

2025 年 1 月 8 日

応用化学・生命工学 専攻		学籍番号	第 189401 号	指導教員	沼野 利佳
氏名	中澤 和雄				手老 龍吾

論文内容の要旨 (博士)

博士学位論文名	外部刺激による概日リズムの変化とその調節
---------	----------------------

(要旨 1,200 字程度)

<p>ヒトを含む地球上の生物は太陽光による24時間のリズムによって行動している。概日リズムは光の情報網膜を通じて脳の中核時計である視交叉上核 (SCN) に基づく日周リズムと、食事によって消化器などの末梢組織を駆動する摂食リズムに大別される。しかし、現代社会は、夜間のスマートフォン使用による日周リズムの変調や、タイムシフトワークや不規則な食生活などにより摂食リズムの変調などにより、この中核時計と末梢時計の時刻 (位相) が脱同調してしまい、生活習慣病など健康問題が生じている。この状況に対して、外部からの投薬や刺激によって日周リズム、摂食リズムを変化させ、2つのリズムを同調させ、健全なリズムを回復させることで健康を維持することを目的として、日周リズムと摂食リズムの2つのリズム位相について研究を行った。</p> <p>日周リズムの調節として、メラノプシンとDNAアプタマーに着目した。網膜の青色光受容体であるメラノプシンは光刺激を情報としてSCNに伝達している。Cell-SELEX法により、メラノプシンに特異的に結合するDNAアプタマー (Melapt) を15種類取得した。Melaptの機能解析を細胞の<i>in vitro</i>、マウス動物の<i>in vivo</i>実験により機能解析を行った。<i>in vitro</i>実験系は、時計遺伝子<i>Period2</i>の24時間周期の発現振動が発光シグナルにてモニターできる細胞株をもちいて、また、<i>in vivo</i>実験系は、<i>Period1</i>の24時間周期の発現振動が発光シグナルにてモニターできる組換えマウス(<i>Per1:Luc Tg</i>マウス)の SCNスライスをもちいてリズムの位相変化を調べた。Melaptを添加と光照射したサンプルを24時間モニタリングし解析したところ、主観的夜明けと主観的昼過ぎの両タイミングで位相を前進させるMelapt04と、位相を後退させるMelapt10の使用しやすいDNAアプタマーが2種類が同定された。また、添加のタイミングにて位相前進後退が逆になる Melaptも多数同定された。また、<i>in vitro</i>実験と<i>in vivo</i>実験の結果は同じであった。これにより、Melaptを用いることで、日周リズムを任意の位相に移動させることや、中枢と末梢のリズム位相の脱同調した時差ぼけ状態の治療に用いることが可能だと考えられる。</p> <p>また、摂食リズムの操作として、摂食要求などの非光刺激による同調因子として考えられる神経ペプチドY (NPY) の測定と摂食制限による同調について研究を行った。時差ぼけが生じる要因の一つとして不規則な食事による末梢組織の摂食リズムの変動があげられる。そこで<i>Per1:Luc Tg</i>マウスを用いて、休息期となる昼間の4時間のみ給餌する制限摂食 (RF) を行った。RFを行ったマウスよりSCNや末梢消化器サンプルを取得し、24時間の発光リズムを測定した。食道と空腸の位相ピークはRF7日目までにRFのタイミングに合わせるように移動した。しかし、SCNの位相ピークは変化しなかった。このことより、消化器の各末梢時計はSCNとは別個に働き、摂食タイミングに対して同調していると考えられる。摂食の行動に対して、SCNなどの中枢時計からの独立を働きかけるキー分子として、NPYを仮定した。NPYは外側膝状体中隔葉 (IGL) から各部へと投射される摂食因子であり、SCNへと投射されていることも確認されている。そこで、NPYの分泌顆粒を蛍光蛋白Venusのシグナルで可視化できるNPY::Venus Tg 組換えマウスを作製し、IGLからSCNへとNPYが軸索を伝わって投射される状態を共焦点顕微鏡にて観察した。RF2日目のSCNへのNPY投射量が増加したがRF7日目のNPY量はコントロール群とあまり変わらないレベルまで低下した。摂食要求の増加とともにNPYの分泌が増加するかを確かめるため、絶食状態におけるNPYの分泌を定量イメージングし、絶食状態60時間までは、増加し続け、その後、給餌条件に戻すと20時間でコントロール群とあまり変わらないレベルまで低下した。このことより、摂食の行動に対して、摂食要求の増加とともにSCN分泌されるNPYが、中枢時計から食事のタイミングでリセットされるいわゆる腹時計が独立して、消化器官のリズムを支配するというモデルをたてた。</p>
--

