、新たに背内側部の微小領域に21~23時間の短周期領域(SCR:Short Period Region)が、またその外側に25~27時間の長周期領域(LPR:Long Period Region)が存在することを明らかにした(Koinuma et al. Eur J Neurosci. 2013)。

一方、SCNでは内側から外側に向かって時計遺伝子の発現が波のように伝播するような現象(位相波)が観察されているが、その生理的な役割は解明されていない。しかし、申請者らの予備的な実験では日長時間が延びると、それに合わせるように位相波も延長して出現するということがわかり、位相波には日長時間を捉える仕組みが存在することが示唆された。興味深いことにSCRは位相波

の起点となる領域と重複しているように観察された。また、数理モデルからは、SCRとLPRが隣接し、SCRからLPRに向かって液性の情報伝達物質が放出されることで、時速数十マイクロメートルのゆっくりとした位相波が生じることが予測された(Koinuma et al. Eur J Neurosci. 2013)。このような背景からSCRやLPRは位相波の形成や時刻を認識する測時機能に関わる重要な領域である可能性が考えられたが、実際にどのような特徴をもった神経細胞群が、内外側および吻尾方向においてどのような範囲でこれらの領域を構成し、位相波を形成しているかについての基礎的な知見は得られていなかった。

## 2. 研究の目的

哺乳類体内時計の中核である視交叉上核(SCN)は、SCNを構成するサブ領域間の同期によって振動体としての安定な性質を獲得している。サブ領域としては、これまで神経ペプチドの発現から腹外側部と背内側部が知られており、その同期機構は時間生物学の重要なテーマになっている。最近、申請者らはSCRを脱同期させることで、新たなサブ領域として内側の短周期領域(SCR)と外側の長周期領域(LPR)を発見した。SCRでは内側から外側に向かって時計遺伝子の発現が波のように伝播することが観察されている。興味深いことにSCRとLPRはこの波(位相波)の起点と終点に位置していた。位相波の役割については不明な点が多いため、まずSCRとLPRを構成する細胞の形態学的特徴と、SCRにおける3次元的な位相波の広がりを組織学的に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

組織学的な検索のための動物は、BALB/Cマウス(雄、5週齢)を、7:00 light on /19:00 light off、照度400luxの環境下で2~3週間飼育し、実験に供した。光環境は明暗条件(LD 12:12)と恒暗条件の2種類でおこなった。明暗条件では飼育環境と同様のlight on/offのタイミングで7:00から、2時間の間隔で24時間にわたり視交叉上核の組織を採取し(ZT0, ZT2, ..., ZT24)、恒暗条件では、組織採取の1日前に恒暗に切り替え、7:00から同様に2時間の間隔で24時間にわたり視交叉上核組織を採取した(pZT0, pZT2, ..., pZT24)。採取後の組織はパラホルムアルデヒドにより固定し、吻側から尾側方向に30μm厚の冠状凍結切片を24枚作製した。組織切片に対し、mPer2遺伝子のDIG-labeled RNAプローブを用い、*in situ* hybridizationによって発現細胞を同定した。

## 4. 研究成果

(1) 恒暗条件下でのPer2陽性細胞が示す位相波  
恒暗条件においてマウス視交叉上核(SCN)におけるPer2遺伝子発現細胞を検索した。まず、SCRの吻尾方向中央領域におけるPer2

遺伝子発現の内側から外側への広がりを確認した。pZT0 において視交叉上核の最内側部から発現が始まり、pZ2, pZT4, pZT6, pZT8 にかけて強い発現が内側から外側へと広がるのを確認した。一方、発現の消失に関しては pZT14 の内側部では陽性細胞が大きく減るが、外側部ではまだ強い発現が維持されていた。pZT16 では外側部においても発現が大きく減少し、さらに、pZT18 から pZT20 で内外側ともにほとんど発現が観察されなくなった。内側から外側方向への位相波状の強い発現の伝播は pZT0 から pZT16 で観察され、その間、pZT6 から pZT12 で内外側全体で発現が維持されていた。

