

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：34419
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790234
 研究課題名（和文） 哺乳類中枢時計特異的な入力機構の解析－視交叉上核スライス培養を用いた検討－
 研究課題名（英文） Analysis of input signal specific to mammalian circadian center
 研究代表者
 鯉沼 聡（KOINUMA SATOSHI）
 近畿大学・医学部・助教
 研究者番号：10340770

研究成果の概要（和文）：

哺乳類概日リズムの中枢である視交叉上核から組織切片を作製し、視交叉上核サブ領域間の同期シグナルを化学的および物理的な手法を用いて阻害した。その結果、視交叉上核背側の最内側領域に周期の短い細胞集団が、また長い周期をもつ細胞集団が外側領域にそれぞれ存在していることが明らかになった。短周期領域は視交叉上核で観察される位相波の起点領域とオーバーラップしていることから、これまで不明であった位相波の役割の解明につながる成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

In order to investigate signals transmitted in the suprachiasmatic nucleus (SCN), perturbation of cAMP signal by chronic administration of Forskolin (FK) to Per2::Luc rat SCN slice was performed. Administration of FK divided the SCN into two regions based on the period length. One of which showed shorter period than 24 h (SPR) and another showed longer than 24 h (LPR). SPR was localized in the medial region of the dorsal SCN and LPR localized in the lateral region, respectively. Intriguingly, the SPR and a region where phase wave starts were overlapped. These results suggest that cAMP dependent signal is involved in the synchronization of the SCN subregions. Further study of SPR may lead to the understanding of unknown mechanisms and roles of the phase wave in the mammalian circadian center.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：生物時計

1. 研究開始当初の背景

生物に備わっている内因性リズムは、光による明暗（昼と夜）、運動など様々によって環境の24時間周期に同調する。このような外的刺激による同調は組織を構成する個々

の細胞に伝達され、さらに細胞内の情報伝達系を介し、転写フィードバックループが作るリズムの位相を同調させることにより達成される。この中で光はもっとも強い同調因子であり、哺乳類ではまず網膜を通して視床下

部に存在する視交叉上核腹外側部に刺激が伝わる。視交叉上核は生体の中枢時計として概日の周期でリズムを発振し、末梢のリズムはその制御を受けるといった階層構造を持っている。さらに、その視交叉上核も構成する細胞群によって領域性を持って階層構造を形成し、その階層の最も下位に位置する単一の神経細胞の段階ですでに概日リズムの振動を創出していることが示されている (Neuron, Welsh et al. 1995)。しかし、自律的なペースメーカーとして機能する細胞は一部であるため、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。サブ領域間においても背内側部の細胞は腹外側部の細胞からの信号を受け取ることで同期を果たしているように、階層に応じて位相を調節する情報伝達系が存在している。海外への長距離移動などで時差ボケが生じるのも腹外側部が明暗周期の変更に即座に反応した後に、腹外側部からのシグナルによって背内側部がゆっくりと新たな明暗周期へ適応するためであると考えられている (J. Neurosci. Nagano et al. 2003)。情報伝達を担う分子としては、神経ペプチドである AVP が背内側部で、VIP や GRP が腹外側部でそれぞれ陽性細胞が存在することが知られており、視交叉上核の約 8 割の神経細胞が GABA を含有していることから、これらが視交叉上核内の情報伝達に関与している可能性が示唆されている。しかし、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。

研究代表者らは視交叉上核の腹外側部と背内側部に限局して発現する受容体を網羅的に見出した。また、*in situ hybridization* を用いて検証を行うことにも成功した。受容体が視交叉上核の一部の領域に限局して存在することは、視交叉上核内部における局所的なシグナルのやりとりが存在することを示唆した。また、リガンドを発現する神経細胞から、受容体をもつ細胞に対して情報が一方向性に伝えられることを示している。すなわち、視交叉上核内部における情報伝達の分子をとらえ、かつ情報伝達の起点と終点を定めることができることから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。

細胞の位相応答の検討は以前から行っているが、それに加え今回導入した *Per2::luc* トランスジェニックラットを用いることによって、視交叉上核すべての階層で位相応答が検討できるようになった。このことにより、視交叉上核から末梢臓器、末梢の効果器にいたるすべての階層において位相応答を明らかにすることができる。本研究にラットを用いたのは、視交叉上核内部の構造、とくに機能的に分化している光受容部と非光受容部

