

論文内容の要旨

論文提出者氏名 大久保 直輝

論文題目

Prolonged bioluminescence monitoring in mouse *ex vivo* bone culture revealed persistent circadian rhythms in articular cartilages and growth plates

論文内容の要旨

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。時計遺伝子は転写および翻訳のフィードバックループを形成することで自律的に時を刻む。PERIOD2^{Luciferase} (PER2^{Luc} 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、近年作製された。PER2^{Luc} マウスから採取した組織培養の発光観察によって、視交叉上核、肺および肝臓における体内時計の存在が明らかにされている。骨は、骨リモデリングと呼ばれる骨吸収と骨形成を繰り返す器官である。骨リモデリング量を反映する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証明することである。

動物として 3-9 週齢の雌雄の PER2^{Luc} マウスを用いた。大腿骨を半切し遠位部を採取して、発光基質含有の無血清培地で器官培養した。週に 1 回培地交換をしながら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、charge-coupled device カメラを内蔵した発光イメージング装置で器官培養下の大腿骨を 4 日間観察した。発光が強い部位に関心領域を設定し、発光の経時的变化を解析した。同調能を調べるため、器官培養した大腿骨にフォルスコリン 10 μ M、デキサメタゾン (dexamethasone : DEX と略) 100nM および対照として溶媒のエタノールを投与した。投与前後のピーク間隔の変化量を位相変位量として計測した。2 回目の発光ピークから薬剤投与までの時間を横軸に、位相変位量を縦軸にとり、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。大腿骨に加えて、橈骨、頭蓋骨および肩甲骨からの発光に約 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大腿骨の観察で、強い発光が成長軟骨板と関節軟骨に見られた。特に発光の強かった大腿骨頭、小転子、大転子および遠位成長軟骨板に関心領域を設定し、経時的に解析した結果、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、フォルスコリンおよび DEX の投与で有意に位相が変位した。フォルスコリンや DEX を発光ピークの前に投与すると位相が後退し、発光ピークの後に投与すると位相が前進し、投与時刻依存的な位相変位であった。位相反応曲線は強い同調作用を表す type 0 の位相反応であった。

本研究において、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、組織自律的であると考えた。器官培養で骨に自律的な概日リズムを認めたことから、骨における体内時計の存在を明らかにした。細胞内環状アデノシンー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（glucocorticoid : GC と略）である DEX の投与時刻依存的に、骨における体内時計の位相が変位した。副甲状腺ホルモンは細胞内環状アデノシンーリン酸濃度を上昇させることから、生体内で副甲状腺ホルモンや GC が時刻情報を伝達している可能性がある。GC は骨の成長に対して抑制的に作用する。DEX の投与で骨における体内時計の位相が変位した一方で、恒常条件下では成長軟骨板において強固に概日リズムを維持したことから、骨の体内時計とホルモンとの関連は、骨の成長の制御機構を解明するために重要であると考えた。

本研究では、PER2^{Luc} マウスを用いた生物発光の観察を行い、骨における体内時計の存在を証明した。骨の体内時計は、成長軟骨板で強く発現し、長期間機能を維持することから、骨の成長に関して重要な役割を果たしている可能性がある。