[PRESS　RELEASE]

2021 年 12 月 21 日

京都府公立大学法人
京都府立医科大学
KYOTO PREFECTURAL UNIVERSITY OF MEDICINE

発生過程に見られる体内時計の抑制が正常な胎児の成長に不可欠であることを解明！

～体内時計のリズム発振機構が分節時計に干渉し体節形成を阻害することを発見～

本研究成果のポイント
○発生過程を通し、哺乳類の体内時計の形成は非常に遅く、胎児期後半までは抑制される
○胎児を形づくる体節形成期を人工的に再現した胚オルガノイドを用いて、体内時計の鍵因子 CLOCK/BMAL1 の発現が分節時計に干渉し正常な体節形成を妨げることを発見
○分節時計が正常に機能するために体内時計の抑制が必須であり、哺乳類の遅い体内時計の発生には生理学的な意義がある

京都府立医科大学大学院医学研究科　統合生理学　教授　八木田和弘　および　講師　梅村康浩　らの研究グループは、胎児の発生過程に現れる二つの生物時計（分節時計と体内時計）の関係性に注目し、発生前半に「体内時計が抑制されている」ことが正常な胎児の発生に必要であることを明らかにしました。本件に関する論文が、米国科学雑誌『米国科学アカデミー紀要』に 12 月 20 日付けで掲載されましたのでお知らせします。

新生児期の赤ちゃんには睡眠覚醒リズムなど概日リズムが見られません。一見、不利に思える現象の背景に、正常な発生制御に不可欠なメカニズムが関連することを発見しました。これまで発生学の研究はもっぱら「形態形成（形づくり）」に焦点が当てられていましたが、生物時計によるリズム（時間）の制御が正常な胎児の発生に重要な役割を果たしていることを明らかにしました（**図１**）。本研究成果をもとに、今後は、胎児の体内時計生活リズムが胎児に与える影響などの理解が進むことが期待されます。

