

# 博士論文概要

## 論文題目

末梢組織における体内時計制御機構の解明  
Investigation of the regulation of circadian  
clock system in mouse peripheral tissues

申請者

田原	優
Yu	TAHARA

電気・情報生命専攻 薬理学研究

2012年12月

(受理申請する部科主任会開催年月を記入)

本論文は五章で構成される。第一章は序論であり、体内時計、末梢時計、食餌

同調、体内時計と疾患の関連についてこれまでの研究報告に基づいて詳述する。更に、本研究の背景と概要について述べ、当該分野における本論文の意義を示す。第二章は末梢時計の食餌同調経路について、第三章は新しい体内時計測定法の開発と応用について、第四章は認知症を伴うリズム異常マウスにおける食餌制限の効果検討について報告する。

体内時計とは、生物に備わっている時を刻む仕組みであり、単細胞生物から哺乳類まで幅広い生物において現代まで保存されてきた機能である。我々は時計の無い暗室で生活していても、約24時間の周期で睡眠—覚醒を繰り返す事が出来る。睡眠—覚醒のリズムだけではなく、我々は体温、ホルモン分泌、代謝など様々な生理現象に24時間のリズム性を持っている。また、アレルギー性疾患は夜間に起こりやすく、心筋梗塞は午前中に起こりやすい、など疾患の症状にも時間依存的な変化が見受けられる。これらの生理現象は、哺乳類においては、脳の視床下部にある視交叉上核 (**Suprachiasmatic nucleus, SCN**) が体内時計の中核として制御している事で表出していることが分かっている。つまり、SCNは外界の光情報を、視神経を通して目から受容し、その情報を液性因子や交感・副交感神経系、または摂食リズムなどを制御する事で体全体に伝えている。時を刻むメカニズムは、あらゆる組織に発現する時計遺伝子群が刻む24時間周期のリズムによって起こる。哺乳類の時計遺伝子群で中核を担っているのは、*Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry* である。これらは転写—翻訳のフィードバックループを構成しており、正の転写因子である **CLOCK/BMAL1** がプロモーター領域にある **E-box** に結合し、負の転写因子である *Per*, *Cry* の転写を活性化する。転写された *Per*, *Cry* は細胞質で **PER/CRY** の複合体を形成し、核内に戻り、**CLOCK/BMAL1** を抑制し *Per*, *Cry* の転写を抑制する。結果、*Per*, *Cry* は24時間周期でRNA量、タンパク質量にリズムが生じるのである。同時に、プロモーター領域に **E-box** を持つ遺伝子もまた **CLOCK/BMAL1** によるリズムミミックな制御を受けており、約10%の遺伝子のRNA量に日内変動があることが報告されている。

末梢組織の体内時計（末梢時計）は、光環境に同調した **SCN** の制御と共に、食事による制御も強く受ける。夜行性のマウスの給餌時刻を昼間の一定時間に制限する事（制限給餌）により、末梢時計（時計遺伝子発現リズム）の位相がその食餌時刻に同調する事が分かっている。また、食餌時刻に同調した時計遺伝子群は、時計遺伝子の下流遺伝子である代謝関連遺伝子の発現リズムを、食餌時間に同調させることで代謝機能を最大限に活用できるように制御する。視交叉上核以外の脳部位、肝臓、腎臓、心臓などほぼ全ての臓器に発現している時計遺伝子の発現リズムは、制限給餌により給餌時刻に同調する事が分かっている。また、肝臓におけるその同調はとても早く、制限給餌開始2-3日後には食餌時間に同調し

