

学位論文題名

Effects of nursing mothers on *rPer1* and *rPer2*
circadian expressions in the neonatal rat
suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage.

(ラット視交叉上核における時計遺伝子
rPer1、*rPer2* 発現に対する母ラット保育行動の影響)

学位論文内容の要旨

[序論・目的]

未熟児は、多くの施設において24時間連続照明下で保育されている。しかし、保育器内の光環境やその他の保育環境が児の発達に適切かどうか、ほとんど検討されていない。そこで、ラット新生仔の生物時計に対する光環境および母ラット保育行動の影響を調べ、新生児期における生物時計の外部環境への同調機能を検討した。

睡眠覚醒、ホルモン分泌など、様々な生体機能に見られる約24時間のリズム(サーカディアン・リズム)は間脳視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nuclei: SCN)に存在する生物時計に支配されている。近年ショウジョウバエの時計遺伝子 *Period(Per)* の相同遺伝子 *Per1*、*Per2* が哺乳類でクローニングされた。これら時計遺伝子をノックアウトとしたマウスでは、行動のサーカディアン・リズムが消失することから、*Per1*、*Per2* が哺乳類のサーカディアン・リズム形成に重要な役割を果たしていると考えられている。

ラットの生物時計は24時間より長い内因性周期をもち、成熟ラットでは明暗サイクルが最も強力な同調因子であり、生物時計の周期を24時間に調節している。一方、新生仔ラットの生物時計は生後5日前後まで母ラットの保育行動に影響されることが、松果体のリズムや離乳後の行動リズムから、間接的に示されている(母仔同調)。今回、この母仔同調に生物時計が直接関与しているか否かを、生物時計が局在するSCNにおける時計遺伝子 *Per1*、*Per2* の発現リズムを指標として検討した。また、時計遺伝子発現リズムと行動リズムの関係を、離乳後の仔ラット行動リズムを指標として評価した。

[方法]

実験にはWistar系ラットを用いた。6-18時が明期(Light period; L)、18-6時が暗期(Dark period; D)の明暗(LD)条件下にて飼育された母ラットより出生した新生仔に、生後0日より以下の3つの保育環境を与えた。また、生物時計に対するLDサイクルの影響を調べる目的で、出生直後に両側の眼球摘出を行った群と行わなかった群を作成した: 1)

眼球摘出を行わず明暗サイクルがLDの母ラット(LD母ラット)にて保育(LD対照群)、2)眼球摘出を行いLD母ラットにて保育(LD保育群)、3)眼球摘出を行い明暗サイクルを逆転させた(6-18時が暗期、18-6時が明期)DL母ラットにて保育(DL保育群)。胎生20日、生後7日、14日、21日にそれぞれ4時間毎に断頭を行い、1時点につき6つの脳(n=6)を摘出した。

SCNにおける*rat Per1/Per2* mRNA発現量は*in situ* hybridization法にて検出、画像解析(MCID法)にて定量化し、時計遺伝子発現リズムを測定した。試料の準備にあたっては、凍結脳をクリオスタットにて厚さ20 μ m、冠状断切片にてスライスした。リズム有無の判定にはone-way ANOVA ($p < 0.05$)を用いた。また、リズム・ピーク時刻の算出および群間のリズム位相差の検出にはコサイン法を用いた。

離乳後(生後21日)より仔ラットの行動リズムを行動計(感熱式アクトグラム)で測定した。離乳後3週間の行動開始・終了を視覚的に測定し、リズム位相と周期を算出した。群間のリズム位相差の検出はt検定($p < 0.05$)を用いた。

[結果・考察]

対照群におけるSCNの*rat Per1/Per2*発現リズムは胎生20日、生後7日、14日、21日では同一位相を示し、対象群の生物時計はLDサイクルに同調したと考えられた。それに対し、LD保育群、DL保育群の時計遺伝子リズムは生後1~3週にかけて位相後退し、LDサイクルへの同調は認めなかった。

生後7日目において、LD保育群と母ラットの保育行動リズムが逆転しているDL保育群では*rat Per1/Per2*リズム位相が約2時間異なり、母ラットの保育行動がラット新生仔生物時計に対して影響することが明らかになった。しかし、生後2週目ではLD保育群とDL保育群の間に*rat Per1/Per2*リズム位相差に変化を認めず、母ラットの保育行動リズムの影響は生後1週の期間に強く発揮されていたと考えられた。一方、生後3週目において*rat Per1/Per2*リズム位相にLD保育群、DL保育群の両群に差を認めたことから、母ラットの保育行動が再び仔ラットの生物時計に作用したことが推定された。また、離乳後の行動リズム位相は、*rat Per2*リズムの位相と対応していた。

[結論]

明暗サイクルがない条件下では、母ラットの保育行動リズムは、仔ラットの視交叉上核(生物時計)における時計遺伝子発現リズムの位相を変化させる。その影響は*Per2*遺伝子の発現を介して離乳後の行動リズムに現れると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 島 菊 郎
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

学 位 論 文 題 名

Effects of nursing mothers on *rPer1* and *rPer2* circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage.

