

研究報告書

「リプログラミング技術で解く細胞分化と時計機構の関係」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 八木田 和弘

1. 研究のねらい

睡眠覚醒や血圧、体温、内分泌さらには代謝など、様々な生理機能には日内変動が見られ、この約一日周期のリズムを circadian rhythm(概日リズム)とよぶ。概日リズムを生み出している概日時計(体内時計)は全身の臓器組織に細胞レベルで備わっており、個体レベルのリズムと同時に個々の細胞機能リズムを制御している。このように公汎な生理機能に関わるため、概日リズム障害は様々な疾患リスクとの関連が示されている。

我々は、最近、マウスES細胞の *in vitro* 分化誘導系を利用して、ES細胞の分化に伴い *in vitro* で細胞自律的に概日時計が形成されること、分化して概日時計が形成された細胞をリプログラミングして iPS 細胞にすると再びリズムが消失すること、を示し概日時計と細胞分化との密接な関連を見いだした(Yagita et al, *PNAS*, 2010)。この発見は、個体レベルや臓器レベルで見られる生理機能リズムを制御する概日時計と細胞の運命決定を制御する細胞分化機構との間に関連があることを初めて示したものである。

そこで、さきがけ研究では細胞分化の制御機構と概日時計の成立がどのような分子レベルでのクロストークによって連関しているのか、分化異常を示すようなモデルES細胞およびiPS細胞を用いて解き明かすことを目指した。細胞分化に伴う概日時計の成立機構が解明されれば、i) 普遍的な細胞機能である概日時計を指標にした細胞評価、ii) 胎児性腫瘍などの発生メカニズムとの関連解明、iii) 自閉症などの先天性脳機能発達障害における睡眠リズム障害発症メカニズム理解、など社会的な要請も高い研究に展開できると考えている。

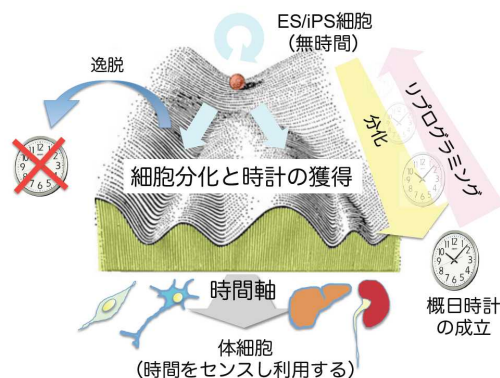
2. 研究成果

(1) 概要

さきがけ研究では、リプログラミング技術を用いて、「細胞分化と概日時計の機能連関」を分子レベルで解き明かすことを目的として研究を行った。その上で、まず、細胞分化に異常を来すようなモデルES細胞やiPS細胞を用いた *in vitro* 概日時計形成評価法の確立が必要であり、遺伝子変異などによる概日時計の異常がES細胞やiPS細胞を用いて *in vitro* で再現できることが必須の条件となる。さらに、*in vitro* 概日時計形成評価法で検出したリズム異常の生理的意義を評価するためにも、個体発生における概日時計発生機序との比較検討を行う必要がある。また、ES細胞やiPS細胞から臓器・組織が形成された後での概日時計評価系の確立など、様々な新規アッセイ系の構築をも同時に進める必要がある。

その結果、現在までに、1) 遺伝子変異 ES 細胞バンクを用いた概日時計成立異常スクリーニング系の確立、2) マウス embryo を用いた個体発生における概日時計の細胞自律的発生の解明、3) マウス大腿骨をモデルとした超長期器官培養による概日時計イメージング法の確立、などの成果を上げた。さらに、細胞分化異常による概日時計成立機構の破綻メカニズムなどの解明を進めており、具体的な分子機序についても明らかになってきている。

