

京都大学	博士（薬学）	氏名	山田 裕之
論文題目	Molecular Clocks in Mouse Skin (マウス皮膚における分子時計)		
(論文内容の要旨)			
約24時間周期の生体リズムは、一つ一つの細胞内に存在する”時計遺伝子”と呼ばれる一群の転写因子が織りなす、遺伝子発現のネガティブフィードバックループにより生み出されている。哺乳類の場合、生体時計システムは視床下部の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus, SCN）を最高中枢とする階層構造を成している。SCNはホルモンや神経シグナルを介して末梢組織に存在する時計を調律し、全身のリズムを制御していると考えられている。 近年、人体最大の臓器である皮膚においても時計遺伝子群が存在し、概日性の発現変動を示すことが報告された。ところが、皮膚細胞の分子時計に関するこれまでの研究には、いくつかの基本的な問題点が未解決のまま残されていた。一つは、日内変動の実験は、既報では全て明暗条件下で実験が行われており、この実験条件では、皮膚の時計が内因性のシステムによって駆動されているのか、あるいは光の刺激の結果の変動なのかは鑑別不能である。また、皮膚という各種上皮組織、結合組織が複合した部位であるが、その全体をひとまとめに扱ってする実験しかなく、細胞の種類による時計の特徴を区別することができなかった。本研究は、皮膚における生体時計の性質、およびその光による影響を、細胞レベルで検討し、皮膚における分子時計の基本的性質を究明したものである。			
第一章 皮膚における時計遺伝子の発現パターン			
最初に、皮膚の時計遺伝子発現パターンに体部位による違いがあるかどうかを調べた。12時間サイクルの明暗条件下、マウスの背部、横腹部、髭周囲より皮膚を採取し、時計遺伝子群の中でも中心的な役割を果たしている <i>Per1</i>、<i>Per2</i>、<i>Cry 1</i>、および <i>Bmal1</i> と、補助的な時計遺伝子である <i>Dbp</i> および <i>Rev-erba</i> の経時的な発現変動プロファイルを解析した。これら時計遺伝子の日内発現変動パターンに関して部位による差はなく、また同様の発現パターンが雌マウスにおいても認められたことから、皮膚時計の基本的性質は性差や体部位とは無関係であることが示唆された。 次に、皮膚の時計が光によって駆動されているのではなく、内因性の機構であるかどうかを検証した。恒暗条件下で飼育したマウスから背部の皮膚を採取し、時計遺伝子がコードする転写因子の中で最も重要な <i>Per2</i> と、時計の出力因子である <i>Dbp</i> の mRNA 量の変化を経時的に追跡した。光刺激のない条件において			

も、*Per2*および*Dbp*のmRNA量の日内変動が観察され、発現位相は明暗条件下で得られたものとほとんど同じであった。免疫組織化学的手法により、表皮ケラチノサイトにおけるPER2タンパク質の陽性細胞数の経時的変化を調べたところ、CT16（CT（Circadian Time）時刻情報のない環境下での主観的な時間で明期の始まりをCT0という）をピークとする日内変動が観察された。以上の結果は、恒暗条件下でもPER2を中心とした転写・翻訳フィードバックループが表皮細胞で作動しており、概日性の振動を生み出していると解される。

また、こうした組織学的アプローチにより、PER2タンパク質はCT16において表皮ケラチノサイトのみに発現するわけではなく、真皮線維芽細胞や毛包など、皮膚を構成するほとんどの細胞において同じように顕著に発現し、CT4では低値を示す生体リズムを示すことが明らかとなった。

第二章 皮膚における時計の振動に必須な因子

恒暗条件下で行動リズムが消失する*Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}マウスの皮膚における時計遺伝子発現量を測定したところ、CT0、CT12の両時刻において*Per2*や*Dbp*のmRNAレベルが高い値で留まっていた。一方、タンパク質レベルでは、CT4およびCT16の両時刻ともPER2タンパク質の陽性シグナルが検出されず、野生型で見られる周期的な変動が認められなかった。このように、*Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}マウスでは代表的な時計遺伝子のmRNA、タンパク質ともに日内変動が失われていたことから、皮膚時計の正常な振動には*Cry*遺伝子が必須であることが示された。

また、SCNを破壊したマウスでは恒暗条件下、CT2、14の両時刻における時計遺伝子発現量が同程度であり、SCN無破壊マウスで見られる発現量の変動が失われていた。さらに、SCN破壊後のマウスを明暗条件下で飼育した場合でも、時計遺伝子の時刻依存的な発現量変化は観察されなかった。これらの結果は、皮膚時計の振動はSCNに依存しており、周囲の光環境とは無関係であることを示している。

本研究の結果、マウス皮膚においては、ほとんどの細胞にも分子時計が存在していること、そして皮膚の時計機能はSCNに制御されており外界の光には影響されないことが明らかとなった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

皮膚における発汗、皮膚血流、表皮細胞分裂など、さまざまな皮膚組織で起こる現象に概日リズムがあることがわかっているが、その詳細は未だ解明されていない。生物にとって極めて基本的な時間システムである生体リズムの根幹を成す時計遺伝子の発振シグナルは、コレステロール合成酵素、アルブミン産生、各種ミトコンドリア酵素など生体機能のベーシックな遺伝子の転写をコントロールすると言われる。皮膚は重要な薬剤の伝達経路であるので、この機構が解明されれば、新しいコンセプトの新薬開発にも繋がる可能性がある。

本研究はまず、時計のコアループを構成する時計遺伝子が各々の発現特質を保持したまま、全身の皮膚組織で、大きな振幅を描いて、どの部位でもリズムミックスに発現していることを始めて報告した。また、皮膚組織は、ケラチノサイトを中心とした表皮、線維芽細胞が主たる真皮、血管・神経の豊富な疎な結合組織である皮下組織よりなる複雑な組織であるが、今回の研究で皮膚組織を構成する各細胞もサーカディアン振動体を持つことが始めて解明された。

生体時計が完全に止まっているCry1-/-Cry2-/-ノックアウトマウスにおいては、皮膚全体としての時計遺伝子のリズムが完全に止まるとともに、各細胞での時計遺伝子もリズム発振を停止していた。このことは、時計遺伝子のフィードバックループが通常の皮膚では回っていることを示している。

また本研究では、生体リズムの振動は、視交叉上核破壊で完全に喪失することもあり、視交叉上核が皮膚の時間の位相を決める。しかも、周囲の明暗環境は、皮膚のリズム位相決定には関与しないということも解明された。

本研究は、多様な細胞で構成され、その機能に日内変動が言われている皮膚組織に時計遺伝子があり、生体リズムを刻んでいることを初めて明らかにし、さらに環境の光周期と直接の因果関係はないことを解明した初めての論文である。

よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年 3月10日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降