気管概日リズムと時計遺伝子による制御

板 東 秀 樹^{1,2)}・西 尾 健 志¹⁾・久 育 男¹⁾

Circadian Rhythms in the Larynx and Trachea under the Control of the Molecular Clock

Hideki Bando, Takeshi Nishio and Yasuo Hisa

Some symptoms of laryngeal and tracheal diseases are associated with specific times of the day. For example, cough aggravation in the middle of the night is frequent complaint of patients with airway inflammation. We speculated that these symptoms were under the control of the circadian clock, and the clock genes in the airway epithelium played some important roles. The present study addresses the role of the circadian system in day-night changes of the respiratory functions in mice. In all airway tissues investigated (i.e. laryngeal, tracheal, bronchial, and lung), we observed clear rhythmic expression of the clock genes. Oscillations were abolished in arrhythmic *Cry 1/Cry 2* knock out mice and after lesioning of the master clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the wild-type. These findings indicate that respiratory cells contain a functional peripheral oscillator that is controlled by the SCN. Signals from SCN are mainly transmitted by the vagal nerve since performing a unilateral vagotomy completely abolished rhythms in *Per2* protein levels in the ipsilateral side of the submucosal glands, but not in the contralateral side. Furthermore, we found that the muscarinic acetylcholine receptor genes *Chrm2*, *Chrm3*, *Chrm4* are expressed in a circadian manner. Thus, laryngeal and tracheal clocks mediated circadian expression of muscarinic acetylcholine receptors and parasympathetic signaling between SCN and airways are essential pathways in conferring circadian time information to the larynx and the trachea. We consider that airway clocks could be the key in solving the nocturnal aggravation of respiratory symptoms.

Key words : 時計遺伝子, 概日リズム, 迷走神経, 喉頭疾患

は じ め に

様々な疾患の症状発現には昼夜差があり、臨床上問題となることが多い。特に気道領域では気管支喘息では早朝の発作が多く、これをいかに制御するかが治療上の一つの鍵となっている。耳鼻咽喉科領域ではSmolenskyら¹⁾がアレルギー性鼻炎の症状発現には有意な昼夜差が存在することを報告している。喉頭、気管疾患においても、咳喘息、喉頭炎などの患者が夜間に咳嗽の増悪を訴えることはよく経験されることである。このような症状の昼夜差は単なる睡眠覚醒によって引き起こされるのではなく、体内の自律的リズムすなわち概日リズム（サーカディアンリズム）が関与していることが明らかにされつつある。地球上のほとんどの生物は一日の明暗変化に適応するため、約24時間周期で自律的に振動する体内時計を備えている。このリズムは外部と遮断された環境下においても自律的に振動を続けるが、太陽光などの環境因子によって地球の自転周期と同調させることで正確な24時間周期を刻んでいる。この24時間リズムの形成には時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群が関わっていることが明らかとなった。1971年Konopkaと

Benzar²⁾はショウジョウバエの概日リズム変異株を発見し、Periodと命名し、1984年にはYoungら³⁾はPeriod遺伝子のクローニングに成功している。また1970年代に哺乳類の時計中枢が視床下部の視交叉上核に存在することが明らかとなった⁴⁾。さらに1997年にKingら⁵⁾は哺乳類時計遺伝子Clockを発見し、また同年に程らを含む複数のチームが独立した仕事としてPeriodの哺乳類相同遺伝子(*Per1*)をクローニングすることに成功している⁶⁾。その後、哺乳類を含めた生物時計研究は加速的に発展し現在に至っている。

これまでに解明された生物時計の発振機構は、ショウジョウバエとヒトを含む哺乳類で大きな相違はなく、複数の時計遺伝子がリミットサイクル振動を作り出すことで生み出される。哺乳類時計遺伝子は*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* (抑制因子), *Clock*, *Bmal1* (促進因子) などが知られている⁷⁾。振動分子と考えられている*Per1*, *Per2*が転写されタンパクが合成されると、核内に移行し、*Cry*など他の抑制因子と共に*Bmal1*, *Clock*など転写促進因子がE-boxに結合し自らの転写を活性化するのを妨げる。このサイクルに要する時間差によって24時間リズム

