

共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：京都府立医科大学

職名：教授

氏名：八木田 和弘

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：キメラマウスを用いた概日リズム成立の階層縦断的解析
2. 再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄
3. 研究期間： 短期研究課題 ・ —長期研究課題
(平成24年4月1日～平成25年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

我々は、概日時計の発生メカニズムの解明を目的として本共同研究を提案した。概日時計のリズム発振は受精卵や初期胚には見られず、出生後にはほぼ全ての体細胞で概日時計の発振が見られることから、哺乳類概日時計は発生・胎生期に形成されることが示唆されている。しかし、胎生期のどの時期にどのようなメカニズムで概日時計振動体が形成され、自律振動をはじめめるのかは現在まで分かっていない。

これまでに我々は、マウス ES 細胞をモデル系として利用し、細胞分化誘導技術と遺伝子操作技術を駆使した、哺乳類概日時計発生過程の解析を行った。マウス ES 細胞を培養下で分化誘導を行い、ルシフェラーゼを指標とした概日時計振動の発光イメージング法によって、細胞分化過程における概日時計振動の解析に成功した。さらに、一度分化させた細胞を、iPS 細胞作製技術を利用してリプログラミングを誘導し、概日時計振動体の変化を解析した。これらの結果から、概日時計の発生は、細胞ひとつひとつのレベルで自律的にプログラムされていることを明らかにした(Yagita et al,

PNAS, 2010)。この結果を踏まえ、さらに、生体レベルでの概日時計の発生を理解するには、「細胞レベルの内在性プログラム」と「環境要因」の関係も含めた統合的研究が必須になる。我々は、概日時計の発生メカニズムを、マウス胚を用いた発生工学とイメージング技術を駆使して、統合的に理解することを目的としている。

平成24年度の共同研究では、概日時計の周期に異常を来す遺伝子変異 ES 細胞に概日時計をモニターできる蛍ルシフェラーゼを用いた発光レポーターを導入し、これをマウス胚盤胞にインジェクションして、キメラマウスを作製した。このキメラマウスの E13.5 胚より MEF を採取し、変異 ES 細胞由来の MEF が示す概日リズムを解析した。その結果、変異 ES 細胞由来の MEF では野生型 MEF に比べて有意な周期異常が確認された。この周期異常は *in vitro* でこの変異 ES を分化誘導したときに形成される概日時計の周期異常と同様であった。これらの結果から、*in vitro* での分化誘導でも、*in vivo* の発生過程における遺伝子変異に伴う概日リズムの周期異常を再現できることが確認できた（論文投稿中）。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

・論文

Kazuhiro Yagita, Yasuhiro Umemura Masashi Wada, Junko Yoshida, Yoshiki Tsuchiya, Yutaka Inada, Hitomi Watanabe, Gen Kondoh, Junji Takeda, Hiroshi Ito, Hitoshi Inokawa, Kyoji Horie. *In vitro* circadian clock formation assay with mutant ES cells. (Submitted)

・学会発表

<招待講演>

- 1) 八木田和弘. ES / iPS 細胞の体内時計研究への応用, 産業総合技術研究所セミナー, 高松, 2012年4月27日
- 2) Kazuhiro Yagita. ES cell-based assay system for analyzing the circadian phenotypes in mammals. UTSouthwestern Medical Center seminar, Dallas, USA. 2012, May, 17.
- 3) 八木田和弘. ES / iPS 細胞で解く体内時計の成立原理. 岡山大学理学部セミナー, 岡山, 2012年7月19日
- 4) 八木田和弘, 体内時計の発生・発達・老化および疾患との関連, ニューロサイエンスセミナー, 京都, 2012年7月12日
- 5) 八木田和弘. 体内時計の発生・発達, 久留米大学小児科学セミナー, 久留米, 2013年2月27日

6) 八木田和弘 分化に伴う細胞自律的な哺乳類概日時計の発生とその破綻 東北大学脳科学研究センター講演会 仙台 2012年12月10日

<学会発表・特別講演等>

1) Kazuhiro Yagita, Cell-autonomous development of mammalian circadian clock during the differentiation culture of ES cells. International Conference for Histochemistry and Cytochemistry 2012, Kyoto, 2012, Aug. 29.

2) 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回行動神経内分泌研究会, 京都, 2012年8月30日

3) 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年9月9日

4) Kazuhiro Yagita, ES cell-based approach elucidating the integrated physiology of mammalian circadian systems. 4th International Symposium on Photic Bioimaging 2012, Sapporo, 2012, Sep. 17.

<学会発表・シンポジウム>

1) 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年6月22日(オーガナイザー)

2) Kazuhiro Yagita, ES cell-based in vitro evaluation system of circadian clock phenotypes in mammals 第35回日本分子生物学会ワークショップ(オーガナイザー) 横浜 2012年12月14日.

3) 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90回日本生理学会シンポジウム(オーガナイザー) 東京 2013年3月27日