

Studies on the modulation of cellular circadian clock by hormonal cycles, nutrition, and cellular crosstalk

楊, 丹

<https://hdl.handle.net/2324/4496099>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	楊丹			
論文名	Studies on the modulation of cellular circadian clock by hormonal cycles, nutrition, and cellular crosstalk (細胞モデルを用いたホルモンのサイクル刺激、栄養、および細胞間クロストークによる概日時計の調節に関する研究)			
論文調査委員	主査	九州大学	准教授	安尾 しのぶ
	副査	九州大学	教授	古瀬 充宏
	副査	九州大学	准教授	中村 真子

論文審査の結果の要旨

概日時計は約 24 時間周期で刻まれる内因性の生物時計であり、様々な生理機能の概日リズムを制御している。現代社会において、シフトワークや夜更かし習慣などによる概日時計の乱れと各種疾病リスクの上昇が問題となっており、概日時計のかく乱機序の解明や予防改善法の開発が重要な課題である。従来、不規則な明暗周期や摂食周期の影響は、主に動物モデルを用いて評価されてきたが、細胞レベルでの影響は未だ明らかではない。本研究では、概日時計の細胞モデルを用いて、明暗環境や摂食に関わるホルモンの周期的刺激に対する影響の解明、細胞の概日時計を調節できる栄養成分の同定、ならびに中枢-末梢細胞間クロストークを基盤とする新しい共培養系の確立を目的とした。

まず、時計遺伝子の一つである *Bmall* のプロモーターにホタルルシフェラーゼをつないだベクターをマウス線維芽細胞 NIH3T3 に導入し (*Bmall-Luc* 細胞)、時計遺伝子の転写活性リズムを発光レポーターで検出する系を確立した。生体内において、明暗周期はグルココルチコイドにより細胞に伝達されるため、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン (Dex) の周期的刺激に対する影響を評価した。18 時間から 28 時間までの様々な周期的刺激を与えたところ、細胞の *Bmall* 転写活性リズムは 22 時間と 24 時間の Dex 周期に同調できることが明らかとなった。そこで、細胞の「時差ぼけ」状態を誘導するため、同調不可能な周期を含む不規則的な刺激 (16、24、16 時間間隔で順次刺激) を与えた。その結果、時計遺伝子の発現や *c-Myc*、*p53* といった細胞周期遺伝子の発現に異常な亢進が認められ、細胞の時差ぼけモデルが確立された。

次に、明暗周期と摂食周期が細胞の概日時計に及ぼす相互作用を検討するため、それぞれの時刻情報伝達ホルモンとして Dex およびインスリンを用いて、*Bmall-Luc* 細胞に及ぼす周期的刺激の影響を調べた。24 時間周期で Dex とインスリンで刺激すると、*c-Myc* の発現上昇を伴わずに *Bmall* 転写活性リズムの増幅が見られた。不規則な Dex 刺激による時計遺伝子の異常発現は、規則的なインスリン刺激により部分的に改善された。一方で、不規則なインスリン刺激は時計遺伝子の発現をほとんど変化させなかった。これらの結果から、細胞の概日時計におけるグルココルチコイドシグナルの優位性と、インスリンシグナルの補助的な役割が示唆された。

続いて、*Bmall-Luc* 細胞を用いて、概日時計を調節できる機能性栄養成分を探索した。その結果、ポリアミンの一つであり納豆や味噌等の発酵食品に多く含まれるスペルミジンの単回刺激により、*Bmall* 転写活性リズムの強い位相前進が刺激時刻依存的に誘導された。この効果は、グルココルチコイド受容体 (GR) アンタゴニストで阻害されなかったことから、GR 活性非依存的な経路を介す

ると考えられた。スペルミジン投与後には複数の時計遺伝子の発現変化が見られたことから、未知の経路による分子時計の調節が関与すると考えられた。

最後に、中枢細胞と末梢細胞のクロストークに基づく概日時計評価系を確立した。すなわち、中枢時計細胞株である SCN2.2 と線維芽細胞株である NIH3T3 における *Bmal1* 転写活性について、それぞれ赤色と緑色のルシフェラーゼ発光レポーターでラベルし、二色同時にモニタリングする共培養系を確立した。この共培養系により、NIH3T3 細胞の *Bmal1* 転写活性リズムが数倍程度増幅されることが判明し、SCN2.2 細胞の *Bmal1* 転写活性リズムも共に増幅される可能性が示唆された。従来、概日時計の調整成分を探索する研究では、リズム評価系が確立されている末梢細胞株において実施されてきた。本研究の結果により、中枢細胞を含む幅広い視点からの探索研究が可能となった。

以上要するに、本研究では周期的環境における概日時計の動態を評価するための各種細胞モデルを確立し、複数のホルモンシグナル周期に対する細胞時計の応答機構や概日時計の調節成分を明らかにした。これらの成果は時間生物学、時間栄養学、および細胞生理学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。