#### No.1

た位相に変化する。しかし食餌による末梢時計の同調メカニズムは不明な部分が

多い。光同調を統括する SCN のような食餌同調を統括する脳組織はまだ見つかっておらず、時間制限された食餌情報がいかに末梢時計の時刻を変更するのかは全く未知である。そこで本研究では、食餌による末梢時計の入力経路、異なる食餌パターンによる末梢時計の位相変化の規則性を調べる事で、末梢時計と食餌の関係のさらなる理解に挑戦した。具体的には、体内時計が昼間の食餌によって位相変化する際の、肝臓時計遺伝子発現を網羅的に調べた。その結果、食餌により *Per2*, *Rev-erba* が食後のインスリン分泌依存的にそれぞれ発現増加、減少することにより、発現リズムの位相を変化させる事が分かった。また、細胞を用いた研究においてもインスリンは直接時計遺伝子に作用し、急激に遺伝子発現を変化させる事がリズムの位相変化に繋がる事を証明できた。この作用を考慮した例として、インスリン作用を増強する食餌はより強い同調効果を示す事が当研究室のその後の実験で明らかになった。今後、さらなるインスリン作用に注目した食事内容の探究を行っていく予定である。

マウスの体内時計、特に組織の時計遺伝子発現リズムを測定する方法は数種類ある。直接的な測定方法は、時刻別に 3 - 6 時間間隔で採取した臓器の RNA、タンパク質量を測定し、複数のマウスから一つの発現リズムのデータを作る方法である。間接的な方法としては、時計遺伝子のプロモーターを持つホタル・*Luciferase* 遺伝子をトランスジェニックした、あるいはノックインしたマウスを用いて、臓器を培養・長期発光モニタリングすることで評価することができる。つまり *in vivo* での時計遺伝子発現リズムを *in vitro* で継続させて、それを発光としてモニタリングし、その位相を評価する方法である。しかしそれぞれの方法で欠点はある。直接的な方法は、複数のマウス個体が必要な事、また得られたデータは複数個体を統合したデータであり一個体のデータが得られないことが挙げられる。間接的な方法は *in vitro* という特殊環境において *in vivo* のデータを反映しない可能性がある事が挙げられる。そこで本研究では、新たに *in vivo* で一個体のマウスの末梢時計を観測する方法を開発した。CCD カメラを搭載した *In vivo imaging system* (Caliper 社) と *PER2::LUCIFERASE knock-in* マウスを用いて、麻酔下で 4 時間おきにマウスにルシフェリン (発光基質) を投与し生体内内の発光リズムを観測した。発光は腎臓、肝臓、顎下腺から測定出来た。測定結果はとても安定、かつ正確であり、また殺さずに測定できるので動物倫理的にも良い測定法であった。それを用いて、今まで評価出来なかった実験条件で末梢時計を評価する事ができた。SCN 破壊マウスの末梢時計計測、食パターンの変化による末梢時計の変化を測定した。具体的には SCN を破壊した状態での末梢時計を調べた。電極を用いた手術により SCN を破壊したマウスは、行動リズムが無くなり、前述した RNA 発現リズム等での評価は個々のマウスのリズムの位相

## No.2

が違う可能性が有り有効ではない。また、臓器の培養による測定も、臓器摘出時

の刺激が時計をリセットしてしまう恐れがあった。今回開発した手法は生きたマウスを用いて直接時計遺伝子発現リズムを測定する方法であり、今までの懸念を排除する事ができた。他の応用として食パターンと末梢時計の位相について調べた。先行研究では一般的に昼間に食餌時間を設定しているが、夜間の食餌パターンの変化にどのように末梢時計が位相同調するかはあまりよく分かっていなかった。そこで、ヒトの食パターンに近づけたスケジュールをマウスに強制した場合の末梢時計の位相を調べた。結果、末梢時計は食餌タイミングの間隔に敏感に反応する事が分かった。つまり長い期間空いた後の食餌に、より強い同調能力がある事が分かった。また、日常の生活を考慮して夕食の時間のみを19時から22、23時とずらしていった結果、末梢時計は昼食と夕食の間隔が大きくなり、夕食に強く同調する事が分かった。通常は朝食に強い同調効果があったのが、遅い夕食によりそちらに引っ張られる事が分かり、この結果は遅い夕食により太る原因になっているのではと考察した。

