

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860181

研究課題名(和文) 視交叉上核から室傍核領域への時刻情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Structures that deliver the circadian rhythm from the suprachiasmatic nucleus to neighboring brain regions

研究代表者

升本 宏平 (MASUMOTO, Kohei)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60580529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計の中核である視交叉上核がどのように室傍核領域に情報を伝えているのか検討するために、Per2::lucノックインマウスの脳組織片を用いた組織培養系において発光振動を測定した。同一組織片において視交叉上核と室傍核領域の発光振動は逆位相であった。室傍核領域のみを培養すると発光振動は数日で減衰消滅したが、視交叉上核と共培養すると室傍核領域に安定した発光振動が現れた。さらに回復した発光振動は視交叉上核の発光振動と逆位相であった。これらの所見は共培養によって視交叉上核と室傍核領域の概日リズムが同期したこと、また個体に存在する視交叉上核と周辺領域の同調に必要な情報伝達機構が再構成されたことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The suprachiasmatic nucleus (SCN) is the center of circadian clock. In order to delineate what biological structure transmits circadian rhythm to paraventricular nucleus (PVN) and subparaventricular zone (SPZ) from the SCN, we observed the coherence between the circadian rhythms in the SCN and PVN/SPZ by monitoring bioluminescence emitted from tissue slice from Per2::luc knock-in mice. In slices containing SCN and PVN/SPZ, the two regions showed antiphase circadian rhythm, in contrast, slices containing PVN/SPZ but not SCN showed a circadian rhythm which was damped after a few days. However, when the slice showing damped oscillation was co-cultured with the SCN slice, PVN/SPZ restored a stable circadian rhythm antiphase to that in the SCN. The findings suggest that the structure maintaining the coherence between the circadian oscillations in the SCN and PVN/SPZ was reconstructed.

研究分野：時間生物学

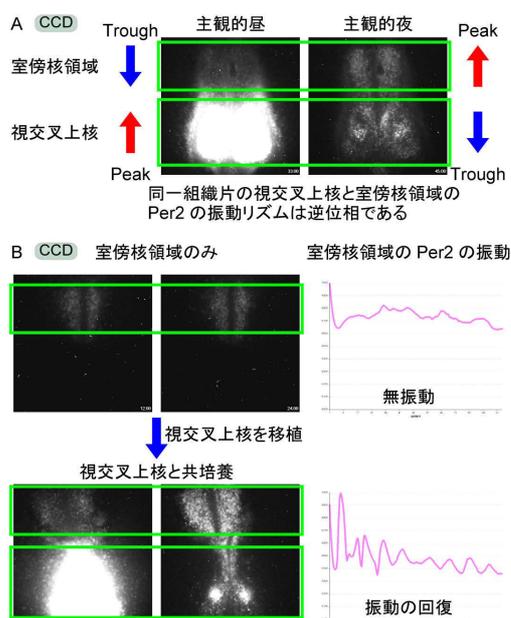
キーワード：体内時計 視交叉上核 室傍核 組織培養

1. 研究開始当初の背景

約 24 時間周期で振動する体内時計の中樞は脳内視床下部の視床下部である。そのため行動や睡眠・覚醒、体温、血圧等の生理現象の周期は視交叉上核が破壊されると消失する。様々な生理現象の周期性は、視交叉上核で刻まれた時刻情報が生理機能を司る脳領域へ伝わり、視交叉上核と各脳領域の時計が同調することで維持されている。しかしながら、視交叉上核の時刻情報がどの様に各脳領域に伝わりどの様に時計を制御しているのか未だ解明されていない。

室傍核領域（室傍核と室傍核下部領域を含む領域）は視交叉上核の背側部に隣接し (Fig.1A)、視交叉上核からの投射が存在する。また視交叉上核からの投射が存在する領域の多くは室傍核領域を経由する。そのため室傍核領域は視交叉上核からの情報を調節していると考えられる。実際、室傍核下部領域を破壊すると行動リズムは減衰する (Lu et al. J Neurosci. 2001, 21(13):4864-74)。これらのことから視交叉上核がどの様に各脳領域の時計を制御しているのかを解明するには、まず視交叉上核がどの様に室傍核領域の時計を制御しているか明らかにすることが必要であると申請者は考えた。

そこで、視交叉上核がどの様に室傍核領域に時刻情報を伝えているのか検討するために、Per2::luc ノックインマウスの脳組織片を用いた組織培養系において発光振動を測定した。その結果、室傍核領域の単独培養では Per2 の発光振動は数日で減衰消失したが、視交叉上核を移植して共培養すると、室傍核領域で安定した Per2 の発光振動の回復が確認できた (Fig.1B)。おもしろいことに室傍核領域で回復した Per2 の振動は、同一組織片における室傍核領域と視交叉上核の位相関係と同じく、視交叉上核と逆位相であった。こ



