

論 文 要 旨

**Circadian Rhythm of PERIOD2::LUCIFERASE Expression
in the Trigeminal Ganglion of Mice**

マウスの三叉神経節における
PERIOD2::LUCIFERASE 発現の概日リズム

白川 由紀恵

【序論及び目的】

哺乳類では、概日振動が様々な器官や組織に内在し、睡眠／覚醒、ホルモン分泌などに影響を与えている。視交叉上核 (SCN) の破壊により行動リズムが失われるなど、全身の生理機能の乱れは、いかに中心時計が SCN に局在しているかを示している。哺乳類の概日システムは、SCN にある主時計と、その他の末梢時計群からなる振動的な階層構造である。主時計は、各末梢時計を明暗周期に同調させ、全身の生理機能を時間的に統合している。一方、末梢時計は、各組織の生理現象に重要な遺伝子群の転写のリズムを調節することで、この組織を最適な時間的条件下に調整していると考えられる。現代社会では、環境と体内時計や末梢時計との間に位相のずれが生じ、そのためにさまざまな病気が引き起こされている。体内時計と環境を一致させることは重要である。

我々は、末梢時計の可能性の一つとして、三叉神経節に着目した。三叉神経は口腔や顔面領域で温感、痛覚、触圧などのデリケートな感覚を伝えており、最大の脳神経である。三叉神経支配領域は、臨床的には、口腔に器質的な異常がない場合でも、舌痛症、知覚過敏、不感症の訴えが局在する場所である。近年、マウスの三叉神経支配領域における痛みの日内変動が報告され、明期よりも暗期の方が痛みに対する感受性が高いことがわかった。しかし、このような昼夜差を生み出す分子メカニズムは不明である。そこで、本研究では、マウス三叉神経節における時計遺伝子発現の概日リズムを調べるとともに、哺乳類の時計遺伝子のうち重要な構成要素として働くことが知られているクリプトクロム (*Cry*) 遺伝子の役割を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】

本実験では、雄の C57BL/6J マウス；ヘテロ接合型 PERIOD2::LUCIFERASE ノックイン (PER2::LUC) マウス；および *Cry1* 遺伝子欠損 (*Cry1^{-/-}*) および *Cry2* 遺伝子欠損 (*Cry2^{-/-}*) マウスを使用した。動物は、12/12 時間の明暗サイクルで、餌と水を自由に摂取できるように飼育した。

免疫組織化学的手法により、野生型マウスの視交叉上核と三叉神経節における PER2 タンパク質の発現を検討した。次に、遺伝子発現を生物発光として測定するために、PER2::LUC ノックインマウスを使用し、三叉神経節の生物発光イメージングを行った。また、三叉神経節と視交叉上核を含む脳切片を *ex vivo* で培養し、光電子増倍管を用いて生物発光レベルを測定した。さらに、*Cry1^{-/-}* ノックアウトマウスまたは *Cry2^{-/-}* ノックアウトマウスを用いて、同様に生物発酵測定実験を行った。生物発光データを解析し、ピークと周期について検討した。

【結 果】

PER2 の免疫陽性細胞は視交叉上核と三叉神経節の両方とも神経細胞の位置に一致していた。生物発光イメージングにより、三叉神経節全体に日内変動を確認した。生物発光測定により、すべての遺伝子型において、PER2::LUC レベルに明瞭な概日リズムが示された。その周期は視交叉上核よりも三叉神経節で短く、野生型マウスよりも *Cry1*^{-/-} で短く、*Cry2*^{-/-} で長かった。また、各遺伝型の三叉神経節の周期は視交叉上核の周期と相関関係があった。

【結論及び考察】

本研究では、三叉神経節における PER2 発現のリズムに注目し、三叉神経節の概日リズムの制御における *Cry* 遺伝子の役割を検討した。三叉神経節では、PER2 の発現に概日リズムが見られた。免疫組織化学と生物発光イメージングでの結果から、三叉神経節における組織レベルでの概日振動は、主に神経細胞からのシグナルによって生成されていることが示唆された。

三叉神経節での周期は、すべての遺伝子型において SCN の周期よりも有意に短く、*ex vivo* でも SCN とは独立した概日リズムを示し、SCN の時計遺伝子の発現に依存しているのではないことが示された。つまり、三叉神経節は組織特異的かつ自律的な概日リズムを有している。ただし、SCN と三叉神経節がどちらも生体内にある場合は、三叉神経節 が SCN から何らかのシグナルを受けている可能性は示唆される。

三叉神経節の最初のピークは、すべての遺伝子型において SCN の最初のピークより遅かった。また、*Cry* 遺伝子欠損マウスでも SCN と三叉神経節との関係が保たれていることから、生体内でも他の末梢組織と同様に、三叉神経節が中心時計である SCN によって位相調節されていることが示唆された。末梢時計の機能は、それぞれの組織の生理現象に重要な遺伝子の転写のリズムを制御することにより、組織内の生理現象を環境に応じた最適条件に調律することである。つまり、光から受け取る環境の情報によって SCN のリズムの位相が調節され、その SCN のリズムのシグナルを三叉神経節は末梢時計として受け取り、三叉神経支配領域の感覚の感受性がその環境における最適条件となるように位相や周期が調節される。

SCN と三叉神経節における PER2::LUC の発現も *Cry1*^{-/-} と *Cry2*^{-/-} で概日振動が見られた。SCN と三叉神経節の概日周期は *Cry1*^{-/-} マウスで短く、*Cry2*^{-/-} マウスで長かった。最初のピークの位相も、*Cry1*^{-/-} では早く、*Cry2*^{-/-} では遅かった。つまり、*Cry1* と *Cry2* が周期と位相の両方を調節していることが示唆された。

この研究には限界がある。三叉神経支配領域における痛み以外の感覚の日内変動や、各感覚と *Per* や *Cry*、それ以外の時計遺伝子の直接的な関係は今後の研究課題となるだろう。また、抜歯や摂食制限によって三叉神経への刺激が変化した場合の生体レベルでの感覚の日内変動や時計遺伝子の発現リズムを解明するためには、さらなる研究が必要である。

今回、三叉神経節に自律的な概日リズムが存在することを初めて示した。三叉神経支配領域は、器質的な問題がない場合でも舌痛症や知覚過敏が発現する場所である。今回の研究では、三叉神経節が伝達する感覚には日内変動があることを示唆している。今後は、三叉神経系の様々な疾患と時計遺伝子との関係に着目した新たな治療法の開発が期待される。