

# 研 究 報 告 書

## 「神経グリア相互作用としての概日リズム制御系の新たな理解」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 早坂 直人

### 1. 研究のねらい

脳機能研究は、主として神経細胞および神経ネットワークを対象としてこれまで進展してきたが、近年、グリアの重要性に光が当てられつつある。中でもアストロサイトについては、神経と類似した能動的な機能が明らかになり、脳機能発現のもうひとつの主体である可能性が示唆されている。しかし生体が行動を発現する過程で、神経とグリアの機能を分解し、それらの相互作用の実体とその意義を明らかにするには至っていない。本研究は、「脳機能＝神経とグリアの機能統合」という見地に立って、脳の複雑なネットワーク構造と機能を神経とグリアに切り分け、二者の機能分担や相互作用による脳機能発現の実体を明らかにすることを目的とする。

本研究では、生体の行動リズム制御システムをモデルとする。概日リズム制御系は、恒常条件下で中枢(視交叉上核、SCN)と出力(行動)の概日リズム周期や位相に一定の相関が認められる。従って、複雑な行動制御ネットワークの構造・機能研究において、中間経路を排除し、起点(制御中枢、SCN)と終点(出力、行動)を同一指標(リズム)で直結させたシンプルな経路として解析可能な優れたシステムであるといえる。環境変化に対する感受性と、柔軟性、堅牢性を併せ持つユニークなシステムであるが、それらの特性の基盤となる SCN のネットワーク構造や動作原理の解明が課題となっている。

本研究では以下の達成目標を設定する。

- ① 本研究では、アストロサイト特異的に遺伝子操作を行い、アストロサイトの機能破綻(時計破壊)が行動(リズム)に及ぼす影響について明らかにする。
- ② 本研究は、in vivo で行動(リズム)を形成する神経、グリアの機能分担や神経グリア相互作用を明らかにする。
- ③ 本研究は、環境適応制御システムにおいて、グリアが果たす積極的な役割について明らかにする。

本研究の実現は、リズム制御系の環境適応における様々な特性の基盤解明は元より、行動制御における神経グリアネットワークの普遍的な動作原理の一端に迫ることが期待される。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

前述の 3 つの目的を達成するべく、これまでに以下の 6 つのテーマについて研究を実施した。このうち一部については、現在も研究を継続中である。

研究テーマ A「培養アストロサイトの概日リズム同期と GAP 阻害剤の影響解析」

培養アストロサイトでは、他の細胞では報告がなかった、細胞間相互に概日リズム位相や周期を同期するメカニズムが存在し、培養細胞は 3～4 週の間リズムが同期して継続することを明らかにした。また、細胞間同期には GAP 結合が関与することを示唆した。

#### 研究テーマ B「時計遺伝子 Bmal1 KO マウスの行動リズム解析」

概日リズム制御におけるアストロサイトの機能関与を明らかにするために、アストロサイト特異的に時計遺伝子を欠損したマウスを作製した結果、活動リズム周囲の有意な延長を観察した。この結果から、アストロサイトの時計機能がリズム制御に重要であることが示唆された。

#### 研究テーマ C「Salt-inducible kinase 3 (SIK3) 欠損アストロサイトのリズム変容解析」

アストロサイトでも高発現する SIK3 の KO マウスで、行動リズムの不安定化と光同調の異常が観察された。また、培養アストロサイトでもリズム周期の変動と短周期化が見られた。SIK3 が時計タンパク質 PER2 の分解を介してリズム制御に関与することを示唆した。

#### 研究テーマ D「Sik3 KO マウスの概日リズム制御中枢における細胞間リズム同期変異解析」

Sik3 KO アストロサイトで、細胞間リズム同期が消失していることを明らかにし、更に Sik3 KO SCN(概日リズム制御中枢)でも細胞間で見られるリズムが脱同期していることが明らかになった。従って、リズム同期の消失が活動リズムの不安定化に繋がると予測された。

#### 研究テーマ E「アストロサイト特異的 Sik3 KO マウスの作製とリズム解析」

生体内でアストロサイトに置ける SIK3 の機能を解析するため、アストロサイト特異的 Sik3 KO マウスを作製した。現在活動リズムその他について解析中である。