1) 京都府立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

2) 京都第二赤十字病院耳鼻咽喉科

1) Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

2) Department of Otolaryngology, Kyoto Second Red-Cross Hospital

図1 哺乳類時計遺伝子発現リズム形成のメカニズム

が形成されるとされる(図1)。視交叉上核で生み出された時間情報は神経経路、液性因子を介した経路によって脳の各部位さらには末梢に伝達され、全身の細胞に発現している時計遺伝子発現を調律することで全身の細胞の24時間リズムが保たれている。

これまで気道疾患の概日リズム研究として、気管支喘息の日内変動のメカニズムについておもに臨床的な研究がなされてきており、Barnesら^{8,9)}は血中コルチゾル濃度の日内変動などが気道狭窄の概日リズムを形成していると報告している。しかし、その一方で副交感神経活動が夜間に亢進することも要因の一つと示唆されていたがそれを裏付ける基礎研究はこれまで報告されていない。

これまでに我々は喉頭・気管を含む気道に時計遺伝子が発現し、中枢である視交叉上核より迷走神経を介した支配を受けていること、さらに気道時計遺伝子がムスカリン性アセチルコリン受容体の転写制御を行うことで、副交感神経を介した気道分泌や気道収縮の日内変動を引き起こしている可能性があることを明らかにし報告してきた¹⁰⁻¹²⁾。本稿では、喉頭気管における概日リズム形成のメカニズムについて我々のこれまでの研究成果を中心に述べる。

対象と方法

(1) 動物

7-10週齢のC57Bl/6マウス、リズムを持たない *Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-}マウス¹³⁾を2週間12時間周期の明暗条件におき、その後2日間恒常暗条件で飼育した後に組織の採取を行った。

(2) 片側迷走神経切断、片側および両側交感神経幹切断

ケタミン、キシラジン混合麻酔下に行った。迷走神経は右頸静脈孔直下のレベルで切断した。交感神経幹は右もしくは両側の上頸神経節のレベルで神経節を含めて切断した。術後4日間明暗条件下に飼育し、灌流固定の上組織を摘出した。

(3) 視交叉上核除去

ケタミン、キシラジン混合麻酔下に頭頂部より電極を挿入し、視交叉上核に15mAの電流を15秒間通電した。術後マウスの行動リズムをモニターし、行動リズムの消失を確認できた個体のみを実験に供した。

(4) 免疫組織化学法

マウスを深麻酔下に冷却生理食塩水、4%ホルムアルデヒドで経心的に灌流固定し、喉頭、気管、気管支、肺を摘出した。4℃にて4%パラホルムアルデヒドで12時間固定した後、パラフィン包埋を行い、マイクロトームを用いて5μm厚に薄切し切片を作成した。一次抗体はrabbit anti-*Per2* antiserum, rabbit anti-*Per1* antiserumを、二次抗体はCy3-conjugated anti-rabbit IgG, FITC-conjugated anti-goat IgG (1:500)を用いた。また迷走神経切断後のCT4およびCT16において喉頭、気管上皮および粘膜下腺の*Per2*陽性細胞数の比率を統計学的に検討した。

(5) mRNA発現定量

(a) Northern blotting

深麻酔下に頸椎脱臼を行った後、開胸し気管、肺を摘出した。摘出した組織をホモジェナイズしtotal RNAを採取し、実験に用いた。プローブにはRT-PCRより得た³²P-標識probeを用いた(*Per2*, *Per1*, *Dbp*, *Chrm1*, *Chrm2*, *Chrm3*, *Chrm4*, controlとして*G3pdh*)。

