

生体時計機構に及ぼす薬物の 検索とその応用について

(課題番号 02660313)

平成3年度科学研究費補助金
研究実績報告書

(一般研究C)

平成4年4月

研究代表者 村上 昇
(宮崎大学農学部 助手)

研究経費

平成2年度	1200千円
平成3年度	1000千円
計	2200千円

研究発表

(ア) 学会誌等

- 1) 村上 昇：鳥類松果体細胞の時計及び光情報に関わる蛋白合成。家畜繁殖学雑誌 36：53-61 (1990)
- 2) 高橋清久、大川匡子、村上 昇：ほ乳動物のリズム同調機構；特に臨床応用面から。神経研究の進歩 34：892-900 (1990)
- 3) 村上 昇：鳥類松果体細胞での時計関連タンパク質の存在ホルモンと臨床 39(6)：11-16 (1991)
- 4) 村上 昇、黒田治門、江藤禎一：分離松果体細胞の日周リズム。生体の科学 42(6)：585-588 (1991)
- 5) 高橋清久、井上真一、本間研一、村上 昇：時間生物学をめぐって。Clinical Neuroscience 9(5)：82-94 (1991)
- 6) Murakami N., Takamura M., Takahashi, K., Utunomiya K., Kuroda H., Etoh T. Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. Brain Research 545: 347-350 (1991)
- 7) Takamura M., Murakami N., Takahashi K., Kuroda H., Etoh T.: Rapid reentrainment of circadian clock itself, but not measurable activity rhythms, to a new light-dark cycle in the rat. Physiology and Behavior 50: 443-449 (1991)
- 8) Egawa M., Inoue S., Sato S., Takamura Y., Murakami, N., Takahashi K.: Restroration of circadian corticosterone rhythm in ventromedial hypothalamic lesioned

(イ) 口頭発表

- 1) 村上 昇：鳥類松果体細胞での時計関連蛋白質の存在
日本内分泌学会シンポジウム 1990/5/20
- 2) 村上 昇：ラットの生物時計の光同調速度
三菱化成シンポジウム 1990/11/14
- 3) 村上 昇：生殖機構と生体リズム機構の共役に関する基礎的研究 第79回日本家畜繁殖学会 1991/4/1
- 4) 村上 昇、高群美穂、江藤禎一：ラット視交叉上核神経細胞での概日リズムの発現 第110回日本獣医学会 1990/10/16
- 5) 高群美穂、村上 昇、黒田治門、江藤禎一：ラットの生物時計と行動リズムの新たな明暗周期への再同調速度 第110回日本獣医学会 1990/10/16
- 6) 古川忠司、戸塚繁雄、木村邦夫、岡田忠彦、村上 昇、増田 裕：ラットの自由継続リズムに及ぼすコリン作動性薬物の脳内持続作用の影響 第110回日本獣医学会 1990/11/16

(ウ) 出版物

- (1) 高橋清久、村上 昇：概日リズム 伊藤正男、檜橋博太郎編集 「神経科学レビュー」医学書院 1990

研究成果

1. 目的及び実験方法

あらゆる生物は生体時計を有し、これにより種々の生理機能（睡眠—覚醒、摂食、行動、生殖など）は外部環境、特に光の周期変動に同調した日内リズムを示す。この生体時計のペースメーカーはほ乳動物では視床下部の神経細胞集団からなる視交叉上核に存在し種々の神経連絡網を通じて上記の各生理機能の日内リズムを支配している。近年、下等生物の時計機構の分子細胞学及び遺伝学的研究が進められているが、ほ乳動物での細胞レベルでの研究は皆無である。その理由は上述の様に時計機構（網膜の光受容—視交叉上核—出力）を生体から分離し *in vitro* で解析出来ない事にある。しかし最近、神経の培養技術の進歩に伴い神経線維の促進因子や神経細胞接着因子の存在が明かになり *in vitro* で神経シナプスの形成や標的神経組織との間で神経連絡網を作成することが可能になってきた。本研究の一つの目的は鳥類やほ乳動物の生体時計機構を培養下において解析できる系を開発し、それを持って生体時計に作用する薬物を検索しようとするものである。そのため一年目を培養系の確立に費やす予定とした。

この様な生体時計から駆動される様々なリズムは生殖機構などとカップリングしておりこの生体時計機構を薬物により操作できれば繁殖操作などに有益な手段となることが予想される。また近年時間生物学の領域において時計の異常でおこると思われる疾患への関心が高まっている。特に、睡眠覚醒リズムの異常、躁鬱病、季節性鬱病、昼夜交代勤務による時差ボケなどがその代表として上げられている。そこで第二の目的として薬物投与によるリズムの制御方法の開発を上げた。以下にそれらの実験方法の概略を記す。

1) 視交叉上核の神経細胞の培養：生後1—5日令の胎児の脳を取り出し組織スライサー（自作）で視交叉上核を含む神経組織（直径0.6 mm

)を实体顕微鏡下で採取した。プロナーゼで遊離細胞を集め、あらかじめ細胞接着因子のpoly-ornitine, ラミニン、ファイブロネクチンで培養皿を被覆し、これに細胞を蒔いた。グリア細胞の増殖はサイトシンーアラビノサイドで抑制した。培養液は無血清M199に種々の添加物を加えた合成培養液を用い、NGF(7S)を適度に添加した。培養細胞を37°C恒温室に移し細胞灌流を一週間行い2時間おきにサンプルを集めバゾプレシンの分泌リズムを測定した。