#### 研究テーマ F「リズム制御中枢で概日振動するケモカイン欠損が概日リズムに及ぼす影響」

アストロサイトが SCN において昼夜の局在を変化させる概日リズムを示すことを明らかにしたが、この遊走リズムを規定する分子を探索し、ケモカインのひとつを候補として同定した。このケモカインと受容体それぞれのアストロサイト特異的 KO マウスを作製し、解析中である。

### (2) 詳細

#### 研究テーマ A「培養アストロサイトの概日リズム同期と GAP 阻害剤の影響解析」

近年、脳内に神経細胞の数倍も存在するアストロサイトは、神経とは独立に興奮し、アストロサイト間、あるいは神経との相互作用により脳機能を調節していることが示唆されている。研究者らはこれまでに、概日リズム制御中枢である脳視床下部視交叉上核(SCN)において、光環境の変化(昼夜変動や光照射時間の変化)に応じてアストロサイトが局在を変化させることを見出した。この結果は、神経活動を調節するアストロサイトが概日時計の制御下にあり、昼と夜とで機能を ON/OFF させる「可変スイッチ」として機能していることを示唆している。そこでまず、複数のアストロサイト細胞株を樹立し、アストロサイトの概日リズムについて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、培養アストロ細胞では、時計遺伝子を始め、発現が概日振動する遺伝子が同定された。また、発現に概日リズムを示す時計遺伝子 Per2 の遺伝子座にルシフェラーゼを挿入したノックインマウス(Per2-luc KI)由来の細胞株で、概日リズムを長期間測定したところ、これまでの他の細胞の報告の数倍に当たる 3~4 週間リズムが自律的に持続することを明らかにした。このことは、アストロサイト間に概日リズムを積極的に同期させる機構の存在を示唆しているが、リズムの長期継続が GAP 阻害剤で見られなくなったことから、アストロサイトは GAP 結合を介して相互に概日リズムを同期させることが示唆された。

#### 研究テーマ B「時計遺伝子 Bmal1 KO マウスの行動リズム解析」

脳内におけるアストロサイトの概日リズム制御への関与を明らかにするために、アストロサイト特異的遺伝子操作を用いて、複数のリズム関連遺伝子をアストロサイト特異的に欠

損したマウスを作製した。まず、概日リズム駆動に必須である時計遺伝子 *Bmal1* KO マウスを作製した。方法としては、Cre-loxP システムを用い、アストロサイト特異的に発現する GFAP 遺伝子の約 15 kb の上流域に組み換え酵素 Cre を連結したマウス(GFAP-Cre)と、*Bmal1* 遺伝子を2つの loxP サイトで挟んだ *Bmal1* floxed マウスを交配させた。行動リズム解析の結果、恒暗条件下で活動リズム周期が有意に延長した。このマウスでは神経の概日時計は正常であることから、アストロサイトの時計が生体の概日リズム制御に関与していることが示唆された。

#### 研究テーマ C「Salt-inducible kinase 3 (SIK3) 欠損アストロサイトのリズム変容解析」

高塩処理したマウスの副腎で発現が誘導される遺伝子として同定された SIK には3つのアイソフォーム(*Sik1*, 2, 3)が存在し、それぞれ代謝に重要な役割を果たすことが報告されている。中でも進化的に保存性の非常に高い SIK3 は中枢神経系でも発現が高いが、機能についてはこれまで報告が無かった。研究者らは、このリン酸化酵素がアストロサイトに高発現していることを見出した。そこで、*Sik3* の機能に注目し、KO マウスを入手して解析を行ったところ、活動リズムが非常に不安定であり、また、昼夜の光条件の変化に十分に適応できない(光同調不全)マウスであることが明らかになった。このような概日リズムの劇的な異常を示すマウスはこれまで報告がなく、概日時計の安定性(堅牢性)や柔軟性(同調性)の維持に関与する重要な因子であることが示唆された。また、このマウスからアストロサイト株を樹立し、前述の *Per2-luc* リズムを測定したところ、活動リズムと同様に概日リズム周期の不安定性が観察された。更に興味深いことに、個体の活動リズムが延長したのに対して、細胞の平均リズム周期は数時間も短縮していることがわかった。以上の結果から、脳のリズム制御中枢において、アストロサイトは周期の安定化のみならず、リズム周期を厳密に規定する役割も果たすことが示唆された。SIK3 は特定の基質をリン酸化し、下流のシグナル伝達経路の調節を介して機能していることが示唆されているが、中枢神経系では報告が無かった。そこで、SIK3 の基質を探索した結果、時計タンパク質のひとつである PER2 をアストロサイトでリン酸化していることが明らかになった。更に、SIK3 は PER2 を時刻依存的にリン酸化し、PER2 の分解を促進していることがわかった。以上の結果から、SIK3 はアストロサイトにおいて、時計タンパク質の安定性を制御し、概日リズムの堅牢性を保障していることが示唆された。光同調性への関与については現在解析中である。