室傍核領域単独では Per2 の振動を示さないが、視交叉上核を移植して共培養すると室傍核領域は視交叉上核と逆位相で振動を示すようになる

Fig.1 研究背景

れは移植後に再構成された時刻情報伝達機構が通常と同じであることを意味し、時刻情報伝達機構の再現に成功したといえる。この実験系は、視交叉上核から他の脳領域への時刻情報伝達機構を解明するために、一度出力領域と入力領域を分離した後に再構成を可能とした初めての系である。この系を詳細に解析することにより、視交叉上核から他の脳領域への時刻情報伝達機構が明らかになるはずである。

2. 研究の目的

哺乳類において、体内時計の中樞は視交叉上核である。しかしながら視交叉上核の時刻情報がどの様に周辺脳領域に伝わり、脳領域の時計を制御しているのか未だ明らかにされていない。申請者は組織培養下における視交叉上核と室傍核領域の時計遺伝子の振動を、発光測定系を用いることで同時に測定することを可能とした。さらに申請者は室傍核領域の単独培養では時計遺伝子の振動は消失するが、そこに視交叉上核を移植して共培養することで室傍核領域の振動が回復することに成功した。そこで本研究では申請者が開発したこの技術を用いて、視交叉上核がどの様に室傍核領域の時計を制御しているのか明らかにする。

まず視交叉上核から室傍核領域への時刻情報伝達機構が液性因子か物理的要因であるか明らかにする。その結果が液性因子の場合、時刻情報伝達物質の探索と同定を行う。物理的要因の場合は、グリア細胞増殖によるギャップ結合の関与、接触による電気シグナルの伝達の可能は否定できないのでこれらも考慮して研究を進める。

申請者が開発した組織移植培養は、時刻情報伝達機構の入力系と出力系を分離後、再構成を可能としたものである。この実験系の解析、応用により、視交叉上核がどの様に生理機能を司る脳領域の時計を制御し、周期的な生理現象を引き起こしているのかという未だ解明されていない問題の解決へと繋がる。

3. 研究の方法

視交叉上核による室傍核領域への概日振動制御機構を解明すべく、時計遺伝子 Per2 のプロモータにルシフェラーゼを連結した Per2::luc ノックインマウスの脳組織片を用いた組織培養系において発光振動を測定した。発光振動の測定には CCD カメラ、微弱発光測定装置 (PMT) を用いた。

(1) 時刻情報伝達機構が液性因子依存か物理的要因依存であるか明らかにする

視交叉上核共培養による室傍核領域の Per2 の振動回復には、液性因子または組織間の接触を伴う物理的要因が考えられる。そこでどちらが時刻情報伝達機構に重要であるか明らかにするために、組織移植時に室傍核領域と視交叉上核間に透析膜を挟み、物理的

接触を阻害した状態で共培養した。透析膜は室傍核領域と視交叉上核間で液性因子は通過させるが物理的接触は阻害させる。室傍核領域には視交叉上核からの液性因子しか伝わらなくなり、Per2の振動回復を観察することで液性因子、物理的要因のどちらが重要であるか明らかにした。

(2) 物理的要因の検証

上記(1)の結果、物理的要因が重要であることが明らかとなった。そこで物理的要因の何が伝達機構に重要であるか明らかにすることにした。

① 神経連絡阻害

視交叉上核から軸索が伸長し、室傍核領域で神経結合を再構成している可能性が考えられた。そこで移植した視交叉上核から軸索が伸長しないように、スライス作製後、2週間経過した視交叉上核組織片を室傍核領域と共培養して振動の回復を観察した。

振動測定終了後、測定に用いた組織片に対して、神経細胞マーカーである NF-L、グリア細胞マーカーである GFAP の各抗体を用いて免疫染色を行った。

② 電気シグナルの関与検証

組織片の接触により視交叉上核からの電気シグナルが時刻情報を伝達する可能性が考えられた。そこで多平面電極システムを用いて室傍核領域の電気活動を測定した。

4. 研究成果

(1) 時刻情報伝達機構が液性因子依存か物理的要因依存であるか明らかにする

室傍核領域のみを培養すると Per2 の発光振動は数日で減衰消滅したが、視交叉上核と隣接して共培養すると室傍核領域に安定した発光振動が現れた。この回復した発光振動