(b) Real-Time PCR

ムスカリン性アセチルコリン受容体mRNAの定量をreal-time PCRを用いて行った。Oligonucleotide primerおよびTaqman probeとしてTaqman Gene Expression Assays (*Chrm1*, *Chrm2*, *Chrm3*, *Chrm4* ABI)を使用した。*Chrm1-4*のサンプルはGapdh (TaqMan rodent GAPDH control reagent ABI)を同時に反応させて定量化した。各点のmRNA発現量の変動をFisher's least protected testおよびone-way ANOVAを用いて検討した。

結果と考察

1. 喉頭・気管時計遺伝子の発現パターン

*wild type*および*Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-}マウスにおける喉頭・気管・肺など気道上皮の時計遺伝子mRNA発現を検討した。4時間ごとにサンプルを採取し、Northern blotting法で比較したところ*Per1*, *Per2*はCT12からCT16にピーク、CT0からCT4にトラフとなる明らかな日内変動を認めた。対照的に*Bmal1*および*Clock*はCT20からCT24(0)にかけてピークとなり、CT8からCT12にかけてトラフを認めた(図2A)。このリズムは*Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-}マウスでは完全に消失した。

この時計遺伝子発現の詳細な分布を調べるために*Per2*免疫組織化学法による検討を行った。喉頭、気管における*Per2*発現を調べたところ、CT16およびCT20では線毛上皮、粘膜下腺の導管および腺房細胞の核に強い発現を認

文献10より改変

図 2-1

- A 気道時計遺伝子 mRNA 発現の日内変動 (Northern blotting) CT0-12 は主観的昼, CT12-24 は主観的夜.
 B 喉頭・気管における *Per2* タンパク発現: 粘膜下腺, 線毛上皮などの細胞核に夜間強く発現する.

文献10より改変

図 2-2

- C 視交叉上核破壊マウスでは *Per2* の mRNA (1), タンパク (2) とともに発現リズムが消失する.
 D 気道における *Dbp* 発現の昼夜差. *Cry* 欠損マウスではリズムが消失する.

めた。一方、CT0, CT4, CT8では発現はほとんど認めず、明らかな昼夜差があった(図1B)。Per1についても検討したところ同様の結果であった。末梢気道においてはCT16の気管支上皮、肺胞上皮細胞の核にPer2発現を認めたがCT4ではいずれにも発現は見られなかった。mRNA発現のピークと蛋白発現のピークには4-8時間のずれがありこれはこれまで報告されている他の末梢臓器での結果と同様であった。Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}マウスではこのリズムは消失しており、CT4, CT16ともに発現は低いことがわかった。これらの結果より喉頭から肺に至るすべての気道上皮において時計遺伝子のリズム的な発現が存在することが判明した。

さらに我々は気道においても末梢時計機構が機能し、Eboxを介した転写制御が行われていることを証明するため、マウスにおいて転写開始部位上流のEboxへのBmal1/Clock複合体結合による直接制御が証明され¹⁴⁾、強力な日内変動を呈することが知られているDbp (albumin D-element binding protein)の気道における日内変動をNorthern blottingを用いて調べた。DbpはbZIP型転写因子であり、肝臓における代謝に関与しているとされているが、今回の実験結果で気道Dbpは肝臓などと同様に強い日内変動を有しており、さらにこのリズムはCry1^{-/-} Cry2^{-/-}マウスにおいて消失することから、喉頭・気管においてもEboxを介したリズム発振機構が機能していることが示唆された。一