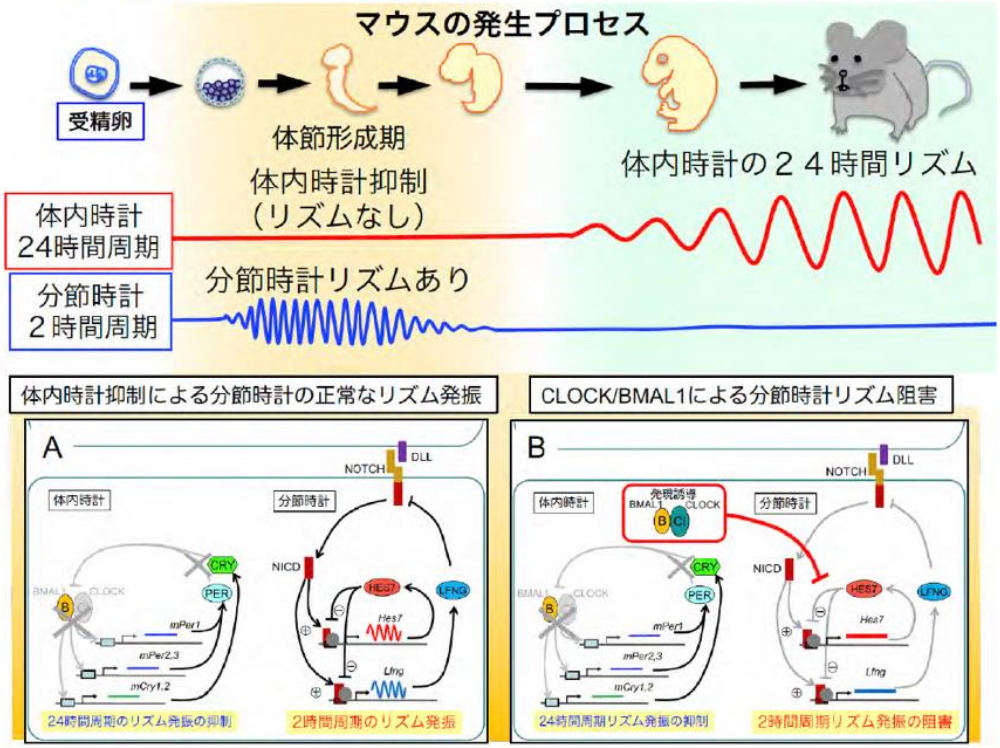
【論文基礎情報】

掲載誌情報	雑誌名　PNAS（アメリカ科学アカデミー紀要） 発表媒体　■ オンライン速報版　□ ペーパー発行　□ その他 雑誌の発行元国　アメリカ合衆国 オンライン閲覧　　可（URL） https://doi.org/10.1073/pnas.2114083119 掲載日　　米国東部時間 2021 年 12 月 20 日（月）15:00 ／日本時間 12 月 21 日（火）5:00
論文情報	論文タイトル（英・日）： Circadian key components CLOCK/BMAL1 interfere with segmentation clock in mouse embryonic organoids （マウス胚オルガノイドによる体内時計の鍵因子 CLOCK/BMAL1 による分節時計への干渉機構の解明）

～京都府立医科大学は 2022 年、創立 150 周年を迎えます～

著者情報	代表著者	京都府立医科大学大学院医学研究科	統合生理学	八木田和弘
	共同著者	京都府立医科大学大学院医学研究科	統合生理学	梅村康浩
		京都府立医科大学大学院医学研究科	統合生理学	小池宣也
		京都府立医科大学大学院医学研究科	統合生理学	土谷佳樹
		京都大学ウイルス再生医科学研究所	渡邊仁美	
		京都大学ウイルス再生医科学研究所	近藤玄	
		京都大学ウイルス再生医科学研究所	影山龍一郎	

（図１） 正常な胎児の成長に不可欠な発生過程における体内時計リズム抑制



A）体節形成期には24時間周期の体内時計は抑制され、分節時計が約２時間周期のリズムによる体節形成を制御している。

B）体節形成期に体内時計の鍵転写因子CLOCK/BMAL1を発現誘導すると、分節時計のリズム発振に干渉し体節形成が阻害される。

【論文概要】

１　研究分野の背景や問題点

＜体内時計は生涯にわたり全身の細胞で２４時間リズムを刻む＞

体内時計は生体機能に約２４時間周期の生体リズムを与え、地球の自転周期に伴う環境変化に適応し恒常性を維持するために必須の生理機能です。体内時計はヒトを含む哺乳類だけでなく、全ての脊椎動物や昆虫、さらには植物や単細胞生物など、地球上のほとんどの生物に備わっています。ヒトを含む哺乳類では、睡眠覚醒リズムはもちろん、内分泌や自律神経、消化器機能や循環器機能、さらには認知機能に見られる概日リズムを制御し、それぞれの機能を最適のタイミングで調節しています。体内時計の乱れは様々な体調不良を引き起こし、多くの疾患リスクと関連することが知られています。体内時計は、哺乳類では視床下部の視交叉上核に「中枢時計」と呼ばれる中枢機能が存在し、全身の細胞にある体内時計（末梢時計）を調律し統合することで、個体レベルの生体リズムを制御し健康な状態を保つことができています。体内時計は時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群が構成する転写-翻訳フィードバックループと呼ばれるメカニズムによって２４時間周期のリズムを生み出しています。このフィードバックループの要となる鍵因子が CLOCK と BMAL1 と呼ばれる転写因子です。

＜体内時計は胎児期の後半に形成される＞

以前からラットやマウスの胎児には出生直前まで体内時計のリズムが見られないこと、胎児期を通して体内時計が形成されることが知られていました。哺乳類の場合、母親の体内時計の作用が胎児に及ぶため、胎児の体内時計は必要ないと考えられてきました。そのため、体内時計の発生メカニズムに関する研究はほとんど進んでおらず、未開のフロンティアとも言える状況が長く続いていました。

＜体内時計は ES 細胞や iPS 細胞には存在せず細胞分化に伴って形成される＞

我々は 2010 年に、マウスの胚性幹細胞（ES 細胞）や iPS 細胞を活用し、未分化な多能性幹細胞には体内時計がないこと、しかし試験管内で分化誘導することで細胞自律的に体内時計が形成されることを世界で初めて明らかにし、体内時計の発生が細胞分化と密接に関連することを発見しました。

