

豊橋技術科学大学長 殿

2025 年 2 月 26 日

応用化学・生命工学 専攻

学位審査委員会

委員長 高島 和則



論文審査及び最終試験の結果報告

このことについて、博士学位論文審査を実施し、下記の結果を得ましたので報告いたします。

学位申請者	中澤 和雄		学籍番号	第 189401 号
申請学位	博士 (工学)	専攻名	大学院工学研究科博士後期課程 応用化学・生命工学 専攻	
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 (Response and regulation of circadian rhythms by external stimulus)			
論文審査の期間	2025年 1 月 16 日 ~ 2025 年 2 月 21 日			
公開審査会の日	2025 年 2月 21日	最終試験の実施日	2025 年 2月 21日	
論文審査の結果*	合格		最終試験の結果*	合格
審査委員会(学位規程第6条)				
学位申請者にかかる博士学位論文について、論文審査、公開審査会及び最終試験を行い、別紙論文内容の要旨及び審査結果の要旨のとおり確認したので、学位審査委員会に報告します。				
委員長	手老 龍吾			
委員	浴 俊彦		沼野 利佳	
		印		印
		印		印

※論文審査の結果及び最終試験の結果は「合格」又は「不合格」の評語で記入すること。

論文内容の要旨

地球上に生存するほぼ全ての生物は、約24時間の地球の自転周期に、体の中の概日リズムの時刻(位相)を同調させ生理現象を効率的に実行していくという概日リズムを保持している。哺乳類の概日リズム中枢は、脳内の視交叉上核(SCN)であり、末梢組織や行動のリズムを支配し、個体全体として画一的な概日リズムに統一されているが、外界の刺激が各臓器のリズム位相に及ぼす影響により、各時計が脱同調し、時差ボケなどの状況に陥る。本論文は、中枢SCNと消化器系の末梢組織の概日リズム位相を調節するための刺激を適切なタイミングで与えることにより、脱同調から画一的な概日リズムを復活させる提案するという研究である。具体的には、新規試薬の発見と新規計測モデルマウスの作成と、それをもちいた概日リズムの個体における統一的なリズム同調に関する新規モデル、並びに健全なリズムを維持するための社会的提言に関する研究成果をまとめたものである。本論文は5章より構成されており、第1章緒言に本研究に関する背景と研究全体の目的、第2章に新規核酸試薬と光刺激による光時計の概日リズム位相制御に関する研究の緒言、実験手法、結果、考察が、第3章には、食事のタイミングによるいわゆる腹時計の概日リズム位相制御に関する研究の緒言、実験手法、結果、考察が、第4章では、摂食要求によるNPYの分泌により摂食時計が独立するという独自のモデルを提唱。第5章は、研究成果総括、謝辞が記されている。各章の概要は以下の通りである。

第1章では、概日リズムに関する研究の歴史と体内の中枢と末梢の概日時計の脱同調による健康被害という現在の課題、それをうけて、外部からの刺激により光時計と腹時計の同調を達成し、健康状態を回復させる提案をするという本研究の目的を述べた。第2章では、外界の明暗サイクルの情報を神経連絡により時計の中枢器官であるSCNに伝達するキー分子メラノプシンの機能を、新規に作成した核酸試薬であるDNAアプタマーにより調節した。その結果、光によって駆動する中枢SCNの光時計のリズムを、どのタイミングでも位相前進や後退させる核酸試薬として使用しやすいDNAアプタマーが同定された。これはどのタイミングで服用しても同じ方向に、リズム位相を前進や後退させうる時刻調節剤として用いられる可能性がある。第3章では、食事のタイミングにより空腹状態からくる摂食要求により同期される摂食同調振動 (Food-entrainable Oscillator:FEO)という時計中枢が、光によって駆動される通常の中枢SCNとは独立して、消化器系の末梢臓器や給餌前の予知運動のリズムを支配することが見出された。食事のタイミングによる消化器系の末梢組織の位相リセット機能を鑑み、食事のタイミングによるいわゆる腹時計の概日リズム位相制御についてのべた。第4章では、このとき、神経ペプチドY(Neuropeptide Y:NPY)というキー分子が、給餌のタイミングによる摂食要求が高まると、中枢SCNへ分泌され、この現象がFEOをSCNから独立させ、消化器系の末梢組織や、給餌前の予知運動のリズムの位相を支配するというモデルをたてた。第5章では、光時計と腹時計、それぞれのリズムを調節し、相互に同調させ個体全体での統合リズムが確立できることを提唱した。この研究により、中枢と末梢組織や行動のリズム位相を同調させることにより、体全体の統一的なリズムを確立すれば、夜に強いLED照明をうけたり、海外出張やシフトワークに従事したりなど概日リズムがみだれやすい現代社会において、健康状態を回復できる可能性を提言した。

