

研究報告書

「代謝の時間制御を目指した食事時計の多臓器恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 羽鳥 恵

1. 研究のねらい

哺乳類の概日時計は食事や外界からの光入力によって時刻調節を行う。網膜神経節細胞に発現している青色光感受性の光受容体メラノプシンが光位相調節を担う。メラノプシン細胞からの光情報は概日時計の中核である脳の視交叉上核に伝えられ、視交叉上核から全身へとその情報が伝達されて光位相シフトが引き起こされる。視交叉上核での概日時計遺伝子群の日内変動は昼行性と夜行性の生物で保存されているにも関わらず光に対する生体としての反応は逆であるが、その原因は不明である。一方、食事という観点では、摂食は生命維持に必須であり、私たちは日々決まった時間帯になると空腹を覚える。この食事リズムは視交叉上核を破壊しても残るため、概日時計と摂食は互いに独立しながら相互作用し、生体の恒常性の維持に寄与すると考えられる。食事および光の両入力因子が全身の臓器に存在する概日時計にどのように情報を伝達し、それがいかにクロストークして生体機能として現れるのかの理解は、恒常性維持とその破綻機構の理解にもつながるであろうと考えた。概日時計研究には使用実績のない昼行性霊長類であるコモンマーモセットを主に用いて、光および食事が概日時計をはじめとする全身の機能に与える影響を理解する。

2. 研究成果

(1) 概要

哺乳類の光応答反応は「見ること」である視覚と「視覚以外の光応答」である非視覚応答の 2 種に大別される。実験マウス *Mus musculus* を使用した研究により、数%の網膜神経節細胞に青色光感受性のオプシンであるメラノプシンが発現し、視細胞層の桿体・錐体に加えて第三の光受容細胞として機能することが明らかになってきた。メラノプシン発現網膜神経節細胞は自身が感受した光のみならず、桿体・錐体からの光情報を統合して脳に伝達し、概日時計の位相調節、睡眠、瞳孔収縮、夜行性生物であるマウスでは光回避行動などの非視覚応答を担う。そのためメラノプシンの機能障害は片頭痛や睡眠障害など全身にわたる不調の一因であると考えられる。コンピューターのモニター画面のような人工的な光源から発せられるブルーライトや夜遅くまでの光照射環境はヒトの概日リズムを乱す原因であり、概日時計の乱れはメタボリックシンドローム、肥満、癌、冠状動脈性心疾患や認知症などの疾病を引き起こす可能性を高めることが疫学的に知られている。このように非視覚光応答は非常に重要な生理機能を担うにも関わらず、その研究は視覚応答と比べ大幅に遅れている。特に、霊長類での研究はほとんど行われていない。

コモンマーモセット *Callithrix jacchus* はラットと同程度の重量の小型霊長類である。活動・摂食・飲水の量や時間帯を自動計測する系が存在していなかったため、そのセットアップに取り掛かり、基本的な概日リズムやパラメータを計測することが出来るようになった。昼行性であ

り、また、外界の光環境の入力を排して行動リズムの周期を測定したところ、非常に強固な概日時計の発振系を有していることを明らかにした。血液を用いた遺伝子発現解析から、概日時計遺伝子群がヒトに類似した日内変動パターンを示すことを見出した。コモンマーモセットの網膜にメラノプシンが発現していること、480 nm 近傍の吸収極大を示す光感受性を保有すること、以前に同定したメラノプシン特異的な sulfonamide 系阻害剤が作用することを明らかにし、その阻害剤を用いて昼行性霊長類でのメラノプシンの *in vivo* での作用を明らかにする試みを行った。食事エネルギー代謝に関しても系の立ち上げや測定を試みた。

(2) 詳細

メラノプシンと非視覚応答

視交叉上核の時計は目からの光入力を受ける。130 年以上に渡り桿体・錐体が唯一の光受容細胞だと考えられてきたが、数%の網膜神経節細胞(RGC; retinal ganglion cell)にメラノプシンという青色光感受性の光受容タンパク質が発現していることが 2000 年に見出された。メラノプシン発現網膜神経節細胞(mRGC; melanopsin-expressing RGC)は視細胞層の桿体・錐体に加えて第三の光受容細胞として機能し、概日リズムの位相調節や瞳孔収縮、睡眠の調節や片頭痛の光による悪化などの視覚以外の光応答(非視覚応答)を担い(図 1)、最近、mRGC の細胞内シグナル伝達機構も明らかになりつつある(Mure*, Hatori* *et al.*, *Neuron* 90:1016-1027, 2016)。

