

ラット視交叉上核における時計遺伝子 *rPer1* 及び *rPer2* 発現細胞数の時空間的解析

学位論文内容の要旨

[背景と目的]

ヒトの睡眠覚醒をはじめ、哺乳類の生理機能には季節変動が認められる。季節変動を説明するものとして、概日リズムに関与する2つの振動機構の光同調が季節(日長変化)により変化するためとする2振動体仮説がある。最近、概日リズムの発振源である視床下部視交叉上核の培養系を用いた研究により、視交叉上核には複数の振動系が存在し、日長変化に応じて変化することが明らかにされた。さらに、1つの振動系は行動リズムの開始位相を、他の振動系は行動リズムの終了位相と強く相関していることも判明した。しかし、培養系を用いた実験では、視交叉上核が部分的に切断されているので、2つの振動体間の相互作用を解析することができない。そこで本研究では、ラット視交叉上核細胞における時計遺伝子 *Per1*, *Per2* の発現を *in situ* hybridization 法で同定し、発現細胞数に見られる概日リズムを解析することによって、視交叉上核を切断することなく日長により変化する振動体の有無を確認し、行動リズムとの関係を解析した。

[材料と方法]

実験には生後2~3ヶ月齢のウイスター系雄性ラットを用いた。自発活動をコンデンサー式行動計で長期間連続測定し、明期12時間暗期12時間(LD12:12)の照明下で2週間行動記録した後、長日(LD18:6)暴露群と短日(LD6:18)暴露群に分け、行動リズムを解析した。また、脳試料を採取し、時計遺伝子 *rPer1*, *rPer2* を発現する細胞を同定して、その数の24時間変動を解析した。時計遺伝子発現細胞は、*rPer1*, *rPer2* mRNA を *in situ* hybridization 法で染色することにより同定した。脳採取は3時間ごととし、各時点で4匹のラットを用いた。なお、視交叉上核の部位同定のため、AVPとVIPの二重免疫染色を行った。

視交叉上核を吻側から尾側まで、30 μ mの厚さで28枚の前額断連続切片を作成し、試料とした。その場合、*rPer1*と*rPer2*mRNAの染色は連続した切片を交互に分け、それぞれについて合計14枚行った。各切片に7.5 μ m平方の格子を設定し、格子ごとの*rPer1*と*rPer2*陽性細胞数を計測した。

[結果]

1. 行動リズム

長日条件では活動時間が約6時間短縮したが、活動期と暗期の位相関係には大きな変化は認められなかった。一方、短日条件では活動時間には有意な変化は見られなかったが、活動開始位相と暗期開始との位相関係が大きく変化し、活動期は暗期開始約8時間後から始まった。

2. 視交叉上核 *rPer1*, *rPer2* 発現細胞数

rPer1, *rPer2* 発現細胞数は吻側尾側軸の中央部切片で最も多かったが、日長による差異は認められなかった。*rPer1* 発現細胞数は *rPer2* 発現細胞数のおよそ60%であった。

3. 視交叉上核切片別格子別 *rPer1*, *rPer2* 発現細胞数の概日リズム

rPer1, *rPer2* 発現細胞数に切片別、格子別で有意な概日リズムが認められたが、VIP領域

(中核部)では有意な概日リズムは少なく、振幅も小さかった。一方、AVP領域(外殻部)では振幅の大きな概日リズムが観察された。

*rPer1*発現細胞数には、視交叉上核吻側切片の内背側の格子で2相性の概日リズムが観察され、短日よりも長日でより顕著であった。また短日条件では長日条件に比べ、概日リズム頂値位相が約3時間前進していた。また、リズム頂値位相は吻側に比較し、尾側で位相前進していた。

*rPer2*発現細胞数には、*rPer1*発現細胞と同様に外殻部の背内側で明瞭な概日リズムが認められた。しかし、*rPer1*発現細胞数でみられた明瞭な2相性パターンは認められなかった。短日条件では、長日条件に比べ頂値位相が約6時間前進していた。しかし、*rPer1*発現細胞数でみられた尾側における頂値位相の前進は認められなかった。

[考察]