審査結果の要旨

地球上の全生物がもつ約24時間周期の概日リズムは、中枢器官である脳内のSCNが、外界の明暗サイクルに末梢組織や行動のリズムの位相を同調させ、個体全体として画一的な概日リズムに統一されている。近年、夜間のブルーライトを浴びる生活や、シフトワーカー、海外出張の多い人に、概日リズムの乱れからくる肥満や高血圧などの生活習慣病の健康問題が多く報告されている。これは、外界の刺激が、SCNと各臓器や行動のリズム位相に及ぼす影響により、各時計が長期にわたり脱同調してしまうためである。概日リズムの位相を調節し、概日リズムシステム全体を健全な状態に維持することは、医療分野などで重要な研究課題であることは明らかである。

第2章では、哺乳類の概日リズムを規定する最も強い刺激は、目に入射する光刺激であり、具体的には外界の昼と夜の明暗サイクルとなる。目からの光入力により、時計中枢のSCNが、視神経細胞から神経投射を受け、SCNの生理活性リズム、遺伝子転写発現レベルが一斉にリセットされ、外界の明暗日周リズムと同調する。この時、キー分子として網膜上の光を受容するメラノプシンというタンパク質に対して、特異的に吸着し、その機能を変化させる核酸試薬であるDNAアプタマーをスクリーニングにより取得した。24時間周期の転写振動をしめす時計遺伝子*Period1,2(Per1,2)*の発現を、蛍光発光タンパク質をレポーターにしてリアルタイムでモニターする実験系を駆使し、DNAアプタマーの光による位相リセット機能のスクリーニングを細胞レベルと組換えマウス(*Per1::luc* 組換え)SCN スライスを用いた組織レベルで実施した。この実験系は、リアルタイムで、細胞や個体からの各組織リズムを発光振動のサインカーブとしてとらえることができ、容易に位相変化が定量的に測定できるという独自の実験系である。その結果、通常の光による位相調整よりも、使用しやすいDNAアプタマーをみいだした。具体的には自然では、光を受けるタイミングにより、光刺激が夕方であると位相後退、光刺激が夜明けでは、位相前進するが、一部のDNAアプタマーを用いると、どのタイミングでも位相前進や後退を固定化できた。これはどのタイミングで服用しても同じ方向に、リズム位相を前進や後退させる時刻調節剤として用いることができる。また、この位相変化モニターで、細胞と動物レベルで、DNAアプタマーが同じ機能を示すことを確認し、本核酸試薬が哺乳類の個体に対しても時刻調節剤として機能する可能性を示した。

第3章では、給餌のタイミングは、明暗サイクルでも、外界の刺激がない恒暗条件でも 中枢時計SCNの位相には影響しないが、空腸や腎臓という消化器系の末梢組織のリズムを同調させる。そして同じ消化器官でも食道についてはSCNに近い挙動を示すという新しい知見を独自の*Per1::luc*マウスの各培養臓器のしめす発光振動リズムの位相変化から発見した。この系は1匹のマウス個体から複数の組織のリズムを、同時にリアルタイムで観察できるため、個体の中での各臓器のリズムの同調機能を比較することができる研究室独自の系である。この系を用いて消化器官ではこれまで 食事のタイミングにより空腹状態からくる摂食要求により同期される振動体FEOという時計中枢が、光によって駆動される通常の中枢SCNとは独立して、消化器系の末梢 臓器や給餌前の予知運動のリズムを支配することが見出された。この事実を受けて、第4章では、普段は、FEOもSCNの支配下にあるが、食事のタイミングにより生まれる 空腹時の摂食欲求が、中枢SCNからFEOを独立させるのではないかと仮説を立て、空腹時にSCN周辺に分泌されるNPYがこのキー分子ではないかと予想した。そこで、NPYの分泌を蛍光タンパク質Venusとの融合タンパク質を発現し、NPYの分泌顆粒の中に一緒に選択的に濃縮され、蛍光顕微鏡にてNPYの分泌量を蛍光イメージングで観察できるNPY::Venus組換えマウスを独自で作成した。このマウスを用いて、絶食時の空腹刺激が、SCN周辺に大量に分泌され、給餌を復活させるとNPYの分泌が減少することから、NPYがSCNのFEOへの支配力を減弱させ、FEOが中枢時計として消化器系の末梢組織や、給餌前の予知運動のリズムを支配

するというモデルをたてた。これらの成果は、夜間勤務の人や海外出張が多い人によく起こる頭の光時計と食事のタイミングの腹時計の位相の脱同調状態から来る時差ボケや生活習慣病、また癌などの健康被害が軽減できという価値あるものである。

また、2021年7月に英国にて開催されたThe Physiological Society,国際会議にて英語の口頭発表を行い、専門分野における研究内容と自身の意見を発信するために十分な語学力を有している。

以上の博士論文の内容および最終試験の評価から、学位申請者は博士(工学)の学位を授与するにふさわしい研究能力と学識を備えていると判定した。