続いて SCN の吻尾軸に沿った発現領域を検索した。この吻側、尾側からおよそ 150  $\mu$  m の領域においては pZT22 から pZT0 において最初の発現が観察された。中央領域での発現が生じる pZT0 から pZT2 より早い段階で発現を確認した。吻尾端からの発現は時間経過とともに次第に中央に向かって強い発現が広がるように観察された。発現の開始と同様に発現の消失も吻尾側端が中央よりも先行していた。吻尾側領域では、pZT12 から発現が消失し始め、pZT14, pZT16 で両端からの発現が消失し始めていた。このことは内外側方向への発現の伝播の他に吻尾軸に沿った位相波の伝播も生じていることを示した。

(2) 明暗環境での *Per2* 陽性細胞が示す位相波明暗条件 (LD 12:12) においても、恒暗条件と同様の組織化学的な検討をおこなった。SCN 吻尾軸の中央部分では ZT0 で最内側領域に弱い発現が認められた。ZT4 から ZT14 において内外側全域で発現を確認したが、この中でも強い発現を示す部位は内側から外側に向かって移動するような組織像が観察され、ZT14 で最外側部で強く発現し、さらに ZT16 では最外側部で発現は減弱していた。このとき最内側部での発現は消失していた。恒暗環境下と同様に ZT16 から ZT18 で全体の発現は消失していた。

吻側 150  $\mu$  m と尾側 150  $\mu$  m の領域に注目すると、吻側では ZT22 から ZT0 で発現が観察された。尾側でも ZT0 で発現を観察したが、吻側での発現が尾側にやや先行するようだった。さらに詳細に観察すると吻側および尾側の中でも吻尾端の領域から発現が開始されていた。また、発現の消失に関しては ZT14 から ZT16 で吻尾端から消え始めるが、この時、吻尾側の中央寄りではまだ発現が維持されていることから、吻尾端から中央に段階的に発現が消失することが分かった。このことは、明暗環境においても吻尾側から中央への位相波の伝播が存在することを示している。

### (3) 恒暗環境と明暗環境の比較

今回の研究では、明暗環境で飼育した動物を恒暗環境に変更し、1 日後から標本を採集した。したがって、履歴効果により明暗環境の

影響がある程度残った状態での発現を観察していると考えられる。そのため、光によるより即時的な *Per2* の発現への影響の差が二つの環境の違いとして生じていると予想された。SCN で *Per2* の発現量の違いを観察するために、*Per2* の発現が弱い発現開始時、または消失する直前の時間帯での二環境下の違いを比較した。その結果、明暗環境下での発現は恒暗環境下のもとと比べて総体的に強く、陽性細胞の数も多く捉えられた。一方で、発現開始や発現消失のタイミング、さらに位相波の伝播の方向性に関しては二つの光環境間で同じパターンを示した。

今回の課題ではマウス SCN 全体での 3 次元的な時計遺伝子 *Per2* の発現の広がり (位相波) を検索した。SCN においては、これまでも内外側方向の位相波を観察していたが、今回は吻尾軸に沿った前頭断の組織切片を 2 時間の間隔で作製することで、内外側方向への位相波の移動を詳細に観察することができた。その結果、今回新たに吻側から尾側方向に、また尾側から吻側方向にといった二種類のベクトルをもつ位相波が存在することが明らかになった。この吻尾軸に沿った方向の位相波は恒暗環境下、明暗環境下ともに存在した。明暗環境下では、*Per2* の発現レベルが総体的に上昇していたが、基本的な位相波の伝播パターンは両環境下で共通していた。これまでの予備的な実験では、明期の延長により内外側方向への位相波の伝播時間も延長することを確認している。今回、実験を行った恒暗環境は明暗環境での飼育から 1 日後であり、明暗環境下の影響が残っていると考えられるため、位相波の伝播パターンや速度については差が生じなかったのかもしれない。また、時計遺伝子 *Clock* の変異マウスにおいては緩やかに広がる位相波が消失していることから、時計遺伝子による転写フィードバックが位相波の形成に必要なことが考えられている。今回の結果から、明暗環境下では恒暗環境下に比べて全体的な *Per2* の発現上昇は観察されたが、これにより直接的に位相波の出現や消失のタイミングは変更されていないことから、その伝播パターンを調節するような別の機構が存在することも考えられた。

