

学位論文題名

# Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light-dark cycles

(スケジュール化された新奇環境への暴露はマウス末梢時計の  
明暗サイクルへの再同調を部位特異的に促進する)

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

哺乳類の生物時計は視床下部視交叉上核に局在し、概日リズムを発振するとともに、主として外界の明暗サイクルに同調して、行動や生理機能の時間的統合を図っている。近年、視交叉上核以外の組織や臓器においても概日リズムが発振されていることが明らかとなり、視交叉上核生物時計(中枢時計)の役割は昼夜変化や季節変動を感受し、時刻や季節の情報を末梢の振動系(末梢時計)へ伝達することにあると考えられるようになった。

一方、ヒトを含めた一部の哺乳類では、スケジュール化された身体運動が生物時計を同調させることが報告されており、特に明暗サイクルの位相を前進させた場合、身体運動は生物時計の再同調を促進する。このことから、活動量の増加に起因する何らかの変化が中枢時計にフィードバックして、生物時計の位相や周期に影響していることを示唆しているが、その機構は不明である。

近年、生物発光レポータを導入したトランスジェニック動物が作成され、視交叉上核や末梢組織における時計遺伝子の発現リズムをリアルタイムで計測できるようになり、生物時計の機能がより正確に解析されるようになった。その結果、明暗サイクルの位相を急速に変位させた際、中枢時計の *Per1* 発現リズムは直ちに新しい明暗サイクルに再同調するが、行動リズムや末梢組織の *Per1* 発現リズムは数日かけて再同調することが判明した。この結果は、明暗サイクルの位相変化により中枢時計と末梢時計は一時的に乖離することを示すとともに、身体運動による行動リズムの再同調促進効果は、中枢時計に対する作用よりも、末梢時計に作用した結果である可能性が高い。

本研究では、この仮説を検証する目的で、生物発光レポータを導入したマウスを用いて、明暗サイクルの位相変化と同時に身体運動を負荷し、自発行動リズム、中枢時計である視交叉上核、末梢時計が存在する肝臓、肺臓、骨格筋の時計遺伝子 *Per1* 発現リズムの再同調過程を解析した。

### 【材料と方法】

本研究は、マウス自発活動リズムを測定する *in vivo* 実験と視交叉上核および末梢臓器の時計遺伝子 *Per1* 発現リズムを測定する *in vitro* 実験からなる。用いた実験動物は、*in vivo* 実験では C57BL/6 マウス、*in vitro* 実験では時計遺伝子 *Per1* のプロモーター上流にホタルルシフェラーゼを導入したトランスジェニックマウス(*Per1-luc*)を用いた。実験に使用した動物はすべて雄性で、実験開始時の週令は 8~10 週であった。

[*in vivo* 実験]: 動物は明期 300 lux、暗期約 0 lux の 12 時間明、12 時間暗の明暗サイクル下で個別ケージにて飼育された。自発活動量はケージ直上に設置した感熱式センサーによ

り測定した。行動リズムが明暗サイクルに同調しているのを確認した後、暗期開始時刻を 8 時間位相前進もしくは位相後退させることにより、明暗サイクルを 8 時間位相変位させた。マウスは新しい明暗サイクルに 3 サイクル置いた後、恒常暗条件でフリーランさせた。明暗サイクルの位相変位と同時に、位相シフトした暗期開始時刻から 3 時間、マウスを回転輪の付いた新しいケージに暴露した(新奇環境暴露群)。新奇環境暴露は合計 4 回行った。対照群は、明暗サイクルの位相変位のみ行い、新奇環境へは暴露しなかった。行動リズムの位相変位量の測定は、恒常暗第 2 日目におけるフリーランリズムの行動開始位相を指標として行った。

【*in vitro* 実験】：実験プロトコルは *in vivo* 実験と同じである。明暗サイクルの位相変位直前(基準値)、恒常暗開始から 16~21 時間後に、視交叉上核、肝臓、肺臓、骨格筋(腹直筋)を採取し、直ちに培養用組織切片を作成して、ルシフェリンを含む培養液で気水界培養を行った。組織の発光量をディッシュ型ルミノメーターにより 10 分間隔で連続 5 日間測定し、*Perl* 発現リズムを解析した。

