

■受領No.1313

生活の乱れが誘発する疾患発症機構および 治療法開発への新規動体追跡技術の応用



代表研究者

浜田俊幸

国際医療福祉大学 薬学部 年齢軸生命機能解析学分野 准教授

1. 研究目的

情報処理や通信技術の発達是我々の生活を格段に便利にしてくれた一方で、高度情報化は世界中で昼夜を問わない時間の融合により24時間体制社会を作り出した。24時間社会は、24時間体制の交代勤務や深夜勤務などの生活環境の変化を生み、生活サイクルが多岐多様になった。ヒトは昼行性動物で、日中活動し夜間休息するという生活サイクルを持つ。ある程度長い期間、夜間休息の時間帯に睡眠を取らないあるいは取れない生活習慣を持つヒトの多くは、規則正しい昼行性の生活習慣を持つヒトに比べて、睡眠障害のみならず様々な疾患発症リスクが高いことが大きな社会問題となっている。その生活様式の変化により誘導される体内時計の乱れと様々な疾患の発症には密接な関係があることが明らかになってきた。体内時計の乱れは睡眠障害、癌（特に乳癌）、糖尿病、生活習慣病等の強力な危険因子として作用し様々な疾患に及び社会問題になっている。その発症機構は不明であり、その解明は急務である。体内時計の乱れは生体各組織のリズムを計測することで可能である。これまでの研究では、遺伝子発現を長期間連続計測するには、組織を培養して観察する方法しかなく、この方法では、疾患の発症や治療効果を個体レベルで検討することはできなかった。そこで私は上記問題を解決する動体追跡技術をもちいた自由行動する動物の遺伝子発現リズムを長期間連続測定する新しい方法を開発した(Hamada et

al., Nature comm, 2016)。

体内時計の乱れが誘起する疾患は、時差ぼけを含む睡眠障害・精神疾患・癌（特に乳癌、前立腺癌）・糖尿病を始めとする生活習慣病など発症するまでに長期を有する。そのためそれらの発症機構解明に迫るためには少なくとも数週間に及ぶ長い連続測定が必要である。本研究では、独自に開発した動体追跡技術を改良し、自由行動の生理学的条件下でマウスの各組織の遺伝子発現と行動（睡眠覚醒、飲水、摂食、自由行動）をリアルタイムで解析可能で体内時計の乱れにより誘発される様々な疾患の初期症状を検出するシステムを構築することを目的とする。

2. 研究概要

2.1 遺伝子発現定量と種々の行動解析をリアルタイムで関係するシステムの開発

現在、自由行動下マウスの嗅球辺りに取り付けられたシンチレータの3次元空間内の動き（直交座標の値）を基に、測定飼育ケージ内で1mm単位でマウスの各組織の3次元空間内での位置を解析している。シンチレータの直径1.5mmのものを頭に2mmのものを背中に取り付けることで全身の各組織の遺伝子発現が解析できる。それぞれのシンチレータの画像を軸にパターンマッチング技術をもちいて、マウスケージ内を自由に行動しているマウスのシンチレータの3次元座標(X,Y,Z)を計算し、その位置に基づいて発光量の3次元空間補正

を行い遺伝子発現量を計算しているが、今回、シンチレータの位置に基づいて計算されたマウスの嗅球部位を追跡し、特定場所に滞在する時間を解析することにより、摂食行動・飲水行動・睡眠・覚醒行動の3次元行動パターンを自動解析するアルゴリズムを開発し、既存の電気生理学的手法による脳波解析と比較する目的で同時計測を行った。動体追跡による解析は0.5秒毎に3次元空間の嗅球の位置をプロットしたプロット図とEM-CCDカメラで確認し、マウスの特定行動と嗅球の位置と滞在時間を考慮することで独自の解析システムを開発した。マウス嗅球部位の動きを0.5秒毎に解析し1日24時間の長さの解析を行った結果、マウスが測定ケージ内で、いつ・どこで・何をしているか自動解析できるようになった。電気生理学的手法はテレメトリーシステムをもちいて、マウスの頭蓋骨に脳波用電極を、マウス首の筋肉に筋電用電極をそれぞれ装着し、それらの電気信号情報はマウス腹腔内に移植された送信機により計測ケージ下に設置した受信機を介してコンピューターへ伝達し解析した。脳波解析は10秒を1エポックとして解析を行った。1日(24時間)を4時間毎に解析した結果、マウスの摂食行動・飲水行動・睡眠・覚醒行動リズムの夜高く、昼低い日内リズムが検出できた。光イメージング技術をもちいた動体追跡による睡眠・覚醒行動と電気生理学手法による睡眠・覚醒行動は1日を通して約90%の一致率だった。1個体マウスで光イメージングのみの技術で遺伝子発現と行動を同時計測することでリアルタイムに遺伝子発現から行動解析まで連動して解析が可能となった。体全体の様々な情報をリアルタイムで同時に包括的に解析できるシステムのプロトタイプの開発に成功した。