が明瞭に別れているため、領域別に正確な情報を得られることによる。これを用いて位相反応曲線を求めることができる。

実際に *vpac2* のアゴニストである VIP について予備的な実験を行ったところ、背内側部では位相変位が観察されたが腹外側部では位相変位は生じないという結果を得た。しかし、末梢系において細胞種非依存的に光パルス型位相変位を生じるホルスコリンを作用させた際には背内側部と腹外側部は同様の位相変位を生じたことから VIP-VPAC2 による領域特異的な位相反応が生じたことが明らかになった。これをマイクロアレイによって総覧化した背内側・腹外側部特異的なシグナル経路を対象とした研究に拡張させることによって、階層間における位相差の起原を明らかにできると考えたのが本研究の着想に至った背景であった。

2. 研究の目的

哺乳類体内時計の中枢である視交叉上核は、安定した概日リズムを長期間発振する。視交叉上核は機能的に異なるサブ領域や個々の神経細胞までもがリズム発振するという階層的な構造をもっているが、この中で、外部からの入力刺激に対してそれぞれの位相関係を調節するような情報がどのような方向性を持って伝わり、出力されているのかを明らかにすることは、中枢時計の機能を理解する上で大きな課題になっている。本研究では領域特異的な入力応答を解析することでこの問題を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 視交叉上核サブ領域における位相反応

視交叉上核内部で発現する受容体に対するリガンドを作用させた際の位相反応を検索した。方法は、まず *Per2::luc* トランスジェニックラットから視交叉上核の前額断組織切片を作成し、背側領域、腹側領域に単離した後、微量光測定装置中で培養した。*Per2* の概日振動を安定した発光として確認した後、視交叉上核で領域性をもって発現する受容体に対するリガンド、VIP (100nM)、CGRP beta (20nM) を様々な位相において添加し、添加前後の位相を比較することで、位相反応を測定した。

(2) 視交叉上核における cAMP シグナル擾乱の影響

Per2::luc トランスジェニックラットの新生児視交叉上核の前額断組織切片を高感度冷却 CCD カメラで経時的に撮影し、さらに視交叉上核に外接する格子状の長方形を設定し、各区画における位相と周期を減衰 sin 波にフィッティングさせることで測定した。VIP や Calcitonin のシグナリングにおいて重

要な伝達物質である cAMP の合成酵素である アデニル酸シクラーゼを活性化するホルスコリンを継続的に作用させることで、cAMP シグナリングを恒常的に賦活化し、このシグナルの同期機構への影響を測定した。

4. 研究成果

(1) 視交叉上核サブ領域における位相反応
100nM VIP を視交叉上核背側領域切片と腹側領域切片にそれぞれ作用させたところ、背側領域においては最大 12 時間程度の位相前進/後退を生じ、タイプ 0 の光パルス型の位相反応を示した。一方、腹側領域に対する投与では明瞭な位相依存的な位相反応は示さなかった。同様に 20nM CGRP beta を背側領域、腹側領域それぞれに作用させたところ両者において位相反応に明確な位相依存性は観察されなかった。In situ hybridization による発現解析からは VIP mRNA とその受容体である Vpr2 mRNA の発現領域が腹外側部と背内側部に明確に局限していることを示しており、腹外側部から背内側部へ向かう情報に方向性が存在することを示唆したが、今回の実験結果からこの情報の方向性を位相反応の観点からも確認することができた。さらに、背内側部単独で観察された位相変位は腹外側部の存在下では抑えられていることから、視交叉上核の腹外側部が背内側部の位相を制御していることが示唆された。

(2) 視交叉上核における cAMP シグナル擾乱の影響

新生児 Per2::luc トランスジェニックラット視交叉上核の発光を測定し、視交叉上核を縦横 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、位相については視交叉上核背側部の最内側領域から外側方向に向かって位相の遅れが存在し、位相の波として観察された。Per2::luc の発光の頂値位相が内側から外側に伝播する速度を測定したところ位相波の速度は $47.1 \pm 4.6 \mu\text{m/h}$ (平均±SEM, n=6) であった。

次に、cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼ活性化剤である $10 \mu\text{M}$ ホルスコリンを培養液中に存在させた際の周期を各区画について測定したところ、視交叉上核背側領域の最内側部において 24 時間以下の周期を示す領域が存在した。また腹外側領域においては 24 時間以上を示す領域が存在することが明らかになった。この結果はホルスコリンによって視交叉上核内に非同期状態が生じ、内在の固有周期による概日振動が顕在化したことによると考えられた。ホルスコリンによる短周期領域と長周期領域の出現が非同期状態によるものか、或いはホルスコリンが

