

平成27年5月27日

## 平成26年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：京都府立医科大学医学研究科

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：CRISPR/Cas9法とイメージング技術を駆使したマウス体内時計の発生メカニズム解明
2. 再生医科学研究所共同研究者： 近藤 玄 教授
3. 研究期間：平成26年4月1日～平成27年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

#### 未解明の重要テーマ：概日時計の発生

概日リズム（サーカディアンリズム）はほとんどの生物に認められる普遍的な生命現象であり、内在性のリズム発振機構である概日時計によって生み出されている。概日時計は、一連の時計遺伝子群が構成する「転写-翻訳フィードバックループ」と呼ばれる転写ネットワークが発生させる分子レベルの「振動」によって成立すると考えられている。

概日リズムは、ヒトでも外部環境への生理機能の適応など重要な役割を担っている。うつ病を代表とする気分障害に概日リズム障害が密接に関連している事実（Haderら、*Ann.Med.*,2005など）や、交代制勤務の人々に見られる種々の健康障害が概日リズムの乱れに起因するものが少なくないこと（Straifら、*Lancet Oncol.*, 2007など）は、概日リズムを制御している概日時計（体内時計）の破綻が、多くの疾患や症状の誘因のひとつとなることを示している。

そのなかで、発生発達期における概日時計の形成過程が関係するのではないかという可能性が想定されている。しかし、現在、概日時計の発生過程の詳細や具体的なメカニズムは、胚や胎仔を用いた解析の困難さもあり、ほとんど解明されていない。つまり、概日時計の発生は、生後の心身の恒常性維持に影響する可能性がある。このような、重要なテーマであるにも関わらず、概日時計の振動開始機構や周期長決定機構など、実体はほとんど未解明のままであった。

概日時計は受精卵や初期胚には見られず、胎児期に形成されることが示唆されている。我々は、ES細胞をモデル系として用い、ES細胞には概日時計がみられないこと、しかし、*in vitro* で分化誘導することにより概日時計が形成されてくることを見だし、さらに、分化した細胞をリプログラミングしてiPS細胞にすると再び概日時計が消失することを、世界で初めて明らかにした (Yagita et al, *PNAS*, 2010)。

この成果を踏まえ、我々は、これまで概日時計研究には無縁であった幹細胞・発生工学や遺伝子発現イメージングの最先端技術を積極的に取り入れ、概日時計の形成メカニズムを、発生過程に焦点を絞り、培養細胞から個体組織まで一貫して解析することを目指した。そこで本研究では、自閉症関連疾患であるRett症候群のモデルマウスである、MeCP2遺伝子変異マウスを対象として解析を行った。Rett症候群は自閉症症状を呈し、高頻度に患児の睡眠障害が見られることが臨床現場では古くから知られていたものの、実際にそれが概日時計のメカニズム異常に起因するのかどうか、詳細な解析はこれまでほとんど検討がされていなかった。本研究課題では、mPER2::Luc受精卵にCRISPR/Cas9法でMeCP2遺伝子破壊を行い、ワンステップでmPER2::Luc / MeCP2欠損マウスを作製した。

作製したmPER2::LucノックインMeCP2欠損マウスの行動リズムを測定したところ、リズム自体は弱いながらも観察されるものの、非常に乱れた不安定な行動リズムを示した。そこで、行動リズムに加え、視交叉上核全体、視交叉上核単一細胞レベル、という各階層レベルでmPER2::Luc発光レポーターの概日リズム解析を行ったところ、視交叉上核ニューロンのmPER2::Lucリズムが優位に減弱していることが確認された。この結果、MeCP2欠損により、哺乳類概日リズムの中核である視交叉上核における概日時計発振不全が生じることが明らかとなり、Rett症候群の睡眠リズム異常が概日時計の障害に起因する可能性が示唆された (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

1. Tsuchiya Y, Minami Y, Umemura Y, Watanabe H, Nakamura W, Ono D, Takahashi T, Honma S, Kondoh G, Matsuishi T, **Yagita K\***, Reduced amplitude of mPER2::Luciferase rhythm in the MeCP2 mutant mice SCN., Submit.
2. Okubo N, Fujiwara H, Minami Y, Kunimoto T, Hosokawa T, Umemura Y, Inokawa H, Asada M, Oda R, Kubo T, **Yagita K\***, Parathyroid hormone resets the cartilage circadian clock of the organ-cultured murine femur., *Acta Orthopædica*, In Press. (\*Corresponding author)
3. Umemura Y, Koike N, Matsumoto T, Yoo S-H, Zhen C, Yasuhara N, Takahashi JS, **Yagita K\***, Transcriptional Program of Kpna2 /Importin- $\alpha$ 2 Regulates Cellular Differentiation-Coupled Circadian Clock Development in Mammalian Cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E5039-48, 2014 (\*Corresponding author)
4. 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.*, 588. 459-465, 2014. (\*Corresponding author)
5. 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*, 8, e78306, 2013 (\*Corresponding author)