さらに、ES 細胞では体内時計の鍵因子である CLOCK/BMAL1 が機能していないことを明らかにし、ES 細胞やマウス胚の細胞では体内時計がリズムを刻まないよう厳密に制御されていることを示しました。

＜哺乳類に見られる「遅すぎる体内時計の発生」の謎＞

これら我々の一連の研究から、単細胞生物にも備わる体内時計は、進化的には、広くどの細胞にも普遍的に存在することが通常の状態であって、哺乳類の発生過程において強く抑制されていることが特別な状態である可能性が示唆されていました。

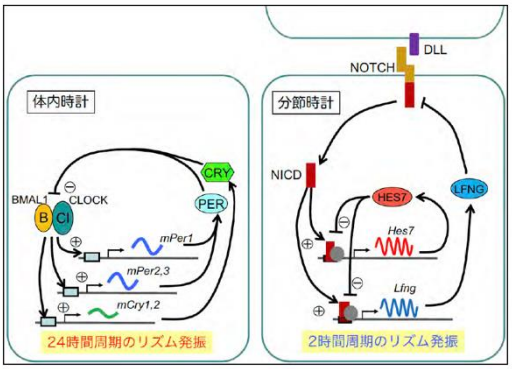
そこで、今回、「体内時計が抑制されていることの意味」を明らかにするため、体内時計がない時期に見られる「体節形成」と言う現象との関連性に注目し研究を行いました。哺乳類では他の生物種に比べ発生過程での体内時計の形成が非常に遅いですが、これが「制御された遅さ」である可能性を検討し、その理由を明らかにすることが研究の目的です。

２　研究内容・成果の要点

＜胎児の形を決めるもう一つの時計「分節時計」との関係性に着目＞

体節形成は、脊椎動物の正常な発生に不可欠な現象であり、我々の背骨に見られるような規則正しい「節」を作り、これをもとに脊椎動物の身体の基本形を形成していきます。したがって、体節形成が障害されると正常な発生が進まず多くの場合致死性の異常をきたします。この体節形成を制御する機構が「分節時計（体節時計）」と呼ばれるもう一つの生物時計です**（図２）**。分節時計は体内時計と異なり、生物種によってその周期が異なります。マウスの場合は約２時間周期のリズムであり、ヒトの場合は４～５時間周期のリズムを刻みます。そして、主として体節形成期を含む発生過程において明瞭なリズムを刻んでいることが知られています**（図３）**。

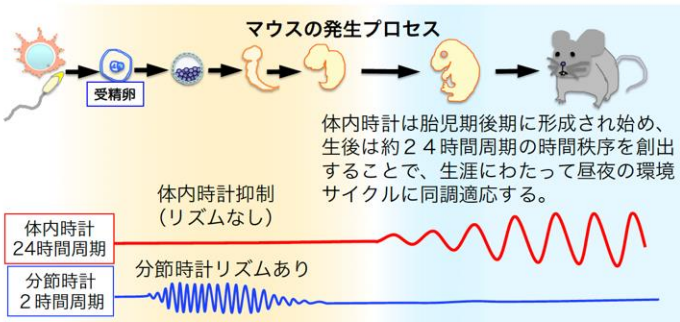
（図２）二つの生物時計：24時間周期の体内時計と２時間周期の分節時計



（図２）生体内には、主に生後の環境周期への適応を担う約24時間周期の「体内時計」と、主として発生過程における体節形成を担う約2～4時間周期の「分節時計（体節時計）」が存在し、それぞれの時期の生体内における時間秩序の創出に寄与している。

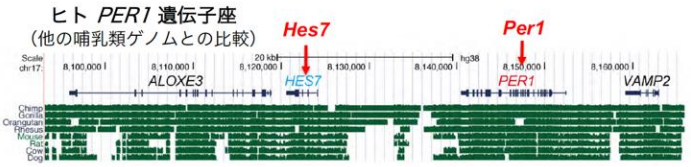
地球の自転周期に生体機能を適応させる体内時計は、時計遺伝子によって細胞レベルでリズムを生み出していることは上述の通りです。体内時計を構成する時計遺伝子には、Clock や Bmal1 と並んで重要な Per1 と言う時計遺伝子があります。実は、この Per1 遺伝子を詳しく調べると、体節形成に不可欠な分節時計の主役である Hes7 遺伝子が、ゲノム上で隣接していることがわかりました**（図４）**。２時間周期と２４時間周期の二つの異なるリズムを生み出す遺伝子が隣同士に存在することは、体節形成期に２４時間周期の体内時計が強く抑制されていることに加えて、今回の研究テーマである「体内時計と分節時計の関係性」を積極的に調べようとする動機の一つとなりました。

