

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11021

研究課題名(和文) 発光イメージングを用いた軟骨の体内時計の発達過程の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the development process of the cartilaginous biological clock

研究代表者

南 陽一 (MINAMI, Yoichi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40415310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、主にラットの軟骨の体内時計に関する検討を進めた。ともに体内時計の発光レポーター遺伝子をもつ遺伝子改変マウスとラットを用い、いずれの動物の軟骨を器官培養しても、明瞭な概日リズムが観察できることを確認した。また時計の分子機構の出力を低減するような遺伝子改変ラットを開発し、軟骨の時計について評価した。さらに遺伝子改変ラットの椎間板を器官培養したところ、軟骨の発光リズムのピーク時刻が、ラットの成長に伴って遅れていった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長に伴う概日リズムのピーク時刻の変化は、他の臓器でも同様の知見が報告されているが、軟骨では初の知見である。今回、時計の分子機能を障害したラットでも同様の現象がみられたことは、この現象が軟骨の分化を反映する可能性を示唆している。軟骨の時計の研究には、マウスを実験モデルとして用いることが主流であったが、ラットは体長も大きく、外科的操作にも適した実験動物である。本研究から、軟骨の時計研究においても、ラットが有用なモデルであることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, the cartilaginous circadian clocks were studied. The obvious circadian rhythms of reporter gene activity were confirmed in both PERIOD2::Luciferase knock-in mouse and Per2-dLuc transgenic (TG) rats. When vertebral cartilage was collected and cultured from neonates and juvenile Per2-dLuc TG rats, peak phases of the bioluminescence rhythm were delayed according to age. These results suggest that not only mice but also rats are a good model for studying the cartilaginous circadian clock and the circadian clock phases are changes according to the cartilage development.

研究分野：時間生物学

キーワード：軟骨 体内時計 発光イメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体内時計は体の中に「1日」を作り出すメカニズムであり、視床下部視交叉上核にその中枢がある。視交叉上核からは液性・神経性に体内に情報が伝えられ、様々な生理機能に約1日周期のリズム(概日リズム)を作り出す。体内時計が *Per2* や *Bmal1* といった一連の時計遺伝子から構成されていることがわかって以降、末梢臓器にも時計機構が備わっていることが明らかになった。末梢臓器の時計は、視交叉上核の影響下に自律振動能を発揮し、各臓器において適切なタイミングで生理機能が発揮できるよう機能すると考えられている。末梢時計の研究を進める上で、時計遺伝子を利用した発光レポーター遺伝子をもつ遺伝子改変動物が果たした役割は大きく、これまで PER2 タンパク質にホタルルシフェラーゼを融合する PER2::Luc ノックインマウスや、Per2 プロモーターによって誘導される易分解型ルシフェラーゼ遺伝子をもつ Per2-dLuc トランスジェニック(TG)ラットなどが研究に用いられてきた。

これまでの研究から、軟骨にも体内時計は内在し自律振動を刻んでいることが示されている(Yang and Meng, J Biol Rhythms, 2016)。PER2::Luc ノックインマウスを用いた研究からは、大腿骨頭や成長軟骨板、関節軟骨に体内時計が存在していることが明らかになった(Okubo et al., PLoS One, 2013)。しかしながら、これまで軟骨の時計の普遍性や成長過程による変化について言及はなされて来なかった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、軟骨の体内時計の普遍性と成長に伴う変化について検討した。このために、ラットの軟骨を器官培養し、表現型を解析した。また、ラットの体内時計機構の発振を減弱させることを目的とし、時計遺伝子 BMAL1 のドミナントネガティブ体を強制発現する遺伝子改変ラット [BMAL1 DN (+) TG ラット] を開発し、軟骨の時計に関する検討を加えた。さらに、このラットを用い、日齢を追ったサンプルを観察して、軟骨の発達と体内時計との関係を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胎仔由来線維芽細胞

PER2::Luc ノックインマウスおよび Per2-dLuc TG ラットから、常法に従い、胎仔由来線維芽細胞を作成した。動物を交配してプラグを確認し、母体から胎生 13.5 日(マウス)もしくは 14.5 日(ラット)の胎仔を回収、頭部・尾部・内蔵・肢芽を除去して細切し、トリプシン処理の後増殖培地(DMEM/10%FBS)中に懸濁し、培養皿に播種した。継代の後、デキサメタゾン刺激により概日リズムを誘発した上で発光測定装置にセットし、リズム観察を行った。