本研究結果より、視交叉上核吻側外殻部内側で、*rPer1*発現細胞数に2相性の概日リズムが認められたが、同一切片において外殻部外側では単相性であることから、外殻部内側に外側とは異なる振動系が存在することが示唆された。また、長日条件でみられた2相性概日リズムは短日条件で不明瞭になったことから、長日、短日で同じ位相に頂値をもつ概日リズムが活動終了位相と、長日短日で頂値位相が変化した概日リズムが活動開始位相に対応することが示唆された。ラットにおいても、マウスと同様、視交叉上核に日長変化に対応する2つの振動系が存在すると考えられる。

[結論]

ラット視交叉上核の*rPer1*、*rPer2*発現細胞数には、日長に対応して変化する概日リズムが認められた。また、吻側部の外殻部背内側における*rPer1*発現細胞数の概日リズムは、長日条件下で2相性を示したことから、2つの異なる振動系が関与している可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学位論文題名

ラット視交叉上核における時計遺伝子 *rPer1* 及び

rPer2 発現細胞数の時空間的解析

ヒトの睡眠覚醒をはじめ、哺乳類の生理機能には季節変動が認められる。季節変動を説明するものとして、概日リズムに關与する2つの振動機構の光同調が、季節により日長が変化するためとする2振動体仮説がある。本研究は、ラット視交叉上核細胞における時計遺伝子 *rPer1*、*rPer2* の発現を *in situ hybridization* 法で同定し、発現細胞数に見られる概日リズムを解析することによって、日長により変化する振動体の有無と局在を確認し、行動リズムとの関係を解析したものである。その結果、*rPer1* 発現細胞数には、視交叉上核吻側の内背側部で2相性の概日リズムが観察され、短日よりも長日でより顕著であった。また、短日条件では長日条件に比べ、概日リズム頂値位相が約3時間前進していた。更に、リズム頂値位相は吻側に比較し、尾側で前進していた。*rPer2* 発現細胞数には、*rPer1* 発現細胞と同様に外殻部の背内側で明瞭な概日リズムが認められた。しかし、明瞭な2相性パターンは認められなかった。短日条件では、長日条件に比べ頂値位相が約6時間前進していたが、尾側における頂値位相の前進は認められなかった。以上の結果から、視交叉上核吻側外殻部内側に、外側とは異なる振動系が存在することが示唆された。また、長日条件でみられた2相性概日リズムが短日条件で不明瞭になったことから、長日、短日で同じ位相に頂値をもつ概日リズムが活動終了位相と、長日短日で頂値位相が変化した概日リズムが活動開始位相に対応することが示され、視交叉上核に日長変化に対応する2つの振動系が存在すると結論された。

学位論文の審査は、平成21年2月5日、主査の本間教授、副査の吉岡教授、渡辺教授の3名により、公開審査として医学研究科臨床大講堂で行われた。なお、出席者は約30名であった。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いて約20分間

にわたり、学位論文の内容を発表した。その後、主査、副査と申請者による質疑応答が約 10 分間にわたって行われた。吉岡教授からは、視交叉上核 AVP および VIP の概日リズム発振における役割、本研究における位置づけ、短日条件で行動リズムと明暗サイクルとの位相関係が大きく変化した機序について、渡辺教授からは、本研究結果からみた 2 振動体仮説の適否、先行研究との相違点などについて、本間教授からは、行動開始位相が決定されるメカニズム、細胞数の時間分布における 2 相性の意味について質問があった。申請者は、VIP は概日リズムの入力系に、AVP は出力系に参与していること、本研究では VIP、AVP は部位マーカーとして用いたことなどを回答したが、一部の質問、たとえば、行動リズムと明暗サイクルとの位相関係、本研究結果と 2 振動体仮説との関係、細胞数の時間分布における 2 相性の意味などについては、質問の意味を正確に理解せず、十分な回答をなし得なかったため、後日主査に文書で回答した。

本研究は、ラット行動リズムの日長変化を説明する視交叉上核生物時計の変化を、時計遺伝子 *rPer1*、*rPer2* の発現細胞数にみられる概日リズムから解析し、日長変化に反応する複数の概日振動体の局在を明らかにしたことで高く評価され、今後、ヒトの季節性リズム障害や冬季うつ病など、概日振動体が関与する疾患の病態生理の解明や治療法の確立に導く基礎的研究として期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。