

平成 28 年 4 月 28 日

平成 27 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：ゲノム改変技術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 27 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

体内時計は全身の細胞に広く備わっており、様々な生理機能の日内リズム（概日リズム）の制御に関与していると考えられている。体内時計は胎生期に形成されることが知られているが、一方で、なぜ胎生後期まで体内時計が抑制され概日リズムが消される必要があるのか、全く分かっていない。これまで我々は、体内時計の発生は細胞分化と関連し(PNAS, 2010)、ES 細胞などの未分化細胞では様々な体内時計抑制メカニズムが働いていることを明らかにしてきた(PNAS, 2014 など)。本研究では、発生工学やゲノム改変技術を応用することで、発生過程で細胞が時間情報をどのように生み出し、それをどのように活用し制御するのか、について検討を行った。

消された体内時計：ES細胞と初期胚

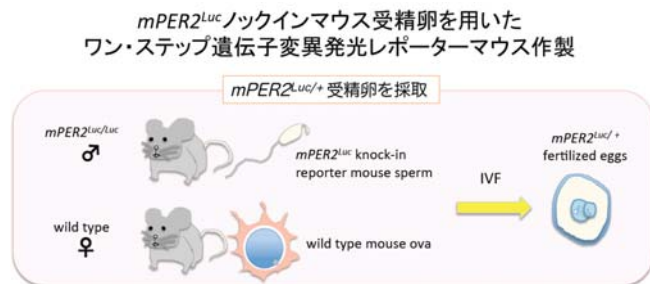
哺乳類の概日リズムの中樞は視床下部にある視交叉上核である。一方で、末梢のほとんどの細胞に体内時計があることが分かっている。さらに、我々は線維芽細胞など培養細胞でも視交叉上核と基本的に同様の体内時計が備わっていることを明らかにしている(Yagita ら, *Science*, 2001)。この唯一の例外が精粗細胞といった「生殖細胞」であり、体内時計のリズムが見られない。生殖細胞にも時計遺伝子は発現しており、概日リズムが無い理由は現在でも分かっていない。さらに、受精卵や初期胚にリズムが見られないことが報告されている。これに加えて、最近申請者は、ES 細胞や iPS 細胞とい

った多能性幹細胞に体内時計の振動が見られないことを発見した(Yagita ら,*PNAS*, 2010)。さらに、ES/iPS 細胞を *in vitro* で分化誘導すると、分化に伴って細胞自律性に約 24 時間周期の体内時計が形成されることを明らかにし、「概日時計は細胞分化と密接に関連する」という新概念構築につながる現象を世界で初めて発見した(Yagita ら,*PNAS*, 2010; Umemura ら,*PLoS One*, 2013)。さらに、我々は最近、DNA メチル化酵素欠損 ES 細胞などで体内時計形成が破綻していることを見出した。これらの細胞の RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析から細胞分化に関わる因子が体内時計の発生にも必須であり、これらの働きによって制御される体細胞型の転写ネットワーク形成が重要であることを発見した(Umemura ら, *PNAS*, 2014)。

一方で我々は、ES 細胞など多能性幹細胞では積極的に体内時計を抑制する「Active Suppression」機序が働いていることを明らかにし、多能性幹細胞や発生初期段階では体内時計が「ただ無い」のではなく「意味のある抑制状態」にあるという新たな視点を提供した (投稿中)。

### マウス発生工学による体内時計形成メカニズム解析

また、再生研共同研究により、*in vivo* での体内時計形成メカニズムについて検討を進め。そのなかで、近藤玄教授との共同研究により、体内時計レポーターの mPER2:Luc ノックインマウスの受精卵に CRISPR/Cas9 法によって遺伝子欠損を導入する方法で、mPER2:Luc / MeCP2 欠損マウスを簡便に作成し、これまで困難であった行動レベルと分子レベルをつなぐ体内時計解析に成功した(Tsuchiya



ら,*Genes Cells*, 2015)。MeCP2 欠損マウスは Rett 症候群モデルとしても知られており、Rett 症候群で合併する睡眠障害のメカニズム理解にもつながる成果となった。

今後は、これらの成果に立脚し、本共同研究では、哺乳類の発生過程で体内時計が抑制されるメカニズムとその生物学的意義を、マウス発生工学とゲノム改変技術を用いて *in vivo* で解き明かしていく。これまでの一連の研究でタイアップしている再生研の近藤玄教授との共同研究で、発生過程における体内時計が生み出す「細胞レベルの時間情報」について検討しているところである。

## 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

(\*Corresponding author)

1. Ohashi M, Umemura Y, Koike N, Watanabe H, Yamada Y, Kondoh G, Yagita K\*, *In vivo* reprogramming induced transdifferentiation disrupts the circadian clock in mouse Wilms Tumor model. (In preparation)
2. Kunimoto T, Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Hosokawa T, Asada M, Oda R, Kubo T, Yagita K\*, A PTH-responsive circadian clock operates in ex vivo mouse femur fracture healing site., *Sci. Rep.*, 6, 22409, 2016
3. Tsuchiya Y, Umemura Y, Minami Y, Koike N, Hosokawa T, Hara M, Ito H, Inokawa H, Yagita K\*, Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period-Length and Temperature Compensation

in Mammalian Cells., *J. Biol. Rhythm*, 31, 48-56, 2016

4. Tsuchiya Y, Minami Y, Umemura Y, Watanabe H, Ono D, Nakamura W, Takahashi T, Honma S, Kondoh G, Matsuishi T, Yagita K\*., Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mouse., *Genes Cells*, 20, 992-1005, 2015
5. Hosokawa T, Tsuchiya Y, Okubo N, Kunimoto T, Minami Y, Fujiwara Y, Umemura Y, Koike N, Kubo T, Yagita K\*. Robust circadian rhythm and parathyroid hormone-induced resetting during hypertrophic differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells., *Acta Histochem. Cytochem.*, 48, 165-171, 2015
6. Oshima T, Yamanaka I, Kumar A, Yamaguchi J, Nishiwaki-Okawa T, Muto K, Kawamura R, Hirota T, Yagita K, Irie S, Kay SA, Yoshimura T, Itami K., C-H Activation Generates Period-Shortening Molecules That Target Cryptochrome in the Mammalian Circadian Clock., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 7193-7197, 2015
7. 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*, 86. 627-631. 2015.
8. 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
9. 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.

## 学会発表

### 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., Molecular Mechanisms of Circadian Clock Development in Mammalian Cells, *Asian Forum on Chronobiology in 2015*, Sapporo, Sept. 7, 2015
- 2: Yagita K., Cellular Differentiation and Circadian Clock Development in mammals., *ICCPB 2015*, Krakow, Aug. 24, 2015
- 3: Yagita K., Epigenetic and Molecular mechanisms suppressing circadian clock in pluripotent stem cells., *4<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Clock 2015*, Kyoto, March 27, 2015

### 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 : 「Circadian clock development: From basic to translational」, 第93回日本生理学会大会 シンポジウム, 札幌, Mar 23. 2016
2. 八木田和弘 : 「"Time in the Cell" Why is the circadian clock suppressed in the pluripotent stem cells?」, BMB2015 シンポジウム, 神戸, Dec. 3, 2015

3. 八木田和弘 : 「Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mice」, 第58回日本神経化学会 理事長企画シンポジウム, 大宮, Sept. 11, 2015