#### (2) 器官培養と発光リズム測定

Per2-dLuc TG ラットから、種々の組織を採取し、HEPES 含有 DMEM 培地に B-27 サプリメント、抗生剤と発光基質(ルシフェリン)を添加した培地中で器官培養しながら、発光リズムを観察した。椎間板の観察に際しては、椎骨とともに軟骨を摘出し、そのまま培地中で培養した。マクロイメージングは MultiVersa(ATTO 社)を用い、各組織における発光リズムの経時観察は LM300122(浜松ホトニクス社)および Kronos(ATTO 社)を用いた。

#### (3) 動物

実験には、PER2::Luc ノックインマウス、Per2-dLuc TG ラット、および新たに開発した BMAL1 DN (+) TG ラットを用いた。BMAL1 DN (+) TG ラットは、Per2-dLuc TG ラットにマウスプリオン遺伝子骨格を利用した転写調節カセットに組み込んだ *Bmal1* 変異体遺伝子を導入したトランスジェニックラットである。BMAL1 変異体はカルボキシル末端の一部を欠くことで転写活性を失い、正常な BMAL1 の機能を競合的に阻害するため、体内時計の出力が低減することが期待される。また、プリオン遺伝子骨格を利用した転写調節カセット(MoPrP.Xhol)はマウスで神経特異的な導入遺伝子の発現を達成するために用いられている。実験は、近畿大学実験動物委員会の承諾を得て遂行し、実施に際しては施設の定める指針に従った。

### 4. 研究成果

#### (1) PER2::Luc ノックインマウスと Per2-dLuc TG ラットの比較

これまでヒト組織やラット組織において、軟骨の体内時計の存在は知られてきた(Honda et al. J Biochem, 2013; Dudek et al., J Clin Invest, 2016)。しかしながら、研究手法の制限があり、ラットでは同一組織で経時的な変化を捉えることは達成されていなかった。ここで、Per2-dLuc TG ラットを用いれば、器官培養下の発光リズムを追跡することが可能であり、軟骨の体内時計の自律振動能を示すことができるため、これに取り組んだ。

Per2-dLuc レポーター遺伝子を用いた系では Per2 mRNA の挙動を、PER2::Luc 融合タンパク質を用いた系では PER2 タンパク質の挙動をモニターする。このため PER2::Luc ノックインマウス由来の組織と Per2-dLuc TG ラット由来の組織の観察では、観察対象のレベルが異なることになる。両者の違いについて把握するために、胎児由来線維芽細胞を作成して、比較した(図1)。その結果、いずれの場合でも明瞭な概日振動を観察したが、ラット胎児由来線維芽細胞では、マウス胎児由来線維芽細胞と比べ、数時間早く発光リズムのピークが観察された。これは、PER2 タンパク質の発現ピークが *Per2* mRNA よりも 4 時間程度遅いためであると考えられた。

レポーター遺伝子の違いのため、組織における概日振動子(体内時計)の有無についての検討は可能であるが位相の種差や振幅の比較などは検討困難であると考え、以降の実験はラットの

みに注目した。

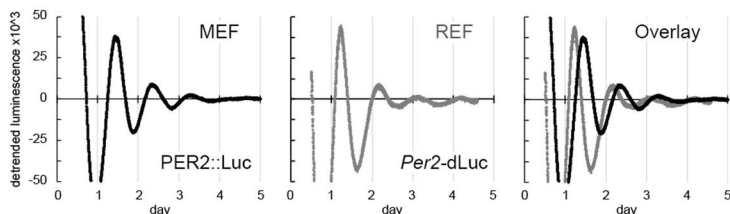


図1 . マウス (MEF, 左) およびラット胎児由来線維芽細胞 (REF, 中) の発光リズム。重ね合わせることで、位相にずれがあることを示した (右)。

(2) Per2-dLuc TG ラット由来軟骨組織の器官培養

Per2-dLuc TG ラットの大腿骨の器官培養を行ったところ、培養下で明瞭な概日リズムを観察した (図2)。また、発光イメージングを行った結果、PER2::Luc ノックインマウスで観察したと同様に、骨端軟骨、大腿骨頭部、関節部に強いシグナルを観察した。これらの結果は、ラットでも軟骨に体内時計が存在することを支持していた。Per2-dLuc ラットの剣状突起、耳介軟骨、椎間板の器官培養を行ったところ、いずれのサンプルでも発光の概日リズムを認めた。これらの結果は、硝子軟骨、弾性軟骨、線維軟骨のいずれにも概日時計が自律振動して存在することを支持した (図2)。