#### 【結果】

【*in vivo* 実験】：位相前進実験では、新奇環境暴露群におけるフリーランリズムの行動開始位相は対照群に比べて統計学的に有意に位相前進し、新しい明暗サイクルへの再同調を完了していた。一方、対照群の行動リズムは再同調を完了していなかった。位相後退実験では、両群とも行動リズムは再同調を完了しており、リズム位相に差はなかった。

【*in vitro* 実験】：位相前進実験では、視交叉上核の *Perl* リズムは暴露群、対照群ともに有意に位相前進し、再同調をほぼ完了していた。一方、肝臓の *Perl* リズムは両群ともに有意な位相変位を示さなかった。暴露群の肺臓と骨格筋の *Perl* リズムは有意に位相前進し、再同調を完了したが、対照群では再同調の中間過程にあった。一方、位相後退実験では、視交叉上核、肝臓、肺臓、骨格筋の *Perl* リズムは両群とも有意に位相後退し、再同調をほぼ完了していた。

#### 【考察】

本研究の結果から、まず位相変化した明暗サイクルに対する概日リズムの再同調は、位相変位の方向性と測定する機能により異なることが明らかとなった。自発活動リズムでは、明暗サイクルを 8 時間位相前進させた場合と後退させた場合で、再同調に要する日数が異なり、位相前進させた場合により日数がかかった。この結果はラットで得られている結果と一致する。末梢組織における *Perl* リズムの再同調も、位相前進で遅れており、特に肝臓ではほとんど位相変位を示さなかった。一方、視交叉上核 *Perl* リズムは位相前進、位相後退ともほぼ再同調を完了しており、位相変位の方向性による差は見出されなかった。この結果は、視交叉上核生物時計と行動リズムに乖離が生じるとする以前の報告を確認するものである。

新奇環境暴露は、位相前進時における行動リズムや肺臓、骨格筋の *Perl* リズム再同調を促進したが、肝臓の *Perl* リズムに対しては全く効果がなかった。位相後退時では、対照群においてすでに再同調を完了していたので、新奇環境暴露の促進効果は判定出来なかった。新奇環境暴露が行動リズムや一部の末梢時計に作用した機序としては、少なくとも 3 つの可能性が考えられる。第 1 は、新奇環境が視交叉上核の中核時計から末梢時計へ伝達される概日信号の出力を強化した可能性である。第 2 は、新奇環境が中核時計から末梢時計に至る伝達機構を増強した可能性である。第 3 は、新奇環境が一部の末梢時計において中核時計からの概日信号に対する反応性を増加させた可能性である。ただし、新奇環境の効果が一部の末梢時計にのみ認められたことから、第 1 の可能性は大きくないと考えられる。新奇環境は内分泌系や交感神経系を刺激し、また効果のあった末梢組織は身体運動に関連していることも考えあわせ、第 2 の可能性が強いが、第 3 の可能性も否定できない。

時差飛行における不眠や身体不調、いわゆる時差症候群は西方飛行(位相後退)よりも東方飛行(位相前進)で強い。また、交代勤務における身体不調や睡眠相後退症候群など概日リズム障害による不眠なども同じ病態生理が想定されている。本研究で示されたように、昼夜環境の急激な位相変化は中核時計と末梢時計を乖離させ、特に位相前進の場合は乖離が長く続く。身体運動を含む新奇環境は位相変化による乖離を短縮させることから、ヒトにおける時差症候群や概日リズム障害の克服に有効である可能性がある。

#### 【結論】

身体運動を伴う新奇環境暴露は、8 時間位相前進した明暗サイクルへの自発活動リズム、および肺臓、骨格筋に存在する末梢時計の再同調を促進する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

## Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light-dark cycles

(スケジュール化された新奇環境への暴露はマウス末梢時計の  
明暗サイクルへの再同調を部位特異的に促進する)

時差飛行や夜間交替勤務など、新しい環境周期への生体リズムの再同調には1週間~10日間の移行期が必要である。また時差飛行に関しては、西方飛行にくらべて東方飛行時に精神身体の不全状態(時差症候群)が長引くことが報告されている。生体リズムの再同調には高照度光が有効であるが、また身体運動も時差症候群の解消に効果的との報告があるが科学的根拠は十分ではない。