細胞分化と密接に関連した概日時計の成立



(2) 詳細

研究テーマ A 「遺伝子変異 ES 細胞バンクを用いた概日時計成立異常スクリーニング系の確立」

ES細胞の*in vitro*分化誘導により概日時計が細胞自律的に形成されるが、我々が開発した*in vitro*概日時計形成法が遺伝的変異によるリズム異常を検出する事が可能かどうかを検討した。時計遺伝子のうち、遺伝子欠損により長周期を示すCKI δ および、遺伝子欠損により胚性致死になるCK2 α の二つの遺伝子に着目し、これらの遺伝子に変異が導入された変異ES細胞株を用いて検討した結果、我々の開発した方法で遺伝子変異による概日リズム異常を検出できることを証明した。さらに、本研究により、胎生致死に陥る遺伝子変異であっても、正確に*in vitro*で概日時計表現型の評価ができるようになった。

研究テーマ B 「マウス embryo を用いた個体発生における概日時計の細胞自律的発生の解明」

概日時計の発生について、概日時計レポーターmPER2::LucをノックインしたmPER2^{Luc}マウス胎仔組織および器官培養系を用いて解析した。おもに線維芽細胞からなるマウス胎仔末梢組織の分散培養系において、E10.5胚の細胞では概日リズムは検出されなかった。しかし、さらに培養を継続したところ、3～4日で振幅は非常に小さいものの約24時間周期のリズムが出始める細胞が一部に認められた。培養8日後にはほとんどの細胞にはっきりとした概日リズムが見られ、ES細胞の分化誘導系と同様に、マウス胎仔の細胞にも細胞自律性の概日時計発生が認められた。さらに、マウスE13.5胚から顎下腺を採取して器官培養を行い、顎下腺における概日リズムの発生過程をイメージング解析したところ、線維芽細胞と同様に当初見られなかった概日リズムが、器官培養の過程で組織自律的に概日時計が形成されることを見いだした。これにより、ES細胞の分化誘導過程のみならず胎仔組織においても細胞自律性の概日時計発生が証明された。

研究テーマC「マウス大腿骨をモデルとした超長期器官培養による概日時計イメージング法の確立」

概日時計は全身の臓器・組織に存在しており、様々な臓器機能を制御している。しかし、現在のところ、末梢臓器の器官培養や組織培養を長期間継続して行うことが困難であり、また、臓器全体をリアルタイムにイメージングできる高感度発光イメージング装置が存在せず、発生発達過程などでの臓器レベルの概日時計の機能解析はほぼ不可能な状況であった。そこで、我々は末梢の概日時計成立の生理的意義を解析できる実験系の開発を目的として、マウス大腿骨の超長期器官培養系の確立およびマウス臓器全体をリアルタイムイメージングできる高感度発光イメージング装置の開発を行った。その結果、マウス大腿骨のほぼ全体像が高精細にイメージングできる装置を作製し、ex vivoで大腿骨骨端軟骨の概日時計振動を約300日にわたって連続測定することに成功した。その結果、マウス大腿骨の骨端軟骨は、強く時計遺伝子mPER2を発現すること、非常に明瞭な概日リズムを刻むこと、を明らかにした。

3. 今後の展開

今後は、さらに「細胞分化と概日時計の因果関係」を証明するために、さらなる細胞分化異常モデルES細胞およびiPS細胞を用いて網羅的遺伝子発現およびゲノム解析を行い、最終的に概日時計の形成を導くコア転写因子の同定とこれに伴って制御される遺伝子ネットワーク「Clock モジュール」を抽出する。これは、概日時計発生機構を解明するだけにとどまらず、全ての体細胞における正常な分化の指標となる可能性があり、普遍的な細胞機能を評価する新たな視点を提供できるものと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

細胞分化と概日時計成立の因果関係を分子レベルで解き明かし、全身の細胞に概日時計が形成される意義やその破綻が意味する病態、さらにはES細胞やiPS細胞および生殖細胞に概日時計が無い(あってはならない)理由を知ることが科学的ねらいとして定めて研究を行った。さきがけの研究期間内に公表できた我々の論文は3編(さきがけ研究として行ったもののみ)、また投稿中および間もなく投稿に至る論文が2つあり、成果をあげることができたと考えている。また、国際学会における賞の受賞(AOSP Award for Young Scientist)および特許出願もそれぞれ1件有り、成果の社会への還元についても積極的に取り組んだ。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