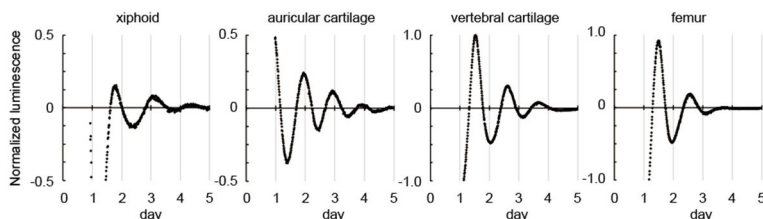


図2 . 器官培養下の、剣状突起 (左)、耳介軟骨 (中左)、椎間板 (中右)、大腿骨 (右) の発光リズム。いずれの組織でも発光に概日リズムが認められた。

(3) BMAL1 DN(+) TG ラット

これまでラットでは、時計遺伝子を機能障害する遺伝子改変モデル動物の開発はなされていなかった。そこで、*Bmal1* 変異遺伝子をマウスプリオン遺伝子由来する転写調節領域によって発現制御させた導入遺伝子を構築し、Per2-dLuc TG ラットに導入して表現型を観察した。この結果、作出した BMAL1 DN (+) TG ラットは行動リズムの振幅が低下しており、また視交叉上核の発振も減弱していた。しかし、行動レベルでも遺伝子レベルでも、周期長 (1 日の長さ) や位相に有意な変化は観察されなかった。

導入遺伝子は神経特異的に発現することが期待されたが、逆転写 PCR 法によって、少なくとも RNA レベルでは軟骨にも発現することが確認された。そこで、椎間板・椎間軟骨を採取し、発光リズムを検討した。事前検討から、PER2::Luc ノックインマウスでは、椎骨を椎間板・椎間軟骨が付着したまま採取して器官培養すると、軟骨部にのみ明瞭な概日振動が持続的に観察できることが確認されていた。導入遺伝子を持たないコントロールラットで、椎間板の培養を行った場合、振動の減弱が激しいものの明瞭な概日リズムを観察することができた。BMAL1 DN (+) TG ラットでも同様の発光概日リズムを検出した。振幅はやや減弱したものの、有意差は見られなかった。周期、位相にも統計的有意差は見られなかった。

(4) 発達過程を追った検討

より詳細な検討を加えるため、生後 0 日目、7 日目、および若齢のコントロール [BMAL1 DN (-)] ラットおよび BMAL1 DN (+) TG ラットから組織を採取して器官培養し、椎間板の発達過程による体内時計の変化を検討した (図3,4)。

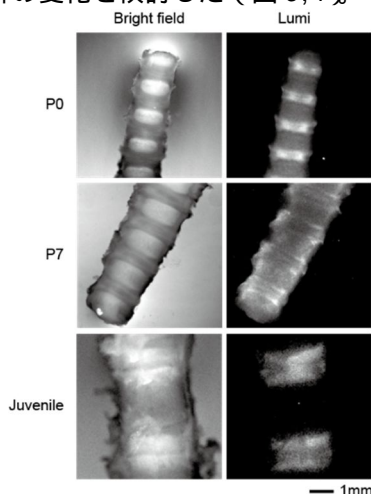
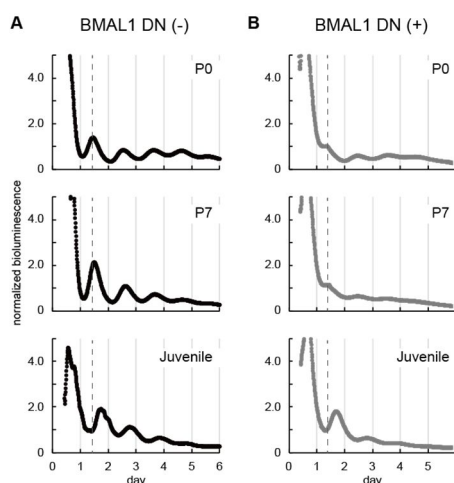


図3 . Per2-dLuc TG ラットから採取した組織の顕微鏡像。生後 0 日目 (P0, 上)、生後 7 日目 (P7, 中)、若齢 (juvenile, 下) の Per2-dLuc TG ラットから、椎骨が連なった状態でサンプルを採取し、明視野像 (左) および発光象 (右) を観察した。時計遺伝子の発現を示す発光は、どの発達段階においても椎間板に明瞭に観察された (右)。