コモンマーモセットにおけるメラノプシン

非視覚光応答の特異的な調節を可能にしたいと考え、メラノプシンを標的とした薬剤スクリーニングを行い、8 万個の化合物からメラノプシン特異的なアンタゴニストを同定した(図 2 Jones*, Hatori* *et al.*, *Nature Chemical Biology* 10: 630-635, 2013)。この化合物はマウス個体において瞳孔収縮や光を痛みと感ずることによる回避行動を減弱させた。このメラノプシンアンタゴニストを利用し、霊長類での非視覚入力メカニズムを世界で初めて明らかにする足がかりとすることを長期的な目的とした。進化的にヒトにより近く昼行性である霊長類のコモンマーモセット

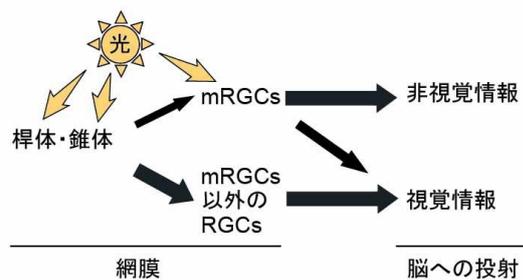


図 1 網膜の3種の光受容細胞
矢印の幅は情報伝達の程度を反映する。目が受容した光情報は RGC を介して脳へ伝達される。網膜あたりマウスは約 2,000 個、ヒトは約 20,000 個の mRGC を持つ。

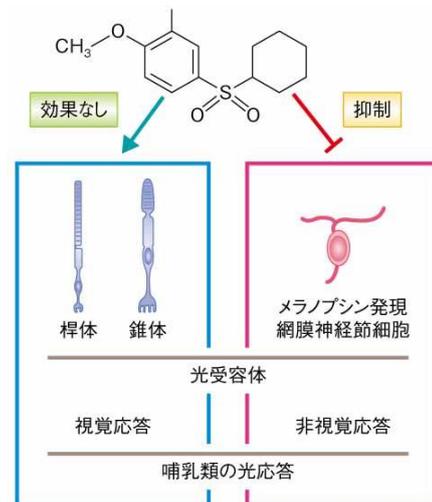


図 2 メラノプシンに特異的に作用するアンタゴニスト

桿体および錐体に発現する光受容体および視覚応答には影響を及ぼさず、メラノプシン発現光受容細胞(mRGC)に由来する視覚以外の光応答(非視覚応答)を減弱させる。

に投与して mRGC 機能の薬理的な調節を可能にすると共に、アンタゴニストを投与された動物を詳細に観察することによってメラノプシンの新規機能を見出したい。

コモンマーモセットのメラノプシンの配列は発表されていないため、ゲノム情報およびゲノム PCR を組み合わせることで塩基配列を決定した。この配列に基づいてプローブを設計し、自然死を迎える個体からの死後組織供与を受けて網膜切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、コモンマーモセットの網膜にメラノプシン mRNA の発現を見出した。メラ

ノプシンは青色に吸収極大をもち、光の照射によりイノシトールトリリン酸経路が活性化され細胞内のカルシウム濃度が上昇する。哺乳類培養細胞にメラノプシンを強制発現させ、青色光を照射したのち細胞内のカルシウム濃度を測定してメラノプシンの活性化レベルの変化を評価する系を立ち上げた。この系を用いて、マウス、コモンマーモセットおよびヒトのメラノプシンの青色光照射による応答を測定した。上記 3 種いずれの生物のメラノプシンでも青色光による活性化が観察され(図 3A)、その光応答性はメラノプシン阻害剤の投与によって用量依存的に減弱した(図 3B)。クローニングしたコモンマーモセットのメラノプシンが光受容体として作用しうる可能性とメラノプシン阻害剤の有効性を支持した。メラノプシン阻害剤を成体に投与して pharmacokinetic assay を行い、安全性に問題がないこと、および非視覚応答への影響を解析するにあたり最適な時間幅を明らかにした。メラノプシンの霊長類における *in vivo* の機能を明らかにするべく瞳孔収縮の測定方法など、様々な非視覚応答の測定系を検討している。安定性が高く、かつ動物の苦痛度が最も低い方法を最優先している。

