

論文内容の要旨

論文提出者氏名 稲田 裕

論文題目

Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos

(マウス胎仔における細胞および組織自律的な体内時計の発生プロセス)

論文内容の要旨

生体活動には約 24 時間の周期性を持つ生体リズム (概日リズム) が存在し、体内時計によって制御されている。これらの生体リズムは生体活動の時間的統合を行うとともに、周囲環境のリズムと体内環境を同調させる機能を有する。時計遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子はその転写、翻訳を介したフィードバックループを形成しており、その転写活性には概日リズムが認められている。このメカニズムは体内時計の中核である視交叉上核のみならず、全身の細胞においても広く観察され、生体活動における生体リズム発振に深く関与していると考えられている。

哺乳類の発生過程において、このような時計遺伝子転写活性の概日リズムは、初期胚ではみとめられず、胎生期に形成されることが知られている。しかし、胎生期における概日リズムの詳細な出現時期及び形成プロセスについてはいまだ不明な点が多い。

著者らは、様々な発生時期のマウス胎仔から得られた細胞および組織の培養、リズム観察を行い、母体や環境に由来する同調因子がない状況下での細胞、組織自律的な概日リズムの発生プロセスを明らかにすることを目的とした。

時計遺伝子の一つである *Per2* のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター(*mPER2::Luc*)をノックインした *mPer2Luc* マウスを使用した。

In vivo における細胞レベルでの概日時計の形成時期を明らかにするため、交配後 E10.5 および E15.5 の時点で胎仔を採取した。採取した胎仔から頭部と内臓組織を摘除した後、得られた細胞をルシフェリン添加培地にて 35mm ディッシュで培養しつつ、*Per2* 遺伝子とともに転写されるルシフェラーゼの発光を光センサ (光電子増倍管) でモニタリングした。

E10.5 に採取した *mPER2Luc* マウス胎仔由来の細胞 (主に線維芽細胞) を一晚培養し、同調因子であるデキサメサゾンにて同調刺激したところ、ディッシュ全体の発光に明瞭なリズムはみとめられなかった。しかし、この細胞をさらに 6 日間培養したのちに同調刺激を加えたところ、E15.5 の胎仔から得た細胞培養で観察された生体リズムと類似した、明瞭なリズムが観察された。

次に、*in vitro* での細胞自律的な概日時計の形成時期について評価するため超高感度発光顕微鏡 (LV200;OLYMPUS) 観察下に E10.5 に採取した胎仔由来の単一細胞培養を行い、概日発光リズムを観察した。結果、培養開始 1 日後には明らかなリズムは認められなかつ

たが、培養開始 8 日後には明瞭なリズムが観察された。したがってマウス胎仔の発生に伴う概日リズムの形成は、環境因子に依存しない細胞自律的なものであることが明らかになった。

次に、組織レベルでの発生過程におけるリズムの観察を行った。E13.5 から 17.5、P30 の各時点で採取した唾液腺組織片を培養、観察したところ、E13.5、14.5 で採取した組織では同調刺激後も明かなリズムは認められなかったが、E15.5 で採取した組織にはわずかに振動が認められ、以降に採取した組織では明瞭なリズムが観察された。また、E13.5 で採取した組織を *in vitro* で継続的に培養し、3 日毎に同調刺激を加えたところ、E 13.5+6 日目よりリズムが観察された。以上の結果より、*in vitro* と *in vivo* との間でリズムの出現時期に違いは認められたものの、組織レベルにおいても分化に伴って自律的な概日リズムが形成されることが明らかになった。

次にマウス胎仔由来の誘導多能性幹細胞モデルにおける概日リズム形成の観察を行った。E15.5 で採取した *mPer2Luc* マウス胎仔由来の線維芽細胞に *Tet-On system* で *Sox2*、*Klf4*、*Oct3/4*、*l-Myc* を発現誘導可能なコンテキストを導入した。得られた細胞にドキシサイクリンを加えてリプログラミング因子の発現誘導を行い、多能性幹細胞培養条件下において約 3 週間培養したところ ES 細胞様の形態を有するコロニーが得られた。細胞をピックアップし、4 つの *Cell line* において多能性幹細胞マーカーである *Nanog* の発現を蛍光免疫染色で確認した。こうして得られたマウス胎仔由来の *iPS* 細胞株では、同調刺激を加えても明瞭なリズムは観察されなかった。しかし、培養条件を変更して分化誘導を行ったところ、分化誘導開始 14 日後には 4 つの *cell line* 全てにおいて概日リズムが観察された。

以上の結果から、ES 細胞や *iPS* 細胞といった多能性幹細胞に加え、胎生初期中期 (E10.5) 頃までの胎仔細胞には概日時計の発振が認められないこと、しかし細胞の分化に伴い、細胞及び組織自律的に明瞭な振動が形成されること、が明らかとなった。また、ルシフェラーゼを用いた生体細胞ライブイメージング法は、生きた細胞や組織の発生分化過程をリアルタイムに観察評価できる系として有用である可能性が示された。