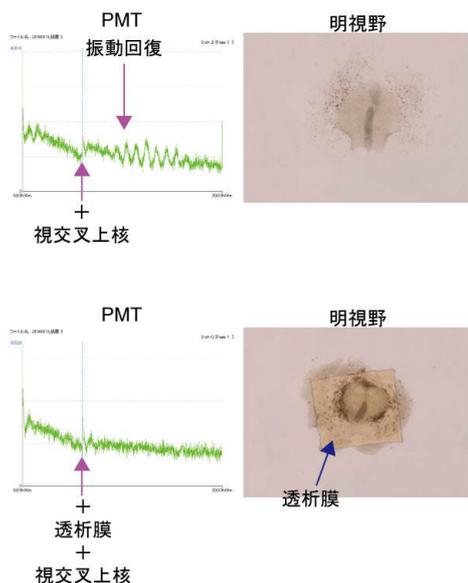


Fig.2 透析膜による液性因子阻害

は視交叉上核と逆位相であった。この室傍核領域での振動回復には、液性因子または組織間の接触を伴う物理的要因のどちらが重要であるか明らかにするために、組織移植時に室傍核領域と視交叉上核間に透析膜を挟み、物理的接触を阻害した状態で共培養した。その結果、共培養 2 週間経過しても振動は回復しなかった。この結果は視交叉上核による室傍核領域への概日振動制御機構には液性因子ではなく神経連絡が重要であることを示唆する(Fig.2)。

(2) 物理的要因の検証

上記(1)の結果、物理的要因が重要であることが明らかとなった。そこで物理的要因の何が時刻情報伝達機構に重要であるか明らかにすることにした。

① 神経連絡阻害

視交叉上核共培養により室傍核領域の振動が回復した時、どのような物理的要因が再構成されているのか確認するために、振動が回復したスライスに対して免疫染色を行った。抗体は神経細胞マーカーの NF-L、グリア細胞マーカーの GFAP を用いた。その結果、視交叉上核と室傍核領域の間はグリア細胞で埋め尽くされていたこと、また視交叉上核から室傍核領域へ、軸索が伸長していることが確認できた(Fig.3)。

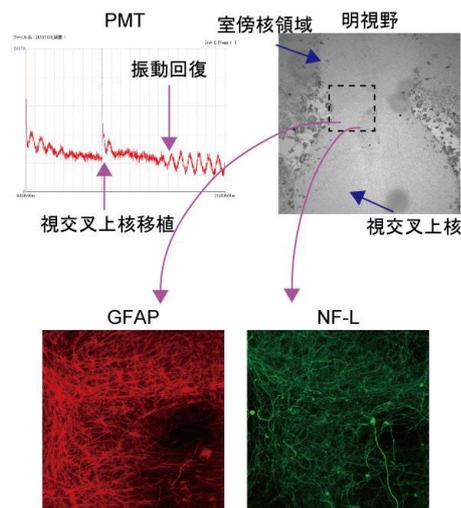


Fig.3 発光振動回復と軸索伸長

この結果より、視交叉上核から室傍核領域への時刻情報伝達には軸索伸長が重要であると考えた。そこで軸索の伸長を阻害した時に、室傍核領域の振動が回復するか確認することにした。

視交叉上核スライスの軸索伸長を阻害するために、スライス作製後 2 週間培養した。そして培養後 2 週間経過した視交叉上核スライスを共培養に用いた。この視交叉上核スライスは、軸索伸長能は消失しているが強い発光振動を確認できるものであった。その結果、

共培養後2週間経過しても室傍核領域の振動は回復しなかった。またこの組織片に対して、NF-L抗体、GFAP抗体を用いて免疫染色を行った結果、視交叉上核から室傍核領域への軸索伸長を確認することはできなかった(Fig.4)。