（図３）発生過程を通した分節時計と体内時計の関係性に着目



「分節時計」は動物の形を決める脊椎動物の基本骨格となる体節形成を制御する。分節時計の異常は脊椎の形成異常をきたし、胎児の正常な成長ができなくなる。

（図４）体内時計の振動遺伝子Per1と
分節時計の振動遺伝子Hes7がゲノム上で隣接する



体内時計の時計遺伝子*Per1*は、CLOCK/BMAL1によって転写が活性化され、成体においては全身の細胞で明瞭な約 24 時間周期の発現リズムが見られる。分節時計のリズム発振に必須の遺伝子Hes7が、24時間周期で発現振動する体内時計の時計遺伝子Per1の隣に存在する。

ES 細胞から誘導した「未分節中胚葉」を用いた分節時計のリズム解析

今回、我々は、分節時計の主役である Hes7 遺伝子のリズムを指標にして、体内時計の鍵因子である転写因子複合体 CLOCK/BMAL1 が分節時計のリズムに及ぼす影響を観察しました。通常は母親の子宮内で進む胚発生のプロセスをリアルタイムに観察するため、in vitro（試

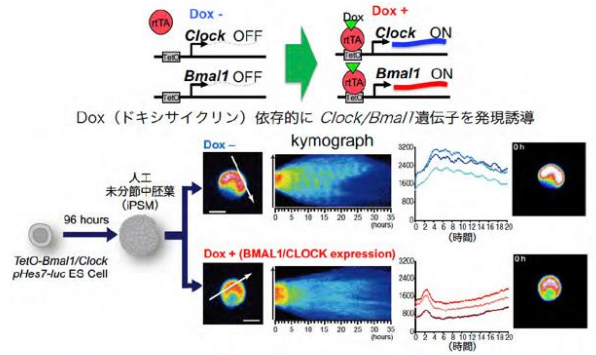
験管内）で胚発生を再現する実験系を活用することにしました。まず、分節時計がリズムを刻んでいる未分節中胚葉（pre-somitic mesoderm,PSM)と呼ばれる組織をマウス ES 細胞から人工的に誘導した未分節中胚葉（induced PSM, iPSM）を用いた観察です。

具体的には、Hes7 プロモーターに蛍の発光遺伝子ルシフェラーゼを組み込んだ発光レポーター（Hes7-luc）を導入したマウス ES 細胞を用い、ドキシサイクリンという抗生物質依存性に Clock と Bmal1 遺伝子を発現誘導できるよう遺伝子改変した ES 細胞を分化誘導し、CLOCK/BMAL1 発現の有無による Hes7 遺伝子の分節時計リズムの変化をリアルタイムイメージング等の方法で解析しました。

体内時計の鍵因子 CLOCK/BMAL1 による分節時計リズム阻害

まず、iPSM において、Hes7-luc でリードアウトした約２時間周期の明瞭な分節時計のリズムが再現できることを確認しました。その上で、ドキシサイクリンを添加し、Clock/Bmal1 を発現誘導することによって、Hes7-luc のリズムが完全に消失することが明らかになりました（**図５**）。CLOCK/BMAL1 の発現誘導によって変化する遺伝子の網羅的な解析により、分節時計の振動制御に重要な役割を果たす細胞内シグナル経路である MAPK シグナル経路・WNT シグナル経路・Notch シグナル経路に含まれる遺伝子群の変化が見られることから、CLOCK/BMAKL1 の発現が Hes7 を中心とする分節時計のリズム制御メカニズムに干渉し２時間周期の時間秩序を撹乱することが示唆されました。