次に動体追跡技術により複数マウスの追跡をし、複数マウスの各組織の遺伝子発現を同時解析することを試みた。マウス間の解析が遺伝子レベルから行動解析まで可能となることが期待できる。こ

の複数マウスのコミュニケーション解析は、自閉症や鬱病などの治療法開発や脳機能解析に大きく貢献できると思われる。複数マウスの解析にあたり、シンチレータを装着せずにマウスの動体追跡ができることが理想であるため、本研究ではシンチレータ無しでマウスの各組織を追跡するシステムを構築することを行った。今回、時計遺伝子 *Period1* (*Per1*) プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子 (*luc*) を連結した *Per1-luc* マウス (図1) をもちいて嗅球に発現している *Per1* 遺伝子発現の発光を追跡するシステムを目指した。左右に耳に発現している *Per1* 遺伝子の発光の位置と嗅球の位置の関係から嗅球の3次元座標を計算し、*Per1* 遺伝子発現リズムを検出できた。今後、他の脳部位の遺伝子発現定量も行っていく予定である。

2.2 自由行動下マウスの生体深部の遺伝子発現変化計測センサーの作製

本研究では生体深部の長期間遺伝子発現変化を解析するシステムを構築することを行った。光ファイバー先端を特殊加工し、小型光電子増倍管に接続する携帯小型PMTシステムをもちいて肝臓および精巣における *Per1* 遺伝子発現を自由行動条件下、連続定量解析することに成功した。このセンサーは埋め込み処置は伴うが、組織を傷付けることもなく低侵襲性である。今後、肝臓・腎臓・精巣・腸、腎臓などの様々な末梢組織にセンサーを密着させ、自由行動下のマウスで生体深部の複数組織の遺伝子発現を長期間リアルタイムで同時計測することを行う。

以上、開発してきた動体追跡システムとセンサーによる計測を連係させて生体機能を解析していく予定である。これらの逐次計測システムの完成により、健康状態にある生理活動の基準化ができると考えている。

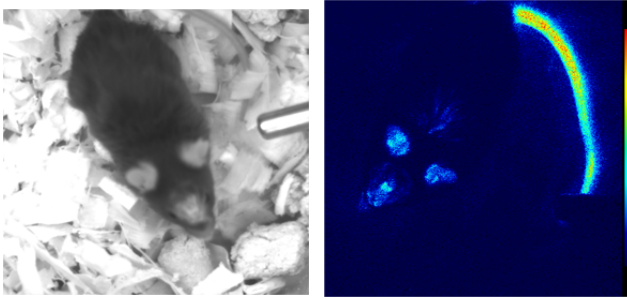


図 1. *Per1-luc* トランスジェニックマウスの明視野 (左) 及び暗視野 (右) での撮影例

時計遺伝子 *Per1* 発現部位が可視化できる (嗅球, 耳, 尾部位など)。今回はマウスにシンチレータを装着せず、マウスの遺伝子発現部位を追跡し、追跡部位の遺伝子発現を定量するシステムを開発した。

3. 発表

3.1 浜田俊幸

動物追跡技術をもちいて睡眠システムを解析する

日本睡眠学会 第22回「睡眠科学研究講座」札幌 2018年

3.2 浜田俊幸

生体複数部位の遺伝子発現を長期間追跡定量する新規光計測システム

第3回可視化マウス研究会 東京 2018年

3.3 浜田俊幸

iPRECIOをもちいた自由行動マウスの全身遺伝子発現の可視化と定量化

第40回日本神経科学大会 ランチョンセミナー 千葉 2017

3.4 尾崎倫孝、芳賀 早苗、小澤岳昌、森田直樹、浜田俊幸

「光技術を用いた臓器・細胞機能評価と制御」、*Organ Biology* 24 (2): 87-91、2017