

# 博士論文審査結果の要旨

学位申請者 大久保直輝

主論文 1編

Prolonged bioluminescence monitoring in mouse *ex vivo* bone culture revealed persistent circadian rhythms in articular cartilages and growth plates  
PLoS One. 2013; 8: e78306.

## 審査結果の要旨

体内時計は、生体内に約 24 時間周期のリズムをもたらす内在性機構で、時計遺伝子によって構成されている。PERIOD2<sup>Luciferase</sup> (PER2<sup>Luc</sup> と略) マウスは、体内時計の状態を発光量の変化として観察できる遺伝子改変動物である。PER2<sup>Luc</sup> マウスを用いて視交叉上核、肺および肝臓に体内時計が存在することが示されている。骨は、骨代謝マーカーに日内変動を示すものがあり、時計遺伝子を欠損したマウスの骨量は野生型マウスの骨量と異なる。このことから、骨に体内時計が存在する可能性がある。本研究の目的は、器官培養で骨における体内時計の存在と機能を明らかにすることである。

申請者は、動物として 3-9 週齢の雌雄の PER2<sup>Luc</sup> マウスを用いた。大腿骨遠位部を採取して器官培養し、光電子増倍管を搭載した装置で長期間発光量を計測した。長管骨として大腿骨と橈骨を、扁平骨として頭蓋骨と肩甲骨を採取して、器官培養し生物発光を 5 日間観察した。発光の局在を検討するため、発光イメージング装置で大腿骨を観察し、経時変化を解析した。大腿骨にフォルスコリン 10 $\mu$ M、デキサメタゾン (dexamethasone : DEX) 100nM および対照として溶媒のエタノールを投与した。投与前後の発光ピーク間隔の変化量を位相変位量として計測し、位相反応曲線を作成した。

大腿骨の発光は、性別に関係なく約 24 時間周期の明瞭なリズムであった。発光リズムの振幅は徐々に減少したが、培地交換により回復し、発光リズムは 280 日以上持続した。長管骨および扁平骨の発光に約 24 時間周期のリズムが観察された。発光イメージング装置による観察で、強い発光が成長軟骨板と関節軟骨に見られ、発光は約 24 時間周期のリズムであった。エタノールの投与で発光リズムはほとんど変化しなかったが、フォルスコリンや DEX で投与時刻依存的に位相が変位した。位相反応曲線は強い同調能を表す type 0 の位相反応であった。

本研究では、約 24 時間周期の発光リズムが培養下の長管骨と扁平骨において観察された。発光リズムは恒常条件下で長期間持続したことから、組織自律的であり、骨における体内時計の存在を明らかにした。骨の体内時計は、細胞内環状アデノシンリン酸濃度を上昇させるフォルスコリンや合成糖質コルチコイドである DEX の投与で時刻依存的に位相が変位した。このことから、生体内では副甲状腺ホルモンやグルココルチコイドが時刻情報を伝達している可能性がある。

以上が本論文の要旨であるが、骨において、長期間機能を維持し同調能を持つ体内時計が存在することを示した点で、医学的に価値ある研究と認める。

平成 28 年 2 月 18 日

審査委員 教授 橋本直哉 ㊞

審査委員 教授 高山浩一 ㊞

審査委員 教授 伊東恭子 ㊞