（図５）体内時計の鍵因子CLOCK/BMAL1による
人工未分節中胚葉（iPSM）における分節時計のリズム停止



Dox（ドキシサイクリン）依存的に *Clock/Bmal1*遺伝子を発現誘導できるマウスES細胞を用い、人工的にin vitro（試験管内）で未分節中胚葉を分化誘導。未分節中胚葉で明瞭なリズムを刻む分節時計の振動遺伝子Hes7に注目し、約２時間周期の転写リズムに及ぼす影響を検討。

さらに、上述のように、Hes7 遺伝子が体内時計の Per1 遺伝子とゲノム上で隣接していることに注目し、Per1 遺伝子の周辺領域に存在する他の遺伝子（Vamp2, Aloxe3）の発現も併せて RNA-seq および RT-qPCR にて解析したところ、これらの遺伝子のプロモーター状には CLOCK/BMAL1 が結合するエンハンサーが存在しないにもかかわらず、CLOCK/BMAL1 依存的にこれらの遺伝子発現の亢進が見られました。このような一つの遺伝子発現の影響が隣接する遺伝子の発現にも影響する現象は以前から知られており「リップル効果(Ripple Effect)」と呼ばれています。

このように体内時計の鍵因子 CLOCK/BMAL1 の強制的な発現により、分節時計を制御する細胞内シグナル伝達の撹乱、および Per1 遺伝子の発現による波及効果としてのリップル効果によって、Hes7 遺伝子の２時間周期の規則正しいリズムが破綻し分節時計の機能が強く障害されることが明らかになりました。

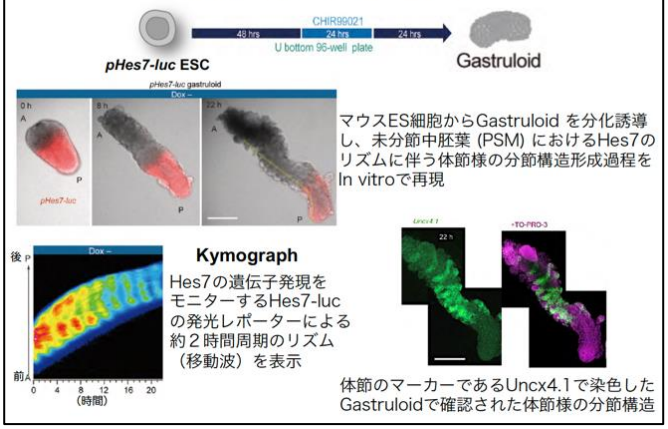
胚オルガノイド「Gastruloid」を用いた CLOCK/BMAL1 による体節形成阻害の観察

さらに、CLOCK/BMAL1 の強制的な発現によって実際に体節形成にどのような影響を及ぼすのかを検討するため、体節形成が再現できる胚オルガノイドである gastruloid（ガストロイド：人工擬似胚）を用いた体節形成のリアルタイムイメージング系を確立しました。Gastruloid は、体節形成そのものを試験管内で再現することができるため、分節時計のリズムのみならず体節形成に及ぼす影響まで観察できることが可能になります（**図６**）。

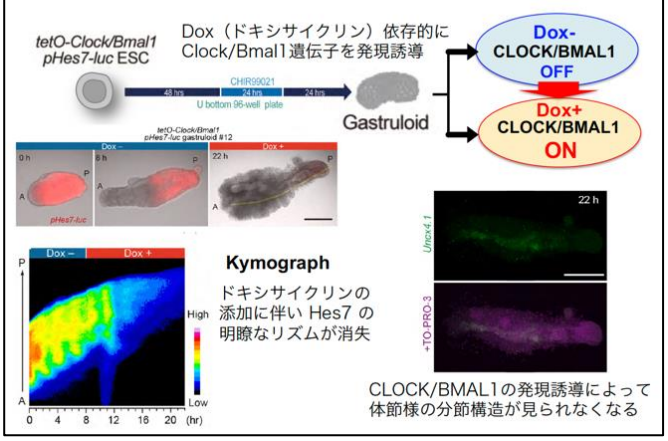
この、分節時計のリズムに伴う体節形成のプロセスを直接観察できる方法を駆使し、体内時計の鍵因子であるCLOCK/BMAL1 が発生の早い段階で機能することによる影響を観察しました。その結果､CLOCK/BMAL1 の発現をオフにした場合には規則正しい分節構造がHes7 のリズムに従って形成されているのに対し､CLOCK/BMAL1 を発現誘導すると Hes7 のリズム消失とともに分節構造の形成も消失することが確認されました**（図７）**。