#### 研究テーマ D「*Sik3* KO マウスの概日リズム制御中枢における細胞間リズム同期変異解析」

概日リズムの堅牢性(安定性)には、細胞毎に概日リズム周期が異なるとの報告があるため、細胞間リズム同期による周期の調整が重要であると考えられる。そこで、SIK3 欠損によるリズム周期の不安定化が細胞間リズム同期の破綻に起因するかどうかについて、解析を行った。まず、*Sik3* KO マウスから採取したアストロサイト株でシングルセル発光イメージングを行い、*Per2-luc* の発光リズムを指標として、細胞間のリズム同期をについて野生型細胞株と比較解析した。その結果、野生型アストロサイトでは、数週間細胞間の同期率が非常に高く、細胞全体のリズムが持続したのに対し、*Sik3* KO アストロサイトでは、徐々に細胞毎のリズム位相のずれが拡大し、各細胞のリズムがバラバラになった。従って、SIK3 は細胞間のリズム情報の伝達とリズム同期に必須の調節因子であることが示唆された。更に、*Sik3* KO マウスの SCN のスライス培養で、同様に細胞間リズム同期に関し

て発光リズムイメージングを実施したところ、正常では細胞間リズム同期が1か月以上持続するのにに対し、KO SCN では細胞間のリズム位相がばらばらになり、約1週間で SCN 全体のリズムが消失することを見出した。以上の結果から、SIK3 はアストロサイト間で、また、SCN の神経とアストロサイトを含む細胞間で、細胞毎のリズム同期を制御しており、SIK3 の欠損により同期が失われてリズムが不安定化することが示唆された。

#### 研究テーマ E「アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスの作製とリズム解析」

既に述べたように、SIK3 はアストロサイトで PER2 の分解促進作用に関与し、概日リズムの堅牢性という概日時計の特性を規定するために不可欠な分子である。一方、SIK3 は神経にも発現し、光同調に関与している可能性がある。そこで、SIK3 がアストロサイトと神経でそれぞれどのような機能を持つのかを分子解剖の手法で明らかにすべく、アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスを作製した。このマウスを用いて、現在行動リズム解析を実施している。

#### 研究テーマ F「リズム制御中枢で概日振動するケモカイン欠損が概日リズムに及ぼす影響」

上述の研究と並行して、研究者らは SCN におけるアストロサイトの局在変化リズムを制御する分子の探索を行い、SCN で発現が概日振動するケモカインとその受容体に注目した。このケモカインは、血液幹細胞やリンパ球、神経細胞の一部で報告があり、ケモカインの濃度勾配に反応して、受容体を発現する細胞が特定の位置に遊走(移動)することが知られている。同じケモカインが SCN で夜高く昼間は低い発現リズムを示すことから、SCN に集積するアストロサイトの遊走を誘導する分子として有力であると考えた。そこで、このケモカインと受容体それぞれのアストロサイト特異的 KO マウスを作製した。最近マウスの作製に成功し、現在行動リズムや培養アストロサイトのリズム異常の有無について解析中である。

### 3. 今後の展開

今後は引き続き以下の研究を計画しており、SCN における神経とグリアの相互作用の詳細を明らかにする計画である。

#### (1) アストロサイト・神経特異的 *Sik3* KO マウスの行動リズムや概日リズム同期異常の解析

研究成果の項で述べたように、概日リズムの堅牢性と同調性を制御する SIK3 が、アストロサイトでどのように機能するのか、神経での機能との違いは何かを明らかにする手始めとして、アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスの解析を継続して行う。同様に、神経特異的 KO マウスの作製も計画しており、概日リズム制御の鍵となるリン酸化酵素の機能解析を通して、概日リズムを制御する2種の異なる細胞の機能分担や相互作用が明らかになると期待される。

