



Title	マウス顎下腺の概日時計発振過程の解明及び唾液腺機能分子の発現リズム解析
Author(s)	内田, 仁司
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34349">https://doi.org/10.18910/34349</a>
rights	©2016. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license <a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/</a>
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏名(内田 仁司)	
論文題名	マウス頸下腺の概日時計発振過程の解明及び唾液腺機能分子の発現リズム解析
論文内容の要旨	
【緒言】 唾液は三大唾液腺と小唾液腺から分泌される。安静時唾液は分泌速度と構成成分に日内変動を示すことが知られている。生体における生理機能のほとんどは、1日を周期とした日内変動を示し、1) 環境の変化などの外的因子に対応する外因性リズム、2) 体内時計中枢の視床下部視交叉上核に制御される受動的内因性リズム、3) 細胞内で時計遺伝子の発現量が24時間周期で変動することで生じる自律的内因性リズムに制御されると考えられる。唾液腺機能の日内変動は生体の活動期と休止期に対応し、効率的に機能するうえで合目的であるが、その制御機構は明らかでない。	
【目的】 本研究では、マウス頸下腺における機能リズムの制御機構を解明することを目的とした。また、胎生期頸下腺における概日時計の発振開始時期を検証し、生後発達期における頸下腺の概日リズム位相の推移を比較検討した。	
【方法】 1. マウス頸下腺におけるPER2概日リズム測定 <i>Per2::luc</i> ノックインマウスから頸下腺を摘出し、50 μm厚の観察用切片を作成した。CCDカメラを用いて明視野像及び発光像を撮影した。 <i>Per2::luc</i> ノックインマウスから頸下腺を摘出して培養し、光電子増倍管を用いて生物発光を連続的に測定した。時計遺伝子 <i>Cry1<sup>-/-</sup></i> 及び <i>Cry2<sup>-/-</sup></i> マウスの頸下腺について、同様に生物発光を連続的に測定し、PER2発現の概日リズム周期を比較検討した。対照群には同一個体の視交叉上核を用いた。 2. マウス頸下腺における遺伝子群の時刻依存的な発現解析 C57BL/6Jマウスと <i>Cry1<sup>-/-</sup></i> <i>Cry2<sup>-/-</sup></i> マウスからZT4, 8, 12, 16, 20, 24の6点で頸下腺を採取した。 <i>Per2::luc</i> ノックインマウスから頸下腺を摘出して培養した。培養後、6時間ごとに4点で頸下腺組織を回収した。 Total RNAを抽出し、定量化リアルタイムPCRにて遺伝子発現の定量を行った。 3. 胎仔及び新生仔マウス頸下腺の生物発光測定 頸下腺腺房の形成開始期である胎生13.5日齢から1日毎に17.5日齢までの胎仔から頸下腺を摘出し、PER2概日リズムを連続的に測定した。胎生13.5日齢頸下腺における17日間の器官培養を行い、生物発光測定法を用いて、概日リズムの形成過程を観察した。 生後0, 1, 7, 14, 21, 28日齢マウスから頸下腺と視交叉上核を摘出し、生物発光を連続的に測定した。各日齢におけるPER2発現の頂値位相を比較検討した。	
【結果と考察】 1. マウス頸下腺におけるPER2概日リズム 頸下腺においてPER2は腺房部に発現を示した。野生型、 <i>Cry1<sup>-/-</sup></i> 、 <i>Cry2<sup>-/-</sup></i> マウスにおける視交叉上核と頸下腺は、いずれも概日リズムを示し、PER2発現の周期は野生型と比較して <i>Cry1<sup>-/-</sup></i> で短縮し、 <i>Cry2<sup>-/-</sup></i> で延長を示した。以上の結果は、CRYが頸下腺におけるPER2発現の概日周期を調節していることを示している。	

## 2. マウス頸下腺における遺伝子発現解析

*Per2*, *Bmal1*, *Dbp* mRNAの発現は、生体内と生体外培養下の両方で概日変動を示した。*Per2*と*Bmal1* mRNA発現の概日変動は互いに逆位相であった。*Cry1<sup>-/-</sup>Cry2<sup>-/-</sup>*マウス頸下腺では*Per2*, *Bmal1*, *Dbp* mRNAは日内変動を示さず、*Per2*と*Dbp* mRNAの発現量は定常高値で、*Bmal1* mRNAの発現量は定常定値を示した。以上の結果は、頸下腺に転写・翻訳フィードバックループによる分子時計機構が存在し、CRYはリズム発振に必要な因子であることを示している。