方同様に転写開始部位上流にEboxを有するbZIP型転写因子であるC/EBPβについて日内変動の有無を検証したが、こちらは有意な日内変動は確認できなかった。

2. 喉頭・気管時計遺伝子発現と中枢からの制御

次に我々は、喉頭・気管時計遺伝子の発現と時計中枢である視交叉上核との関連について検討を行った。視交叉上核を除去したマウスにおけるPer2の発現をNorthern blottingおよび免疫組織化学法を用いて検討したところ、いずれもPer2の発現リズムは消失しており、喉頭・気管上皮におけるPer2の発現は視交叉上核の支配下にあることが証明された(図2C)。Schiblerらは線維芽細胞を用いた培養実験より、血中のコルチゾルの日内変動が末梢臓器における概日リズム形成を制御しているとの報告を行っているが¹⁵⁾、一方で肝臓の時計遺伝子発現は交感神経を介して中枢からの支配を受けていることが報告されており¹⁶⁾、また副腎におけるコルチゾル分泌リズムが交感神経を介した光刺激の伝達により制御されている¹⁷⁾など、自律神経系は時間情報伝達の重要な経路であるとされる。そこで我々は喉頭・気管時計遺伝子発現の中枢から自律神経を介して支配を受けていることを証明するために、喉頭・気管のPer2の発現を自律神経切断モデルマウスで免疫組織化学法にて検討した。交感神経幹を切断したマウスではPer2発現の昼夜差はSham operationを行ったマウスと同様にCT16で発現が強く、CT4ではほとんど発現が認め

文献10より改変

図3

- A ムスカリン性アセチルコリン受容体発現の日内変動 (real-time PCR): Chrm2, 3, 4 にリズムがみられる。
 B Chrm2発現のリズム (Northern blotting) Wild Typeでは発現リズムがみられたがCry欠損マウスではリズムが消失、時計遺伝子による発現制御を受けていると考えられる。

られなかったが、片側迷走神経を切断したマウスではCT16で切断側の*Per2*が粘膜下腺においてほとんど発現していなかった。また線毛上皮での発現も非切断側と比較すると減少していた。すなわち切断側ではCT4, CT16ともに視交叉上核を除去したマウスと類似した結果を示した。これらの結果より気道上皮における時計遺伝子の発現は視交叉上核より迷走神経を介して支配を受けていることが判明した。

3. 気道時計遺伝子の役割

喉頭・気管を含む気道における末梢時計が分泌などの生理機能にいかに関与しているかを証明するために、時計遺伝子の下流にある遺伝子を同定することを計画した。我々は副交感神経系に日内変動が存在する可能性が高いと考えたため、副交感神経受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体に着目した。ムスカリン性アセチルコリン受容体は気道の収縮、分泌などに大きく関与しており、気道では*Chrm1*, *2*, *3*, *4*が発現していることが知られている。そこで、*Chrm1-4*のmRNAの定量をreal-time PCRを用いて行った。*Chrm1*発現は日内変動を認めなかったが、*Chrm2*, *Chrm3*, *Chrm4*はいずれも夜間にピークを持つ日内変動が統計学的解析より証明された(図3A)。*Chrm2*についてはNorthern blotでも確認したところ同様の結果を得ることができた。またこれらのリズムはCry欠損マウスでは認められなかった(図3B)。この結果より気道末梢時計がムスカリン性アセチルコリン受容体を介して副交感神経系のリズムを形成していることが示唆された。

結 論

我々の研究成果より、喉頭・気管においてムスカリン性アセチルコリン受容体の発現が日内変動を示しこのリズムが末梢時計遺伝子により制御されていること、さらに喉頭・気管末梢時計の発現は迷走神経を介して視交叉上核の支配下にあることが解明された。すなわち視交叉上核における時間情報が迷走神経を介して喉頭・気管に伝達され、末梢時計遺伝子の24時間リズムを形成、さらにムスカリン受容体などの遺伝子発現の昼夜差を形成することで腺分泌や気道の収縮などにリズムをもたらしている可能性があると考えられる(図4)。このように喉頭・気管疾患の夜間症状増悪の原因として、体内時計によってもたらされる夜間副交感神経活動の亢進が関与しているといえるが、本来概日リズムは生理的に働くべき機能であり、夜間睡眠をとるヒトにとっては夜間の副交感神経優位な状態は好都合なはずである。しかし、そこに炎症、不規則な生活、ストレスなど種々の要因が加わり過度に増長されることで、咳嗽、喀痰などの症状の夜間増悪を引き起こしているのではないかと考えている。