### 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 5 件)

— Mitsugu Sujino, Takeshi Asakawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Koh-Hei Masumoto, Yasufumi Shigeyoshi  
CLOCK $\Delta$ 19 mutation modifies the manner of synchrony among oscillation neurons in the suprachiasmatic nucleus  
Sci Rep, Vol. 8, 854, 2018

doi: 10.1038/s41598-018-19224-1  
( 査読あり )

- Yuji Kanazawa, Keisuke Ikegami, Mitsugu Sujino, Satoshi Koinuma, Mamoru Nagano, Yuki Oi, Tomoya Onishi, Shinichi Sugiyo, Isao Takeda, Hiroshi Kaji, Yasufumi Shigeyoshi  
Effects of aging on basement membrane of the soleus muscle during recovery following disuse atrophy in rats  
Exp Gerontol, Vol. 98, pp. 153-161, 2017  
doi: 10.1016/j.exger.2017.08.014  
( 査読あり )

- Satoshi Koinuma, Hiroshi Kori, Isao T Tokuda, Kazuhiro Yagita, Yasufumi Shigeyoshi  
Transition of phase response properties and singularity in the circadian limit cycle of cultured cells  
PLoS One, Vol.12, e0181223, 2017  
doi:10.1371/journal.pone.0181223  
( 査読あり )

- Gen Kurosawa, Atsuko Fujioka, Satoshi Koinuma, Atsushi Mochizuki, Yasufumi Shigeyoshi  
Temperature-amplitude coupling for stable biological rhythms at different temperatures.  
PLoS Comput Biol, Vol. 13, e1005501, 2017  
doi: 10.1371/journal.pcbi.1005501  
( 査読あり )

- Masato Nakajima, Satoshi Koinuma, Yasufumi Shigeyoshi  
Reduction of translation rate stabilizes circadian rhythm and reduces the magnitude of phase shift  
Biochem Biophys Res Commun, Vol. 464, pp.354-359, 2015  
doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.158.  
( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

金澤佑治、池上啓介、筋野貢、鯉沼聡、長野護、大井優紀、大西智也、杉生真一、武田功、梶博史、重吉康史  
老化がラット骨格筋の基底板構築に与える影響  
2018 年 3 月 28 日 ~ 30 日  
第 123 回 日本解剖学会・全国学術集会  
日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学 ( 武蔵野市 )

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、武田功、梶博史、重吉康史  
後肢非荷重と再荷重が老化したヒラメ筋に与える影響

第 122 回 日本解剖学会・全国学術集会  
2017 年 3 月 28 日 ~ 30 日  
長崎大学坂本キャンパス ( 長崎市 )

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、武田功、梶博史、重吉康史  
後肢免荷と再荷重が老化した骨格筋の細胞外マトリクスに与える影響  
第 92 回 日本解剖学会近畿支部学術集会  
2016 年 11 月 27 日  
近畿大学薬学部 39 号館 ( 東大阪市 )

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、武田功、梶博史、重吉康史  
老年期における後肢非荷重と再荷重が骨格筋に与える影響  
第 2 回 日本筋学会学術集会  
2016 年 8 月 5 日 ~ 6 日  
国立精神・神経医療研究センター教育研修棟 ユニバーサルホール・3 号館セミナールーム ( 小平市 )

Masato Nakajima, Satoshi Koinuma, Yasufumi Shigeyoshi  
Effect of sublethal dose of inhibitors of some molecular processes in the circadian negative feedback loop on stability of circadian rhythm  
The European Biological Rhythms Society (EBRS)/World Congress of Chronobiology (WCC) meeting  
2015 年 8 月 2 日 ~ 6 日  
The University of Manchester, Manchester

筋野貢、鯉沼聡、重吉康史  
マウス培養視交叉上核における領域特異的周期差の探索  
第 22 回時間生物学会学術大会  
2015 年 11 月 21 日 ~ 22 日  
東京大学本郷キャンパス ( 東京 )

中嶋正人、鯉沼聡、重吉康史  
概日リズムの頑健性と安定性の制御  
第 22 回時間生物学会学術大会  
2015 年 11 月 21 日 ~ 22 日  
東京大学本郷キャンパス ( 東京 )

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

鯉沼 聡 ( KOINUMA, Satoshi )  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号 : 1 0 3 4 0 7 7 0

### (2) 研究分担者

長野 護 ( NAGANO, Mamoru )  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 8 0 1 5 5 9 6 0