以上の結果から、胎児期の前半までは機能せず抑制されている体内時計の鍵因子 CLOCK/BMAL1 を体節形成期に強制的に発現することで、分節時計に干渉し２時間周期のリズム制御を破綻させ体節形成を阻害することが明らかになりました。言い換えれば、本研究によって、発生過程において器官形成期が終わってから体内時計の発生が開始されることには、正常な発生プロセスにおいて極めて重要な生理学的意義があることが示唆されました。

（図６）胚オルガノイド Gastruloid による体節様の分節構造の in vitro（試験管内）での再現



（図７）胚オルガノイド Gastruloid におけるCLOCK/BMAL1 によるHes7の発現リズムと体節形成の阻害



発生過程に現れる２時間周期と２４時間周期の二つのリズムは、正確にそれぞれのリズムを刻むことで時間秩序を生み出し、その時間秩序に従って胎児の成長が制御されています。哺乳類においては、この二つのリズムが同時に出現することはなく、相互排他的な関係にあります。それは、分節時計と体内時計が生み出すそれぞれに固有の周波数が生物学的に重要な意味を持つため、リズムの干渉が起きることを避けた結果として成立した現象かもしれません。発生過程を司る二つのリズムによって、正常な胎児の成長が制御されていると言えるのではないかと考えています**（図１参照）**。

３　今後の展開と社会へのアピールポイント

「生命はリズムでできている」

本研究は、体内時計と分節時計と言う普遍的な二つの生物時計の関係性について明らかにした基礎研究です。従って、本研究成果がそのまますぐに何かの役に立つわけではありません。しかし、生命の根源である発生過程を制御する基本原理として「リズムによる発生制御」と言う概念を提示したことには大きな意味があると考えています。

これまで、妊娠期間中は化学物質などを想定した安全性については多くの研究があり、薬の使用に関しても多くの情報があります。しかし､「時間」と言う目に見えず実体がない環境要因の影響については、エビデンスが乏しく有用な情報がほとんどない状況でした。今回､「時間を操る」ことで受精卵から赤ちゃんが生まれるまでの発生過程を精密に制御している生命の営みが明らかになったことで、もっぱら形態形成メカニズム中心であった発

生学研究に「時間の制御」という新たな観点を取り入れる第一歩になったと考えています。このことは、妊婦さんが妊娠期間を通してどのような生活スタイル上の注意をすれば良いか、どの時期にどのような影響があるのか、などについてもこれまでとは異なる視点から有用な情報が提供できる可能性があると考えています。

本研究成果は、我々が切り拓いてきた体内時計の発生研究に関する知見のみならず、本論文の共著者でもある京都大学の影山龍一郎先生が積み重ねてこられた世界をリードする分節時計研究の知見との融合によって実現しました。体内時計の２４時間周期と分節時計の２時間周期、二つのリズムが発生過程のそれぞれの時期を支配しそれぞれの周波数による時間秩序を創出することの意味は、生物進化や胎児学などへの波及効果も含め、今後の研究によってさらに理解が進むと思われます。

※ 本研究に関し、開示すべき利益相反はありません。

【研究資金】
本研究は以下の研究費の支援を受けて行われました。
１）JSPS 科学研究費補助金　基盤研究（B)「概日リズム制御系の機能発生学」（代表：八木田和弘）
２）JSPS 科学研究費補助金　基盤研究（B)「哺乳類発生発達過程における概日時間秩序の生成機構」（代表：八木田和弘）
３）JSPS 科学研究費補助金　基盤研究（C)「哺乳類個体発生初期における体内時計抑制機構の解明」（代表：梅村康浩）
４）京都大学ウイルス再生医科学研究所共同研究（代表：八木田和弘、近藤玄）

＜研究に関すること＞	＜広報に関すること＞
統合生理学　教授　八木田和弘	事務局企画広報課　担当：土屋
電　話：075-251-5313	電　話：075-251-5804
E-mail：kyagita@koto.kpu-m.ac.jp	E-mail：kouhou@koto.kpu-m.ac.jp