2) 生体時計の光同調速度の測定: ラットを12L:12Dの明暗条件下で飼育し、行動リズムを測定した。この明暗周期を8時間前進あるいは後退した12L:12Dに移し、行動リズムがこの新たな明暗条件に同調するのにどの程度の日数を要するのかを調べた。そこで再度8時間明暗条件を変化し、変化後、2-3日後にはDD条件に移した。もし仮にこの2-3日間の間に新たな明暗周期に同調していればDD下での自由継続リズムは新たな12L:12DのD期から始まるであろう。また逆に、この間に再同調出来なければ8時間変化する前の12L:12DのD期から始まることが予想される。この結果で生体時計機構の光同調速度を測定した。

3) 生体時計機構の薬物による制御: ラットを盲目にし自由継続リズムを測定した後アセチルコリン系薬物を視交叉上核の近傍へ埋没しリズムの周期に及ぼす効果を検討した。

実験結果

以下に研究結果の概略を記し、その詳細については発表論文を添付した。

1) 視交叉上核の神経細胞培養によるリズムの発現

ラットの視交叉上核の培養においては、まず初めに、種々の培養条件を検討した結果、視交叉上核の神経細胞の成長と維持において血清添加

液より、無血清培養液の方がより健全な培養像が見られた。また、細胞接着因子の検討では、ラミニンとポリオルニチン-ラミニンの場合に神経繊維の良好な発達認められた。これに対し、コラーゲンやフィブロネクチンでは培養皿底面に上皮細胞の膜が形成され、神経細胞の成長が抑制された。グリア細胞抑制のためDNA合成阻害薬を検討したが、サイトシンアラビノサイトなどは神経細胞に悪影響を及ぼした。むしろ、グリア細胞は神経細胞の成長に必要と思われた。ラミニンで被服したプレートで培養した結果、3週間後には神経細胞の集塊が形成され、それぞれの集塊は連結様組織で神経回路網様の所見を呈した。培養3-4週間後、神経細胞を還流した結果、40チャンネル中12例に於いて、vasopressinの顕著な日内変動を認めた。山と谷の振幅は4-6倍もの大きさを示し、その周期は27時間でほぼ一定していた。このリズムは還流終了まで(5日間)継続し、その間振幅のダンピング減少は起こらなかった。残り28例中22例は全くリズムを認めなかった。残り6例は2ないし3サイクルのリズムが認められたが、以後消失した。これらのリズムの消失した例では、その多くの例で還流中の細胞剥離を起こしたものであった。

本研究の結果、視交叉上核神経細胞の長期培養において、還流期間中、vasopressinの日内リズムが出現する事が示された。これは、培養細胞が、生体時計機構を有している事を示唆している。即ち、ほ乳動物の視交叉上核が時計の本体である事を示す最も有力な証拠を提示していると言える。生体時計機構は妊娠19日のラット胎児の視交叉上核ですでに発現する事が知られている¹¹⁾ことから、今回の結果は、培養期間中に時計機構が維持されていた事を暗示するものである。vasopressinのリズムの成立は個々の培養神経細胞の時計の位相が同調している事を示している。これは一個一個の神経細胞がそれぞれ時計機構を有していると考えれば、どの様な機構で同調しているのかが重要な問題となる。今後の研究を進める上で、培養神経細胞間にシナプス形成が起こり神経連絡網が形成されているのか、あるいは液性の同調物質が存在するのか、さらにはグリア細胞が時計の発信や同調に関与しているのかなどが重要な課題

となる。また、なぜ vasopressin のリズムの周期が通常の行動リズムなどで見られる周期よりかなり長い 27 時間であるのかについても今後解明すべき点である。

現在までほ乳動物の日内リズムの機構を解明するために視交叉上核の解剖学的、生理学的また生化学的な研究により多くの知見が集積してきたが、時計機構の細胞学的、分子生物学的解明は殆ど立ち入られていない。今回の結果は、培養細胞で日内リズムを測定できる可能性を初めて示したものであり、ほ乳動物の時計機構を細胞レベルで解析する好個なモデルを提供するものと考えられる。

2) 生体時計機構の光同調速度について:

八時間光条件を変化しその二日後に DD 条件に移して、行動の自由継続リズムがどの位相から始まるのかを検討した結果、8 時間の光後退の場合は、16 例全例において、また 8 時間光条件を前進した場合には 16 例中 9 例において行動リズムは新たな 12L:12D の D 期の位相から始まった。この事は新たな光条件に曝されたわずか二日間の中に生体時計は新たな光条件に再同調している事を示している。また光変化三日後に DD に移した場合にはすべての例であらたな D 期から行動リズムが始まった。即ち、生体時計が急な光変化に再同調するためには少なくとも三日あれば十分である事をしめしている。

一方、光条件を八時間変化させ、そのままの状態で行動リズムを調べると、この新たな 12L:12D の明暗条件に同調するのにおよそ 4-7 日を要した。即ち、生体時計の再同調速度に対し、行動リズムの再同調にはかなりの日数を要する事が判明した。即ち、時差ボケとは時計が徐々に再同調するために起こるものではなく、時計から種々のリズムの発現に伝わる過程に時間を要するために起こると推察される。今回の結果はいわゆる時差ボケの原因に新たな解釈を示すものである。

3) 生体時計機構に及ぼす薬物の効果

我々は先にアセチルコリンのアゴニストであるカルバコールの脳内投

与がラットの行動の自由継続リズムの周期を短縮させる事を見いだした。そこでこの短縮効果がニコチン性あるいはムスカリン性のいずれを介したものであるかを調べるためニコチン（ニコチン性）やピロカルピン（ムスカリン性）の投与で調べた。その結果5例中4例においてニコチンペレットを視交叉上核近傍に埋没したラットの行動リズムの周期が短縮した。一方、ピロカルピン投与ラットでは全く周期の変化を認めなかった。以上の結果からカルバコールの周期短縮効果はニコチン性受容体を介している可能性が強い。