認知症の患者の多くは、睡眠障害の問題を抱えている。認知症のひとつであるハンチントン病の患者、またはハンチントン病モデルマウスにおいて、睡眠—覚醒リズムの乱れが報告されている。また、このマウスの SCN における神経発火リズムの乱れも報告されており、体内時計中枢の機能低下の可能性が示唆されている。そこで本研究では、食餌による体内時計の刺激・同調・改善をハンチントン病モデルマウスに施すことにより、ハンチントン病の睡眠リズムの乱れ、または病態進行の予防の可能性を検討した。具体的にはヒト *Huntingtin* 遺伝子に CAG リピートを 97 リピート挿入したものをトランスジェニックした BACHD マウスを用いた。行動リズムをエリアセンサーで測定、運動機能の評価は Rotarod 試験、Challenging beam 試験を用いた。食餌制限は、マウスの活動期である夜間の6時間に行った。結果、食餌時間の制御により、行動リズムの昼夜差が改善され、運動機能も有意に改善した。また、このモデルマウスは年齢依存的に症状が悪化するが、食餌制限は生後9ヶ月目においても効果の持続が見られた。この結果より、食事時間の考慮が疾患治療に効果的である可能性を見いだす事に成功した。

最後に第五章として第二～四章で示した研究結果を総括し、末梢時計の性質、食餌同調のメカニズム、さらには食パターンを考慮した疾患予防・治療について考察し、今後の展望について記述する。

## 早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 田原 優 印

(2011年 12月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
① ○	Kuroda H*, <u>Tahara Y*</u> , Saito K, Ohnishi N, Kubo Y, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Hirao A, Shibata S, 「Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks.」 Sci Rep. 2012, 2: 711. (*These authors equally contributed this work.)
①	Takita E, Yokota S, <u>Tahara Y</u> , Hirao A, Aoki N, Nakamura Y, Nakao A, Shibata S, 「Biological clock dysfunction exacerbates contact hypersensitivity in mice.」 Br J Dermatol. 2012, (掲載決定)
①	Fuse Y, Hirao A, Kuroda H, Otsuka M, <u>Tahara Y</u> , Shibata S, 「Differential roles of breakfast only (one meal per day) and a bigger breakfast with a small dinner (two meals per day) in mice fed a high-fat diet with regard to induced obesity and lipid metabolism.」 J Circadian Rhythms. 2012, 10: 4.
① ○	<u>Tahara Y</u> , Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Komatsu T, Moriya Y, Okada S, Furutani N, Hirao A, Horikawa K, Kudo T, Shibata S, 「In Vivo Monitoring of Peripheral Circadian Clocks in the Mouse.」 Curr Biol. 2012, 22: 1029-1034.
①	Kubo Y, <u>Tahara Y</u> , Hirao A, Shibata S, 「2,2,2-Tribromoethanol phase-shifts the circadian rhythm of the liver clock in Per2::Luciferase knockin mice: lack of dependence on anesthetic activity.」 J Pharmacol Exp Ther. 2012, 340 :698-705.
①	Okamoto M, Irii H, <u>Tahara Y</u> , Ishii H, Hirao A, Udagawa H, Hiramoto M, Yasuda K, Takanishi A, Shibata S, Shimizu I, 「Synthesis of a new [6]-gingerol analogue and its protective effect with respect to the development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet.」 J Med Chem. 2011, 54 :6295-6304.
① ○	<u>Tahara Y</u> , Otsuka M, Fuse Y, Hirao A, and Shibata S 「Restricted feeding elicits insulin-dependent regulation of <i>Per2</i> and <i>Rev-erba</i> gene expression as an early step in entrainment of the liver clock」 J Biol Rhythms. 2011, 26: 230-240.
①	Nakamura Y, Harama D, Shimokawa N, Hara M, Suzuki R, <u>Tahara Y</u> , Ishimaru K, Katoh R, Okumura K, Ogawa H, Shibata S, Nakao A. 「The circadian clock gene <i>Period2</i> regulates a time of day-dependent variation in cutaneous anaphylactic reaction.」 J Allergy Clin Immunol. 2011, 127: 1038-1045.
①	Hirao A, Nagahama H, Tsuboi T, Hirao M, <u>Tahara Y</u> , Shibata S. 「Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in Per2::luc knock-in mice under two meals per day feeding.」 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010, 299: G1045-1053.
①	<u>Tahara Y</u> , Hirao A, Moriya T, Kudo T, Shibata S 「Dorsomedial hypothalamus is not necessary for the feeding-induced entrainment of liver circadian rhythm in <i>Per2::luc</i> knock-in mouse」 J Biol Rhythms., 2010, 25, 9-18.
①	Hirao A, <u>Tahara Y</u> , Kimura I, Shibata S 「A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock.」 PLoS One, 2009, 4, e6909.
①	