本論文は、マウスを用い、明暗サイクルが変化した際の時差症候群の発生メカニズムと身体運動の有効性について検証したものである。その結果、明暗サイクルを8時間位相前進もしくは後退させた際、マウスを回転輪運動を伴う新奇環境へ暴露することにより自発活動リズム、肺臓と骨格筋の時計遺伝子 *Per1* 発現リズムの再同調が促進されることが明らかになった。一方、新奇環境暴露は、中枢時計である視交叉上核には影響しなかった。また、新奇環境暴露の再同調促進作用は明暗サイクルを位相前進させた場合にのみ認められた。これらの結果は、中枢時計と各臓器に存在する末梢時計が内的脱同調を起こすことにより時差症候群が発生し、身体運動を含む新奇環境への暴露が末梢時計の再同調を部位特異的に促進することを示す。

学位論文審査は主査の吉岡教授、副査の渡辺教授、本間教授の合計3名の審査員により、平成20年4月21日、医学部臨床大講堂にて、およそ30名の出席のもと行われた。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約20分間に渡って学位論文の内容を説明した。その後、主査、副査との間で約10分間に渡り質疑応答があった。

副査の渡辺教授からは、本研究で用いた新奇環境暴露はケージ交換と輪回し運動の2つの刺激が含まれているがどちらがより強く作用しているか、明暗周期の位相シフトの方向性と概日リズムの再同調速度のメカニズム、12時間の位相シフトを行った場合の再同調速度について質問があった。申請者は、新奇環境暴露時の輪回し回転数と位相変化量との間に有意な相関が認められなかったことを引用し、ケージ交換に対する反応が結果に影響した可能性があるかと回答した。また、位相シフトの方向性と概日リズムの再同調速度に関しては、現時点ではメカニズムは不明であるが行動リズムの結果から考えられる可能性とし

て2振動体仮説を用いて回答した。12時間の位相シフトを行った場合の再同調速度に関しては、概日リズム間での分離再同調と再同調速度の関係について説明し、分離再同調が生じた際には再同調速度が遅れる可能性があるとして回答した。

主査の吉岡教授からは、中枢時計から末梢時計への概日信号出力について現在どのようなシステムが想定されているのか、また新奇環境暴露時の交感神経系、内分泌系の末梢臓器に対する作用の違いと本研究の肝臓と肺、骨格筋間の反応性の違いに関して想定されるメカニズムについて質問があった。申請者は、視交叉上核から末梢時計への出力因子としてPK2 (Protinekicine2) をあげ、先行研究を引用して回答し、PK2 の受容体の発現が中枢神経系にあり末梢臓器にないことから視交叉上核から中枢神経系へ PK2 のシグナルが伝達され、中枢神経から末梢臓器へ PK2 とは異なる伝達物質が末梢臓器の概日信号として機能している可能性をあげた。また、新奇環境暴露による末梢臓器間での反応性の違いについては、運動時における交感神経系と内分泌系の末梢臓器に対する作用が肝臓と肺、骨格筋間で異なることを説明し、本研究での末梢臓器間での反応性の違いに関係している可能性をあげた。

副査の本間教授からは、新奇環境を与える位相により結果が異なる可能性があるかどうか、また、身体運動がヒトの生体リズムに与える影響について過去にどのような研究が報告されているのか、またその先行研究を考慮した際に本研究の結果から身体運動がヒトにおいて時差症状を改善する可能性の有無について質問があった。申請者は、自身の追加実験の結果を引用し、新奇環境暴露を与える位相により末梢臓器の反応性が異なることを説明した、また身体運動がヒトの概日リズムに与える影響を検証した先行研究を引用し、身体運動が時差症状の改善に効果がある可能性を説明した。

いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づき先行研究の結果などを引用し誠実かつ適切に回答した。

審査員一同は、本研究が動物モデルを用いて新しい明暗サイクルへの再同調に於ける中枢時計と末梢時計の乖離を遺伝子発現リズムにより実証し、さらに新奇環境暴露が末梢時計の再同調を部位特異的に促進することによりその乖離を早期に解消することをはじめて実証した点を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。