#### (2) SIK アイソフォームの概日リズム制御への関与の解析

SIK ファミリーには、SIK3 以外に SIK1 と SIK2 というアイソフォームが存在し、いずれも代謝の調節に関与することが報告されている。中でも SIK1 は中枢神経系でも発現しており、研究者らはアストロサイトでの発現を確認している。*Sik1* mRNA は光照射したマウス SCN で発現の劇的な亢進が認められ、かつ発現に概日リズムを示すことから、概日リズム制御への関与、特に光入力系の制御との関連が示唆される。現在既に *Sik1* KO マウスを入手しており、活動リズムや培養アストロサイトでのリズム解析を実施し、*Sik3* KO マウスや細胞との比較解析を計画している。

#### (3) SIK3 の新たな基質の同定と異なるシグナル伝達経路を介した機能に関する解析



SIK3 の下流については、脳以外の組織や器官において複数の異なる基質が報告されている。その中には、転写の co-activator である CRTC (CREB-regulated transcription coactivator) や co-repressor の HDAC II (histone deacetylase class 2) がある。いずれも SIK3 によるリン酸化で機能が制御されるとの報告があり、それらの下流で転写調節を受ける遺伝子の一部も報告されている。脳では我々が同定した PER2 以外に報告はないが、これまでのアストロサイトを用いた実験で、研究者らは CRTC や HDAC 阻害剤で、細胞の分子リズムが変容することを見出している。他のリン酸化酵素でも報告されているように、SIK3 が複数の基質をリン酸化し、異なる機能を制御している可能性があるので、概日リズム制御に関与する別の基質(時間特異的にリン酸化が変化するタンパク質)をプロテオミクス研究の専門家との共同研究で同定する計画である。

#### (4) アストロサイトの遊走リズムを制御する分子解析と、局在変化の機能的意義の解明

成果の項で述べた概日振動ケモケインとケモカイン受容体がアストロサイトの局在変化の概日リズムを制御しているのか、そうであるとすれば、KO マウスでリズムが消失した場合、概日リズムにどのような変異が見られるのかを解析し、アストロサイトの遊走リズムの生理学的意義を明らかにする。また、神経とは異なる増殖、細胞移動、細胞間相互作用といった特性を裏打ちする分子機序を明らかにし、概日リズム制御以外の脳機能発現にも同様の機能を有するか否かについて、他の神経科学者との共同研究で明らかにする予定である。

#### (5) GAP 結合を介したアストロサイトの概日リズム同期制御の分子基盤解明

本研究でアストロサイトが細胞間で同期し、この性質が SCN 内の細胞間リズム同期と活動リズムなどの堅牢性の保持に繋がる可能性が示された。そこで、今後は GAP 結合が細胞間リズム同期や行動、生理リズム安定性に及ぼす影響について解析を行う。具体的には、アストロサイトの GAP 結合を構成する connexin43 の KO マウスやアストロサイトを用いて、細胞間同期や SCN ネットワークのリズム同期に異常が見られるかどうかについて検討する。また、KO マウスで活動リズムがどのように変容するのかを観察し、細胞間同期の消失が概日リズムに及ぼす影響を詳細に解析する。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

#### (研究者)

研究のねらいの項で挙げた 3 つの目標達成を目指してこれまで研究を進めて来た。そのうち、①と③の目標については一定の結論を導き出すことに成功したと考えている。②に関しては、この3年間で5種の遺伝子改変マウスを作製あるいは入手し解析したが、更に少なくとも2種のマウスの解析が必要であり、来年度には実施可能であると考ええる。研究実施体制については、近畿大学では経験のある研究補助員2名の雇用で概ね順調であったが、山口大学では実験経験者が見つからず、一定の訓練期間を必要とした。また、遺伝子改変動物については、場所の移動の必要から約半年から1年の間実験が出来ない時期があった。このように、当初の計画通りとは行かなかったが、それでも期待以上の結果が出たことについては評価できると考える。論文については、これまでのさきがけ研究の成果を2報投稿準備中であり、年度内の投稿ないし出版を目指している。また、続報についても来年度には複数の論文にまとめる予定であり、さきがけ研究は順調に進展したと考える。