今 後 の 展 望

体内時計中枢である視交叉上核における時計遺伝子発現の24時間リズム形成のメカニズムが解明されつつある現

図4 喉頭・気管概日リズム機構の仮説：視交叉上核から迷走神経を介したシグナル伝達により喉頭気管粘膜における時計遺伝子が振動し、ムスカリン受容体発現を制御、腺分泌、気道収縮にリズムをもたらす。

在、実際の疾患における症状発現の昼夜差に対する研究に焦点が当てられつつある。

これまでの研究によって、喉頭・気管分泌における体内時計の関与が明らかとなったが、例えば咳嗽などの疾患における咳嗽など症状の昼夜差が起きるメカニズムの解明には単に気道上皮における概日リズムだけではなく、液性因子例えば血中ノルアドレナリンの低下など様々な要因が関与している可能性があり、今回の動物を用いた実験の結果を臨床に応用するためにはさらなる研究が必要である。我々は今後、様々な生理現象、遺伝子発現の日内変動を解析し、積み重ねることで喉頭・気管疾患の夜間増悪に対する治療戦略を立てる上での基礎データを構築できるのではないかと考えている。

現在我々は喉頭・気管分泌、気道粘膜の腫脹の日内変動をさらに詳細に分析するために水チャンネル、アクアポリンの発現の日内変動を調査している。これまでに喉頭におけるアクアポリン2,5のタンパク発現の昼夜差を示すデータを得ており、解析中である。

今後さらにDNAマイクロアレイなどを用いて喉頭・気管における遺伝子発現の日内変動を網羅的に解析し、実際の疾患治療に結びつくターゲットとなる分子を見つけ出すことで、治療に役立てたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Smolensky MH, Lemmer B, Reinberg AE : Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma. Adv Drug Deliv Rev 59 : 852-882, 2007.
- 2) Konopka R, Benzer S : Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 68 : 2112-2116, 1971.

- 3) Bargiello TA, Jackson FR, Young MW : Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312 : 752-754, 1984.
- 4) Moore RY, Eichler VB : Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesion in the rat. *Brain Res* 42 : 201, 1972.
- 5) King DP, Zhao Y, Sangoram AM et al : Potential cloning of the mouse circadian Clock gene. *Cell* 81 : 641-653, 1997.
- 6) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y et al : Circadian Oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389 : 512-516, 1997.
- 7) Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K : Molecular machinery of the circadian clocks in mammals. *Cell Tissue Res* 309 : 47-56, 2002.
- 8) Barnes PJ : Circadian variation in airway function. *Am J Med* 79 : 5-9, 1985.
- 9) Barnes PJ : Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Science* 52 : 521-527, 1993.
- 10) Bando H, Nishio T, van der Horst GT et al : Vagal regulation of respiratory clocks in mice. *J Neurosci* 27 : 4359-4365, 2007.
- 11) Nishio T, Bando H, Bamba H et al : Clock gene expression in murine larynx. *Auris Nasus Larynx* 35 : 539-544, 2008.
- 12) 久 育男, 板東秀樹, 西尾健志ほか : 気道時計遺伝子発現と迷走神経による制御. *耳鼻咽喉科展望* 51 : 278-285, 2008.
- 13) van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K et al : Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398 : 627-630, 1999.
- 14) Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L et al : Role of Dbp in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* 20 : 4773-4781, 2000.
- 15) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U : A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93 : 92, 1998.
- 16) Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S et al : Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 6795-6800, 2003.
- 17) Ishida A, Mutoh T, Ueyama T et al : Light activates the adrenal gland : Timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2 : 297-307, 2005.

別刷請求先 〒 602-8566 京都市上京区河原町通広小路
 上る梶井町 465
 京都府立医科大学
 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室 板東秀樹