水チャネル*Aquaporin 5* (*Aqp5*) は生体内と生体外培養下の両方で概日変動を示した。*Aqp5* mRNAの頂値位相は生体外培養下で*Dbp* mRNAと同時刻であったが、生体内では4時間の位相後退を示した。*Cry1<sup>-/-</sup>Cry2<sup>-/-</sup>*マウス頸下腺では*Dbp* mRNAと異なり、中間で一定値を示した。以上から、*Aqp5* はE-boxを介した発現制御を受けて概日変動を示すが、生体内ではE-box制御以外の因子によって発現調節を受けると考えられた。また、ノックアウトマウスを用いた研究から、AQP5が頸下腺からの水分泌に関与することが明らかとなっており、本研究の結果と共に、*Aqp5*の発現変動が安静時唾液の日内変動に重要な役割を担っていると考えられる。

糖質分解酵素*Amylase* (*Amy*) は生体内と*Cry1<sup>-/-</sup>Cry2<sup>-/-</sup>*マウス頸下腺では概日変動を示さず、生体外培養下においてのみ時間依存的な発現変動を示し、頂値位相は*Dbp* mRNAと同時刻であった。アミラーゼ分泌量は味刺激によって亢進し、口腔領域への刺激に応答する制御を示すことは合目的であると考えられる。以上から、*Amy*は定常状態でE-boxを介した制御により概日変動を示すが、生体内では環境変化に応答する発現制御を受けることで概日変動がマスクされると考えられる。

## 3. 胎仔及び新生仔マウス頸下腺の概日リズム

胎生13.5日齢頸下腺はPER2発現に概日リズムを示さなかった。以後、1日ごとに異なった発現パターンを示し、胎生17.5日齢で明瞭な概日リズムを確立した。概日リズムを示さなかった胎生13.5日齢頸下腺は、長期間の器官培養を行うことで培養後13日目に明瞭な概日リズムを確立した。以上の結果は、頸下腺に発生初期段階で内在性に時計機能を獲得していることを示す。

マウスの生後発達において、生後0日齢、1日齢、7日齢は哺乳期で、生後14日齢、21日齢は哺乳と咀嚼を行う。21日齢で母仔分離による離乳を行い、生後28日齢では咀嚼による摂食を行う。各日齢における概日リズムを測定した結果、出生直後から8-12週齢マウスとPER2概日リズムの位相に違いがなかった視交叉上核に対して、頸下腺では生後0日齢と1日齢で8-12週齢マウスの頸下腺と比較して有意に前方変位を示した。以後の日齢で位相の後退を示し、離乳1週間後の生後28日齢で8-12週齢マウスと同様の位相を確立した。以上から、視交叉上核では出生直後から環境明暗サイクルが主要な同調因子であることに対して、頸下腺では母仔行動のタイミング、食餌時間・摂取様式などが同調因子として作用すると考えられる。

## 【結論】

マウス頸下腺は、時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループに依存した自律的な内因性概日リズムを発振することが明らかとなった。唾液腺機能分子の遺伝子発現は頸下腺自体の内因性概日リズムと共に、視交叉上核によって駆動される受動的な概日リズムに制御される。また、頸下腺発生初期には概日リズム発振機構が内在しており胎生期に明瞭な概日リズムが確立する。頸下腺は生後発達期に受動的な内因性リズムを基盤に外因性リズムを同調因子として、唾液腺機能が最適なタイミングで発揮される概日リズム位相を確立すべく成熟していく。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名(内田仁司)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授	阪井 丘芳
	副査 教授	由良 義明
	副査 准教授	河合 伸治
	副査 講師	福田 康夫

論文審査の結果の要旨

唾液分泌量には日内変動が認められるが、唾液分泌に概日リズムを生じる機構は明らかでない。本研究は唾液腺機能の概日リズムの制御機構を解明することを目的としたものである。

その結果、顎下腺は胎生期に内因性の概日リズムを発振することを明らかにした。また、機能分子の遺伝子発現に概日変動を示したことから、視交叉上核によって駆動される受動的リズムだけでなく、顎下腺自体の内因性概日リズムが唾液腺機能を制御していることが示唆された。

本研究は、唾液腺機能の概日リズムを制御する機構を解明する上で重要な知見を得たものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。