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
②	○ <u>Tahara Y</u> , Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Ohnishi N, Ohura Y, Hirao A, Horikawa K, Kudo T, Shibata S, 「In Vivo Monitoring of Peripheral Circadian Clocks in the Mouse.」, S76, 『2012 Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms』, Florida, USA, (May 2012)
②	○ <u>Tahara Y</u> 「In Vivo Monitoring System Reveals Synchrony and Free-Running Period in Peripheral Circadian Clocks of the Mouse」, Session 2-2, 『Circadian Clocks and Metabolic Disease 2012 UCLA Symposium』, Arrowhead lake, USA, (April 2012)
②	○ <u>Tahara Y</u> , Shibata S 「Food entrainment of peripheral clocks evaluated by in vivo imaging」, Symposium 2-4, 『3 <sup>rd</sup> World congress of chronobiology』, Puebla, Mexico, (May 2011)
②	<u>田原 優</u> , 「インビボ・イメージングによるマウス体内時計測定法の確立」、『第 5 回 IVIS® Imaging System ユーザー会』、東京、依頼公演、2010 年 10 月
②	○ <u>Tahara Y</u> , Shibata S, 「Visualizing the circadian clock in mouse using IVIS in vivo imaging system」、『第 8 回ボン大学-早稲田大学ジョイントシンポジウム』、早稲田大学（東京）、2010 年 10 月
②	○ <u>田原 優</u> 、 <u>田中 麻貴</u> 、 <u>平尾 彰子</u> 、 <u>柴田 重信</u> 、「食事の量やタイミングの相違がマウスの体重、脂肪増加に及ぼす影響」、『第 63 回日本栄養・食糧学会大会』、3G-08a、長崎県立大学、2009 年 5 月
②	○ <u>田原 優</u> 、 <u>柴田 重信</u> 、「肝臓の給餌性リズム形成と光同調における Dorsomedial hypothalamus(DMH)の役割」、『時間生物フォーラム 2009』、早稲田大学 TWINS（東京）、2009 年 3 月
②	○ <u>田原 優</u> 、 <u>平尾 彰子</u> 、 <u>柴田 重信</u> 、「肝臓の体内時計」、『2008 年度霧島神経フォーラム』、霧島、2008 年 9 月
	<u>田原 優</u> 、 <u>柴田 重信</u> 、「日内リズムを作る身体のしくみ」『子どもと発育発達』、日本発育発達学会、杏林書院、2011, 8: p259-263
③	<u>田原 優</u> 、 <u>柴田 重信</u> 、「子供の体内時計と遺伝」、『乳幼児医学・心理学研究』、日本乳幼児医学・心理学会、2010, 19, 89-96
③	<u>Shibata S</u> , <u>Tahara Y</u> , <u>Hirao A</u> 「The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs」 Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, 62, 918-927.
③	<u>田原 優</u> 、 <u>柴田 重信</u> 、「行動薬理研究における実験技術～概日リズム評価法～」、『実践行動薬理学』、日本薬理学会、金芳堂、第 I 編、4 章、p27-p34
③	<u>Shibata S</u> , <u>Hirao A</u> , <u>Tahara Y</u> 「Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm」 Sleep & Biological Rhythms, 2010, 8, 18-27
③	

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）