コントロールラットにおいて、生後0日目、7日目のラットから採取した椎間板は明瞭な概日リズムを示したが、若齢では振動の減衰が大きかった。BMAL1 DN (+) TG ラットでも同様の傾向が観察されたが、生後0日目、7日目では野生型より振幅が下がっていた(図4)。興味深いことに、発達に伴い概日リズムの位相が遅くなった(図4)。すでに、Per2-dLuc TG ラットの様々な組織を器官培養し、発達過程を追って求めた論文が報告されており(Nishide et al., Am J Physiol. 2014)。今回の結果はそこでみられた末梢時計の位相変化と類似していた。この傾向は、コントロールでも BMAL1 DN (+) TG ラットでも同様に見られた。このことは、時計機構そのものの発達により位相が変位するというよりは、軟骨分化に伴った変化であることを示唆している。あるいは、位相遅れを導く原因は、内分泌器官の発達であるかもしれない。すでに副甲状腺ホルモンにより軟骨の時計が位相変位すること、グルココルチコイドによって位相変位することが知られている。発達に伴う概日時計の位相遅れについて、さらに検討を進めたい。



**図4** .発達に伴う発光リズムの変化。器官培養下で変異型 BMAL1 を持たないラット [BMAL1 DN(-)] では、生後0日目(P0)、7日目(P7)、若齢(juvenile)のいずれから採取したサンプルでも、椎間板由来の発光リズムが観察された(左)。変異型 BMAL1 をもつラット [BMAL1 DN(+)] でも同様であったが、振幅が低下していた(右)。いずれの遺伝子型においても、発達に伴い概日リズムの位相が後ろにずれていた(破線: P0のピーク位相)。

#### <引用文献>

- Yang N, Meng QJ, "Circadian Clocks in Articular Cartilage and Bone: A Compass in the Sea of Matrices." J Biol Rhythms, 31(5):415-27, 2016
- Okubo N, Minami Y, Fujiwara H et al., "Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse Ex Vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular Cartilages and Growth Plates." PLoS One, 8(11):e78306, 2013
- Honda K, Kawamoto T, Ueda HR et al., "Different Circadian Expression of Major Matrix-Related Genes in Various Types of Cartilage: Modulation by Light-Dark Conditions." J Biochem. 154(4):373-381, 2013
- Dudek M, Gossan N, Ynag N et al., "The chondrocyte clock gene Bmal1 controls cartilage homeostasis and integrity." J Clin Invest. 126(1): 365-376, 2016
- Nishide S, Hashimoto K, Nishio T et al., "Organ-specific development characterizes circadian clock gene Per2 expression in rats." Am J Physiol. 306(1):R67-74. 2014

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inokawa Hitoshi, Uemura Yasuhiro, Shimba Akihiro, Kawakami Eiryō, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Ohashi Munehiro, Minami Yoichi, Cui Guangwei, Asahi Takuma, Ono Ryutaro, Sasawaki Yuh, Konishi Eiichi, Yoo Seung-Hee, Chen Zheng, Teramukai Satoshi, Ikuta Koichi, Yagita Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59541-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takemura Shoko, Nagano Mamoru, Isonishi Ayami, Tanaka Tatsuhide, Tatsumi Kouko, Yamano Mariko, Minami Yoichi, Shigeyoshi Yasufumi, Wanaka Akio	4. 巻 727
2. 論文標題 Circadian rhythms of sorting nexin 25 in the mouse suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134897 ~ 134897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.134897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano Mamoru, Ikegami Keisuke, Minami Yoichi, Kanazawa Yuji, Koinuma Satoshi, Sujino Mitsugu, Shigeyoshi Yasufumi	4. 巻 1714
2. 論文標題 Slow shift of dead zone after an abrupt shift of the light-dark cycle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 73 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.02.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minami Y, Ohashi M, Hotta E, Hisatomi M, Okada N, Konishi E, Teramukai S, Inokawa H, Yagita K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Chronic inflammation in mice exposed to the long-term un-entrainable light-dark cycles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sleep Biol Rhythm	6. 最初と最後の頁 63-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s41105-017-0127-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南陽一、吉川朋子、長野護、鯉沼聡、池上啓介、藤岡厚子、重吉康史
2. 発表標題 新規体内時計異常モデルの開発を企図した遺伝子改変ラットの作出
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi Minami, Tomoko Yoshikawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Kesuke Ikegami, Atsuko Fujioka, Keiichi Furukawa, Yasufumi Shigeyoshi
2. 発表標題 Generation of a genetically modified rat overexpressing BMAL1 dominant negative form
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南陽一、大橋宗洋、八木田和弘
2. 発表標題 長期クロニックジェットラグ条件に曝露したマウスの継続的観察：概日リズムのマウスコホート研究の試み
3. 学会等名 第24回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----