個々の細胞に作用した結果、周期が短縮されたのかを調べるために、ホルスコリン存在下における培養細胞 (Per2::luc C6 ラット・グリオーマ細胞) において周期の短縮が見られるかどうかについて検討した。その結果、ホルスコリンの添加・非添加による周期への影響は認められないことがわかった。視交叉上核にみられるような細胞間の強固な同期機構が存在しない培養細胞において周期の変化がみられなかったことから、ホルスコリン添加時に視交叉上核に現れる短周期・長周期領域は細胞間の非同期状態によるものと考えられた。このことを確かめるため、さらに短周期領域と長周期領域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測定した。Per2::luc 視交叉上核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 $23.72 \pm 0.22 \text{ h}$ (平均±SEM, n=9) であったのに対し、外側領域の周期は $24.55 \pm 0.25 \text{ h}$ (平均±SEM, n=9) 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 ($p=0.0095$)。

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およ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。

視交叉上核の神経細胞を解離した際、概日振動を示す個々の細胞は様々な周期を示すことがこれまでに報告されている。しかしながら、周期の異なる細胞集団が領域的に局限していることを示す研究はこれまでに無かった。今回、周期を基に視交叉上核を領域的に分割したことによって、今後これらのサブ領域がどのような役割を果たしているかを解明することが視交叉上核の同期機構の理解につながると考えられる。視交叉上核では背内側領域から外側に向かって時計遺伝子の発現が波状に伝播する位相波が観察される。今回明らかになった短周期領域と位相波の起点領域とが重複していることから、今後短周期領域の解析が未だ明らかにされていない位相波の生理学的な役割の解明にもつながると期待できる。

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 2 件)

①Sujino, 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 153 査読有 2277-2286 (2012)

② Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., Urasaki, A., Shigeyoshi, Y., Kawakami, K., Shimada, S., Takeda, J. and Uchiyama, Y.
Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro.
Proc Natl Sci USA. 107 査読有 3846-3851 (2010)

[学会発表] (計9件)

① 鯉沼聡、他
哺乳類体内時計中枢における領域的周期解析
第87回日本解剖学会近畿支部学術集会
2011年12月3日、兵庫県西宮市(兵庫医科大学西宮キャンパス)

② Asakawa, T., 他
Mathematical model of mammalian circadian center as a many-body system of the limit cycle oscillators
European Conference on Mathematical and Theoretical Biology - ECMTB 2011 - June 28 - July 2, 2011 (Kraków, Poland)

③ Shigeyoshi, Y., 他
The underlying mechanism that generate phase waves in the mammalian circadian center
The 3rd International conference on cognitive neurodynamics (ICCN2011)
2011年6/9-13 北海道 (Hilton Niseko Village)

④ Shigeyoshi, Y., 他
REGIONAL PERIOD DIFFERENCE THAT GENERATES A PHASE GRADIENT IN THE MAMMALIAN CIRCADIAN CENTER
3rd World congress of chronobiology
May 5-9, 2011 (Puebla, Mexico)

⑤ 鯉沼聡、他
視交叉上核組織切片培養における細胞間同期機構の解析
第17回日本時間生物学会学術大会
2010年11月21日、東京都新宿区(早稲田大学国際会議場)

⑥ 筋野貢、他

グルココルチコイド刺激による肝腎末梢時計の位相変化の違い
第17回日本時間生物学会学術大会
2010年11月21日、東京都新宿区(早稲田大学国際会議場)

⑦ 長野護、他
視交叉上核における領域間同期機構の探索—ペプチド産生細胞の働き—
第17回日本時間生物学会学術大会
2010年11月21日、東京都新宿区(早稲田大学国際会議場)

⑧ Asakawa, T., 他
Mathematical model of suprachiasmatic nucleus to describe the asymmetric resynchronization after an abrupt shift of the light: dark cycle
Neuroscience 2010 (San Diego)
November 13-17, 2010

⑨ Shigeyoshi, Y., 他
A mechanism coupling two major subregions of the mammalian central circadian pacemaker
Neuroscience 2010 (San Diego)
November 13-17, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯉沼聡 (KOINUMA SATOSHI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号: 10340770