以上の結果より、日周リズムと摂食リズムの脱同調は、**Melapt**を用いることで日周リズムの位相操作が可能となり、摂食タイミングで同調される消化器の各末梢時計の位相をかえて、明暗の光時計と腹時計の同調を促し、時差ぼけや睡眠障害の一助となることを提言した。また、**NPY**の分泌が、両リズムの脱同調の指標となり、これは時差ボケ状態の指標となる可能性をみいだした。

Date of Submission (month day, year) : 1 / 8, 2025

Department of Applied Chemistry and Life Science	Student ID Number D189401	Supervisors Rika Numano Ryugo Tero
Applicant's name Kazuo Nakazawa		

Abstract (Doctor)

Title of Thesis	Response and regulation of circadian rhythms by external stimulus
-----------------	---

Approx. 800 words

Terrestrial organisms, including humans, display behaviors intricately aligned with the 24-hour cycle of sunlight. Circadian rhythms can be broadly classified into diurnal rhythms, which are regulated by the central pacemaker, the suprachiasmatic nucleus (SCN), in response to light signals transmitted via the retina, and feeding rhythms, which govern peripheral tissues such as the digestive system through food intake. Nevertheless, circadian rhythms can be disturbed by various factors, such as nocturnal smartphone usage, which interferes with diurnal rhythms, and irregular work shifts or erratic eating patterns, which disrupt feeding rhythms. In response to this issue, we conducted investigations into both circadian and feeding rhythm systems, with the objective of modulating these rhythms through the administration of external pharmacological agents and stimuli. Melanopsin and DNA aptamers were examined as modulators of circadian rhythms. Melanopsin, a blue light receptor in the retina, transduces light stimuli into neural signals that are relayed to the suprachiasmatic nucleus (SCN). Employing the Cell-SELEX methodology, we identified 15 DNA aptamers (Melapt) that selectively bind to melanopsin. Functional assessments of Melapt were conducted both in vitro (using the *Per2*:ELuc cell line) and in vivo (in *Per1*:Luc transgenic mice). Monitoring of samples with Melapt over a 24-hour period in both in vitro and in vivo settings revealed two distinct types of Melapt: Melapt04 advanced the phase of rhythms at both subjective dawn and subjective midday, while Melapt10 induced a phase delay. The phase shifts observed in both experimental conditions were congruent. These results suggest that Melapt can effectively modulate circadian rhythms, offering potential therapeutic applications for disorders such as social jet lag.

Restricted feeding was employed as a means to regulate feeding rhythms. Irregular meal times, which contribute to social jet lag, have the potential to disrupt feeding rhythms in peripheral tissues. *Per1*:Luc transgenic mice were subjected to a 4-hour restricted feeding (RF) regimen during their resting period; samples from the SCN and peripheral digestive organs were subsequently collected, and 24-hour luminescence rhythms were assessed. By day 7 of RF, phase peaks in the esophagus and jejunum shifted to align with the timing of RF. However, the phase peak of the SCN remained unaffected. These findings suggest that the peripheral clocks within the digestive organs function independently of the SCN and synchronize with the feeding schedule.

Neuropeptide Y (NPY) is believed to be a key modulator of the central clock, including the suprachiasmatic nucleus (SCN), in the regulation of feeding behavior. To explore NPY secretion to the SCN, NPY::Venus transgenic mice were generated. Confocal microscopy of SCN slices from NPY::Venus Tg mice allowed for the observation of NPY-containing secretory granules labeled with Venus signals. The results revealed that the quantity of NPY projected to the SCN increased on day 2 of restricted feeding (RF), although no significant difference in NPY levels was observed on

day 7 of RF when compared to control mice. The release of NPY-containing secretory granules to the SCN was elevated during fasting, suggesting a potential impact on the function of the rhythmic oscillator within the SCN.

These findings illustrate that Melapt can be utilized to modulate circadian rhythms. Additionally, we observed that desynchronization between circadian and feeding rhythms occurs when feeding times are altered and maintained. Melapt, which stabilizes feeding times and promotes wakefulness, may hold therapeutic potential for the treatment of social jet lag and sleep disorders.

These results suggest that the diurnal rhythm can be manipulated through the application of Melapt. Furthermore, it was noted that desynchronization between the diurnal and feeding rhythms arise due to the independent regulation of each peripheral clock in the digestive organs by fluctuations in feeding timing, independent of the SCN. In this study, we demonstrated that such desynchronization can be modulated through functional alterations in signaling molecules, such as melanopsin and NPY, offering valuable insights into potential treatments for social jet lag and sleep disorders.