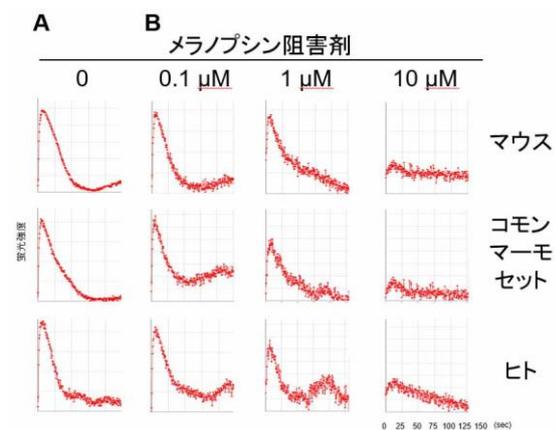


図 3 各種生物のメラノプシンの光応答性
青色光照射と同時にカルシウム量変化を
Fluo-4 を用いて検出した。

メラノプシン細胞の脳投射

網膜の細胞から脳への投射先を見出し、投射先の機能から網膜細胞の新たな役割を発見するというアプローチは有用である。以前、すべての mRGC を標識できるメラノプシン Cre (*Opn4^{Cre}*) マウスを作製し、アルカリフォスファターゼ (AP) レポーターマウスを掛け合わせた (*Opn4^{Cre/+}; Z/AP* マウス)。メラノプシン抗体を用いた免疫染色とほぼ同数 (97% 一致) の陽性細胞が RGC 層に限局して観察され、*Opn4^{Cre}* マウスの特異性が確認できた。概日時計の中核である視交叉上核や既知の非視覚応答を担う膝状体間小葉、視蓋前域オリブ核に陽性シグナルが観察できた。さらに、外側膝状体や上丘へも投射していることを見出した (Brown *et al.*, *PLoS Biol.* 8:e1000558, 2010)。このようにマウスでは、メラノプシン細胞をはじめとする RGC が投射している最終脳部位が明らかになってきている。コモンマーモセットに関しては、網膜から脳への投射先を明らかにする試みが現在世界中で行われている。そこで、マウス以外の生物にも広く応用可能な実験系が必要であると考えた。ニューロンの経路を追うことができるほどの感度を持つ解像度の高い精緻な蛍光像を得られるかが非常に重要であるため、十分に検討を重ねた。

様々なウィルスベクターを検討し、組換え AAV ベクター 2 型バリエーション 2 (以下 rAAV2/2 と略記) が最も高く安定な遺伝子導入効率を示すことを見出した。rAAV は導入部位に局所的に感染するため、特異的な標識に適している。これまでに以下の進展を得ることができた。緑色の EGFP および赤色の tdTomato をファルネシル化させて膜局在型とし、これらの蛍光タンパク質を Cre リコンビナーゼ依存的に発現させる組み換えウィルスを作製した。高力価の rAAV2/2 を作製し、それぞれの rAAV2/2

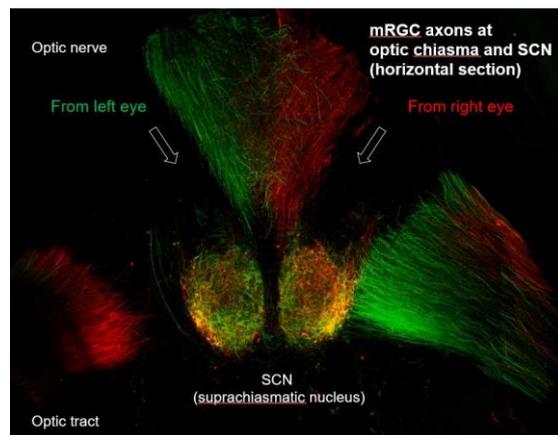


図 4 mRGC からの視交叉および視交叉上核への神経投射

を 8-12 週齢 *Opn4^{Cre/+}* マウスの片目ずつに導入し、2 週間後に脳を還流固定し、40 μ m 厚の水平もしくは冠状脳切片を作製して蛍光像を取得した(図 4)。両 rAAV2/2 においてファルネシル化の効果から、軸索の分岐をシングルニューロンレベルで追える程の鮮明なイメージの取得に成功した。将来的には種々の Cre ウィルスとの組み合わせにより、様々な生物での網膜からの投射を明らかにできると思われる。なお組み換えウィルスの開発は米国ソーク研究所のパンダ博士と共同で開始した。なお、電子顕微鏡用タグ miniSOG を用いての RGC 標識の試みも行った(Bushong *et al.*, *Microscopy and Microanalysis* 21:231-238, 2015)。

3. 今後の展開

全ての光情報は RGC を介して脳へ伝達される。哺乳類の RGC は形態の違いより 22 種類以上に分類されるが、サブタイプ特異的な遺伝子マーカーをもつ RGC は mRGC を含め数種類しか報告されていない。mRGC の生理機能を知る上でその投射先の包括的な解明は緊喫の最重要課題のひとつであろう。さらに、生物種を超えてメラノプシンの機能を探る重要なツールとしてメラノプシン特異的に作用する化合物を用いることによって、これまで研究が行われていなかった霊長類での非視覚光入力メカニズムの理解を深める。メラノプシン標的薬剤は新たなリズム障害治療薬の候補にもなりえるであろう。アゴニストには光を浴びなくても時差ボケを容易に解消することが、アンタゴニストには片頭痛の光による悪化を緩和することが期待できる。メラノプシンの研究の歴史は桿体・錐体と比較して短い。桿体・錐体に焦点を当てた研究とは違う視点を持つことにより、網膜研究に新たなページを加えることができればと思う。