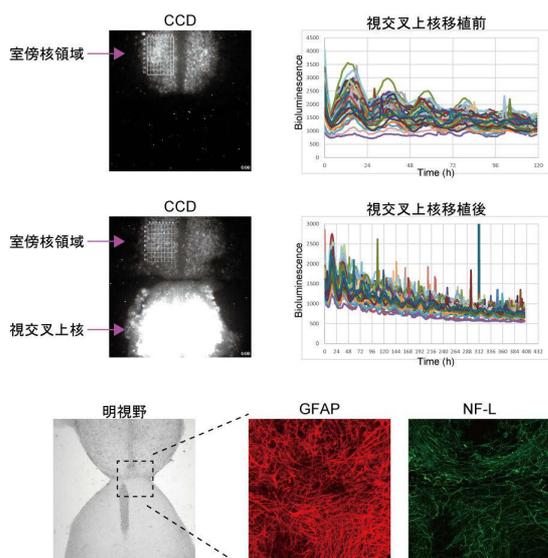


Fig.4 軸索伸長阻害により振動回復阻害

② 電気シグナルの関与検証

時刻情報伝達機構における電気シグナルの関与を検証するために、多平面電極上で室傍核領域組織片を培養し、そこへ視交叉上核組織片を移植して共培養を行った。その結果、発光振動と同様に、室傍核領域と視交叉上核の電気活動の振動は逆位相であった。このことは電気活動及び時計遺伝子振動に対して同様の機構によって時刻情報の伝達が行われている可能性を示唆している。

発光振動の回復には日数を必要とすることから、直接的に接触して伝達する電気シグナルの関与は低いと考えられた。また、測定システム的に視交叉上核移植前後の長期測定が困難であった。これらのことにより方針を修正し、発光振動系で時刻情報伝達物質が同定できた後、検証を行える実験系の構築を行った。

これらの結果より、視交叉上核から室傍核領域への時刻情報伝達には神経連絡を介する必要がある、液性因子だけでは不十分であることが示唆された。この結果は、液性因子が重要であるとする視交叉上核間のネットワークとは異なる。つまり、時刻情報の伝達は視交叉上核内と視交叉上核外では異なる機構で行っていることを示唆している。

今後は時刻情報伝達を行う物質の同定を行うために、薬剤や遺伝子改変動物を用いた実験を行う予定である。

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 4件)

- ① Akihito A. Adachi, Atsuko Fujioka, Mamoru Nagano, Koh-hei Masumoto, Toru Takumi, Takashi Yoshimura, Shizufumi Ebihara, Kentaro Mori, Yoshifumi Yokota, Yasufumi Shigeyoshi
Helix-loop-helix Protein Id2 Stabilizes Mammalian Circadian Oscillation Under Constant Light Conditions. *Zoolog Sci.* 査読有、Vol. 30, No. 12, 2013, pp. 1011-8. DOI: 10.2108/zsj.30.1011.
- ② Satoshi Koinuma, Takeshi Asakawa, Mamoru Nagano, Keiichi Furukawa, Mitsugu Sujino, Koh-hei Masumoto, Yoshihiro Nakajima, Seiichi Hashimoto, Kazuhiro Yagita, Yasufumi Shigeyoshi
Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center. *Eur J Neurosci.* 査読有、Vol. 38, No. 6, 2013, pp. 2832-41. DOI: 10.1111/ejn.12308.
- ③ Kaori Tsujino, Ryohei Narumi, Koh-hei Masumoto, Etsuo A. Susaki, Yuta Shinohara, Takaya Abe, Masayuki Iigo, Atsushi Wada, Mamoru Nagano, Yasufumi Shigeyoshi, Hiroki R. Ueda
Establishment of TSH β real-time monitoring system in mammalian photoperiodism. *Genes Cells.* 査読有、Vol. 18, No. 7, 2013, pp. 575-88. DOI: 10.1111/gtc.12063.
- ④ Yukihiro Hamada, Kazumasa Saigoh, Koh-hei Masumoto, Mamoru Nagano, Susumu Kusunoki, Yasufumi Shigeyoshi
Circadian expression and specific localization of a sialyltransferase gene in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Letters.* 査読有、Vol. 535, 2013, pp. 12-17. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.032

[学会発表] (計 3件)

- ① Koh-hei Masumoto
Structures that deliver the circadian rhythm from the suprachiasmatic nucleus to neighboring brain regions
第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、第92回日本生理学会大会 合同大会
2015年3月22日

- 神戸国際会議場・展示場（兵庫県神戸市）
- ② 升本宏平
Reproduction of the structure for the coherence between suprachiasmatic nucleus and other neighboring brain regions
第 21 回日本時間生物学会学術大会
2014 年 11 月 8 日
九州大学医学部百年行動（福岡県福岡市）
- ③ 升本宏平
視交叉上核と室傍核領域間の同調機構
第 20 回日本時間生物学会学術大会
2013 年 11 月 9 日
近畿大学東大阪キャンパス（大阪府東大阪市）

〔図書〕（計 1 件）

- ① Yasufumi Shigeyoshi, Takeshi Asakawa, Koh-hei Masumoto, Satoshi Koinuma and Mamoru Nagano
北海道大学出版会、Mechanism and Modeling of Circadian Phase Wave in the Mammalian Circadian Center (Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN), 2014, 198(51-67)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

升本 宏平 (Masumoto, Kohei)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：60580529