多能性幹細胞段階ではサーカディアンリズムがなく、分化とともに発現するという独自に見た現象について解析を行い、特定遺伝子とリズムの問題まで到達している事は評価する。少しインパクトに欠ける結果とはいうものの、地道にメカニズムを追い求め研究を続けた結論であり、さらに本結果に基づき新しい視点を考え出そうとしている点も評価できる。論文は着実に発表できているが、今後はインパクトのある大きな仕事へどう発展させるかという課題への

挑戦が残っている。是非リズム研究に新しい視点をもたらして欲しいと期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N, **Yagita K***. Cell and Tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS Lett.*, in press. (*Corresponding author)
2. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai Y, Oda R, Inokawa H, Kubo T, **Yagita K***. Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse ex vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular Cartilages and Growth Plates., *PLoS One*, 2013, 8, e78306 (*Corresponding author)
3. Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Inokawa H, Horie K, **Yagita K***. An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2a as an endogenous clock regulator. *PLoS One*, 2013, 8, e67241 (*Corresponding author)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 八木田和弘

発明の名称: 体内時計を指標とした細胞評価法の確立

出 願 人: 京都府立医科大学

出 願 日: 2012/1/6

出 願 番 号: 特願 2012-1506

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1) 国際学会

[招待講演・シンポジウム・ワークショップ]

- 1: Yagita K., ES cell-based approach elucidating the integrated physiology of mammalian circadian systems. *4th International Symposium on Photoc Bioimaging 2012*, Sapporo, 2012 (Invited speaker)
- 2: Yagita K., Cell-autonomous development of mammalian circadian clock during the differentiation culture of ES cells. *International Conference for Histochemistry and Cytochemistry 2012*, Kyoto, 2012 (Invited speaker)
- 3: Yagita K., Chronogenesis and cellular differentiation., *Gordon Research Conferences: Chronobiology*, Lucca, 2011 (Invited speaker)
- 4: Yagita K., Development of circadian oscillator in mammals., *12th Society for Research on Biological Rhythms*, Destin, Florida, 2010 (Invited speaker)

2) 国内学会

[特別講演・シンポジウム, ワークショップ]

1. 八木田和弘, :「イメージング技術を用いた生体機能の Cutting Edge」, 関西実験動物研究会 30周年記念大会, 京都, Dec. 6. 2013 (シンポジスト)
2. 八木田和弘, :「ES 細胞を用いた概日時計の in vitro 再現と分化制御機構との関連」, 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, Dec. 5. 2013 (ワークショップ講演・オーガナイザー)
3. 八木田和弘, :「MYC induced disruption of circadian clock development」, 第 86 回日本生化学会, 横浜, Sep. 11. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
4. 八木田和弘, :「体内時計はいつ動き出すか」, 第 14 回日本抗加齢医学会, 横浜, June. 30. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
5. 八木田和弘, :「ES cell-based in vitro evaluation system of circadian clock phenotypes in mammals」, 第 90 回日本生理学会大会, 東京, Mar. 27. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
6. 八木田和弘, :「体内時計の発生・発達」, 第 1 回日本発達神経科学会, 明石, 2012 (特別講演)
7. 八木田和弘, :「発生発達期における概日リズムの階層的形成」, 第 17 回日本行動神経内分泌研究会, 京都, 2012 (教育講演)
8. 八木田和弘, :「時間軸生物学:細胞分化と概日時計の接点」, 第 12 回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 2012 (シンポジスト・オーガナイザー)
9. 八木田和弘, :「Circadian clock and Cellular Differentiation」, 第 89 回日本生理学会, 松本, 2012 (シンポジスト・オーガナイザー)
10. 八木田和弘, :「Circadian clock and Cellular Differentiation: Development, Regeneration and Cancer」, 第 34 回日本分子生物学会, 神戸, 2011 (ワークショップ講演・オーガナイザー)
11. 八木田和弘, :「細胞分化と概日時計の発生」, 第 64 回日本自律神経学会, 秋田, 2011 (シンポジスト・オーガナイザー)

3) 受賞

1. 「Asia and Oceania Society for Photobiology (AOSP) Award for Young Scientist」, (2013)