実験モデルマウスの多くの系統では睡眠ホルモンであるメラトニンの合成酵素を欠損してしまっているが、コモンマーモセットではメラトニンが合成され、分泌にも日内リズムがある。昼行性の霊長類であるコモンマーモセットを扱う研究を今後さらに発展させ、ヒトの概日リズムの分子機構や、ひいては睡眠などの時計関連現象への理解への一助になれることを目指したい。

肥満および肥満に起因する健康障害を有する肥満症が世界的に問題となっている。肥満症は耐糖能障害、脂質異常症、高血圧といった合併症を伴い、治療が必要な死につながる疾患である。肥満は遺伝的要因と環境要因の両方に影響される。環境要因の改善によって肥満を解消するためにはエネルギー摂取量を減らすかエネルギー消費量を増やせばよいはずであり、それぞれ食事制限と運動が推奨されている。ところが食事制限にはリバウンドが伴い、健

康上の問題で運動ができない場合も多い。摂食の内容や量のみならず時刻もエネルギー代謝に重要であること、つまり概日時計が肥満や関連疾患を予防する一要素であることを以前に明らかにした。未発表であるが、本さがけ期間中に食事による概日時計の調節や肥満等の防止に関しても研究を遂行し、その理解への手掛かりを得つつある。今後さらに発展させたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況に関しては、未発表のデータを含めると、研究開始当初の目標は概ね達成できたといえる。また、現在進行中ではあるが領域内の共同研究を開始し、新たな研究分野との接点を広げることができた点は当初の目標以上の展開である。その成果は新たな研究ツールを提供し、また、社会的にもインパクトを持つことができる可能性を秘めているため、今後迅速に論文発表へと進めたい。

研究の進め方に関しては、コモンマーモセットの実験をさがけの支援のおかげで開始することができたが、始めてみたら覚悟していた以上に難しい面も多く苦労した。非ヒト霊長類を扱える補助員の確保は、経験やその他の条件から大変に難しかった。補助人員を見つけることができれば、より多方面の研究を展開することができた可能性は否定できない。今後も継続するために研究環境を改善していきたい。さがけ開始ののち一年後から基本的な分子生物学・細胞生物学の実験を行う場所を得ることができた。万全な環境を得るのは難しいとは思いますが、よい人生経験ではあった。

総合的には、さがけの支援のおかげで研究を軌道に乗せることができた。当初の状況を乗り越え、新しいことに挑戦することができた。やりきらなかつたという後悔は一切なく、素晴らしい共同研究者にも恵まれ、現時点では帰国当初の苦労を大きく上回っていると考えられる。同時に、改善すべき点にも気付くことができたため、今後に生かしたい。

(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)。

(研究総括)

概日時計と摂食リズムは互いに独立しながら相互作用し、生体恒常性の維持に寄与している。羽鳥恵研究者は留学中に、マウスにおいて同じカロリーの高脂肪食を負荷しても、摂食時間に制限を加えると肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝が改善されることを見出した。しかしながら、マウスは夜行性であり、夜を中心にダラダラ食いをする習性があり、ヒト及び霊長類と非常に異なる。そこで、羽鳥研究者は霊長類であるマーモセットで同様の実験系を立ち上げるため実験室等のセットアップを行った。現在迄にマーモセットが昼行性であり強固な概日時計の発振系を有すること、高脂肪食負荷により肥満を来すことを見出している。以上よりマーモセットにおいて摂食リズムを変えることが、概日時計ならびに肥満にどのような影響を与えるかという重要な問題に対する回答が得られる日が近いと期待される。マーモセットの系を立ち上げたことにより、ヒトにおける概日時計と摂食リズムによる生体恒常性維持機構の理解が大いに進展すると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Mure LS*, Hatori M* (*equal contribution) et al., Melanopsin-Encoded Response Properties of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. <i>Neuron</i> 90(5):1016-1027 (2016) |
| 2. Bushong EA et al., X-ray microscopy as an approach to increasing accuracy and efficiency of serial block-face imaging for correlated light and electron microscopy of biological specimens. <i>Microsc Microanal.</i> 21(1):231-8 (2015) |
| 3. Torii et al., Violet Light Exposure Can Be a Preventive Strategy Against Myopia Progression. <i>EBioMedicine</i> 15:210-219 (2017) |

(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)

1. 【英文総説】 Hatori M et al., Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies. *NPJ Aging Mech Dis.* 3:9 (2017)
2. 【英文総説】 Hatori M and Panda S. Response of peripheral rhythms to the timing of food intake. *Methods Enzymol.* 552:145-161 (2015)
3. 【受賞】 公益財団法人光科学技術研究振興財団 平成 27 年度研究表彰 受賞 (2016)
4. 【受賞】井上リサーチアワード 受賞 (2015)

以上の他に

和文総説	10 件
招待講演	18 件