研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果については、現在はまだ研究が進行中

であるため、具体的な効果について評価できる状況にはない。一方、現在の研究テーマである、脳におけるグリアの能動的寄与の解明研究は、神経科学研究界において立ち後れているグリア機能研究に新たな知見を提供するものである。アルツハイマー病の一部など、神経が原因で引き起こされると考えられて来た複数の脳疾患が、実はグリアの機能不全に原因があるということが最近報告されるなど、脳におけるグリア機能の研究は医学的見地からも重要性を増している。本研究で、概日リズム制御においてグリアが重要な機能の一端を担うことが示唆され、今後更にグリア機能の詳細が明らかになると期待される。本研究の成果が、神経科学の基礎研究の進展にグリア機能解明という点で寄与し、更には、グリアが関与する精神神経疾患の予防や治療戦略の基盤を提供する可能性は十分にあると考える。また、概日時計が関与する生活リズムは、その乱れが代謝疾患、免疫疾患、癌といった疾患に繋がるとの報告が増えて来ているが、本研究で扱っている概日リズム制御機構に関しても、リズムと代謝が同じ遺伝子変異で惹起される例を見出す(*Sik3* KO マウス)など、未だ解明されていない概日リズムと疾患とのリンクの解明に繋がる可能性を有する。この意味でも、本研究は将来の医学研究や医療の進展に寄与する可能性を包含すると考える。

(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)。

本研究は、マウスで概日リズム中枢である視床下部 SCN においてアストロサイトが昼夜で分布が変わるとする予備的データなどに基づいて、SCN 活動の概日リズムの発振・同調などにアストロサイトが関わるという興味深い可能性を検証する研究として提案されたものである。その後アストロサイト細胞株やプライマリーカルチャーを用いる解析、各種の遺伝子改変マウスの解析などを精力的に進めてきたが、十分に説得性あるデータはまだ纏まっていないようである。今後はテーマを絞り着実な実験を積み上げることにより、成果を論文として世に問うことが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hayasaka N\*, Aoki K., Kinoshita S., Yamaguchi S., Wakefield JK., Tsuji-Kawahara S., Horikawa K., Ikegami H., Wakana S., Murakami T., Ramabhadran R., Miyazawa M., Shibata S. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in *Rgs16* knockdown mice. PLoS ONE, 2011, 6: e17655.
2. Fukuda H., Tokuda H., Hashimoto S., Hayasaka N\*. Quantitative analysis of phase wave of gene expression in the mammalian central circadian clock network. PLoS ONE, 2011, 6: e23568.
3. Hayasaka N\*, Nagai N., Kawao N., Niwa A., Yoshioka Y., Mori Y., Shigeta H., Kashiwagi N., Miyazawa M., Satou T., Higashino H., Matsuo O., Murakami T. In vivo diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke. PLoS ONE, 2012 7: e32342.

4. Miyoshi Y., Yoshioka Y., Suzuki K., Miyazaki T., Koura M., Saigoh K., Kajimura N., Monobe Y., Kusunoki S., Matsuda J., Watanabe M., Hayasaka N.\* A New Mouse Allele of Glutamate Receptor GluR2 with Cerebellar Atrophy and Progressive Ataxia. PLoS ONE, 2014, 9: e107867,

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

受賞

- 1) 近大医学会賞受賞 2012 年 7 月

学会発表(シンポジウム)

- 1) 早坂直人, 小浦美奈子, 松田潤一郎, 竹森洋

リン酸化酵素が概日リズムの位相を決める.

第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 88 回日本生理学会大会合同大会シンポジウム 2011 年

- 2) 早坂直人

概日リズムの安定性と同調性を制御する新たなリン酸化シグナル.

第 19 回日本時間生物学会学術大会シンポジウム 2012 年

- 3) Hayasaka N.

A role for Salt-inducible kinase 3 in the central circadian pacemaker in mammals: phosphorylation-dependent degradation of the clock protein.

XIII Congress of the European Biological Rhythms Society (Symposium) 2013 年