(ラット視交叉上核における時計遺伝子

rPer1、*rPer2* 発現に対する母ラット保育行動の影響)

未熟児は、多くの施設において 24 時間連続照明下で保育されている。しかし、保育器内の人工環境が児の発達に適切かどうか、ほとんど検討されていない。そこで、申請者はラットを動物モデルとして、新生仔生物時計に対する光環境および母ラット保育行動の影響を評価することを目的に、新生児生物時計の外部環境への同調機能を検討した。睡眠覚醒など、様々な生体機能に見られる約 24 時間のリズム（サーカディアンリズム）は視交叉上核 (suprachiasmatic nuclei: SCN) に存在する生物時計に支配されている。近年ショウジョウバエの時計遺伝子 *Period*(*Per*) の相同遺伝子 *Per1*、*Per2* が哺乳類でクローニングされ、これら時計遺伝子が哺乳類のサーカディアンリズム形成に重要な役割を果たすと考えられている。成熟ラットでは明暗サイクルが最も強力な同調因子であり、生物時計の周期を 24 時間に調節している。一方、新生仔ラットの生物時計は生後 5 日前後まで母ラットの保育行動に影響される（母仔同調）。今回申請者は、ラット母仔同調に生物時計が直接関与しているか否かを、生物時計が局在する SCN において *rPer1*、*rPer2* の発現リズムを指標として検討した。また時計遺伝子発現リズムと行動リズムの関係を、離乳後の幼若ラット行動リズムを指標として評価した。

ウィスター系ラットの生後 0 日より以下の 3 つの保育環境を与えた： 1) 眼球摘出を行わず明暗サイクルが LD の母ラット (LD 母ラット) にて保育 (LD 対照群)、2) 眼球摘出を行い LD 母ラットにて保育 (LD 保育群)、3) 眼球摘出を行い明暗サイクルを逆転させた (6-18 時が暗期、18-6 時が明期) DL 母ラットにて保育 (DL 保育群)。 *in situ* hybridization 法の解析の結果、対照群における SCN の *rPer1*/*rPer2* 発現リズムは胎生 20 日、生後 7 日、14 日、21 日では同一位相を示し、対象群の生物時計は LD サイクルに同調したと考えられた。それに対し、LD 保育群、DL 保育群の時計遺伝子リズムは生後 1~3 週にかけて位相後退し、LD サイクルへの同調は認めなかった。また、生後 7 日目において、LD 保育群と DL 保育群では *rPer1*/*rPer2* リズム位相が約 2 時間異なり、母ラットの保育行動がラット新生仔生物時計に影響することが明らかになった。しかし、生後 2 週目では LD 保育群と DL 保育群の間に、*rPer1*/*rPer2* リズム位相差に変化を認めず、母ラットの保育行動リズムの影響は生後 1 週の期間に強く発揮されていたと考えら

れた。また、生後3週目において *rPer1/rPer2* リズム位相に LD 保育群、DL 保育群の両群に差を認めたことから、母ラットの保育行動が再び仔ラットの生物時計に作用したことが推定された。一方、行動リズムの解析結果より、*rPer2* リズムと離乳時の行動リズム位相に強い相関を認めた。

公開発表前の個別面接において、副査の渡邊教授・本間教授、及び主査の福島教授に背景・目的・方法に重点おき、審査対象となる学位論文の説明を行った。副査の渡邊教授から、出生前に遺伝子によってプログラムされた個体が、出生後の外部環境にどのように適応するのか生物時計を指標として研究した点が興味深いとのコメントを頂いた。副査の本間教授から、ラットを動物モデルとした本研究の結果から臨床医学にどのような貢献をすることが可能か質問があり、これに対し申請者は光感受性が既に存在するヒト未熟児では明暗サイクルを重要な環境要因として考慮することの必要性を述べた。主査の福島教授から、授乳・身体接触等といった母ラット保育行動の中で、どの行動が新生仔生物時計に影響したか質問があり、これに対し申請者は本研究のプロトコールでは個別の保育行動が与える新生仔生物時計への影響を評価することは困難で今後の検討課題であると解答をした。

公開発表において、副査の渡邊教授からは、開眼前の新生仔生物時計に対する光の影響の有無、母ラット保育行動リズムの影響力の強さ、新生仔生物時計と母ラット保育行動リズムがずれることから生じる発達への影響について質問があった。これに対し申請者は、開眼前から新生仔生物時計は光同調機能を持ちうること、母ラット行動リズムが新生仔生物時計のリズム位相を逆転させるほど強い影響力を持たないこと、母子間のリズムのずれが生後の体重増加率の減少を起こす可能性を述べた。また、副査の本間教授からは生後2~3週目にかけて2つの時計遺伝子 *rPer1/rPer2* 発現リズムが異なる反応を示した原因について質問があった。これに対し申請者は時計遺伝子ノックアウト動物の実験から *rPer1/rPer2* が環境因子に対し異なる反応を示す可能性、及び *rPer1/rPer2* のいずれかが内因性リズムの変化をより反映している可能性を示唆した。主査の福島教授からは、コサインナー法を用いた検定方法の精度、及び、ヒト未熟児生物時計を検討する動物モデルとしてラット新生仔を使用する妥当性について質問があった。これに対し申請者は、コサインナー法がカイ2乗法 ($p < 0.05$) に基づいた検定法であり2時間の位相差を検出しうること、ヒトの光感受性の開始が未熟児で既に起こることからラットは解析に妥当な動物モデルであることを述べた。申請者はいずれの質問に関しても自身の解析結果と文献的考察をもとに概ね妥当な解答をなした。

本論文は、時計遺伝子を用い、生後の保育環境が新生仔ラットの生物時計に影響することを初めて示したことが高く評価され、今後、保育器内におけるヒト未熟児の発育環境の改善に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位等も併せ申請者が博士(医学)の学位を受ける資格を有するものと判定した。