



Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release

石田, 敦士

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2007-06-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2952

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002952>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 石田 敦士
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博ろ第 2014 号
学位授与の要 件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の日 付 平成 19 年 6 月 13 日

【 学位論文題目 】

Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release (光は副腎を活性化する：遺伝子発現と糖質コルチコイド分泌のタイミング)

審 査 委 員

主 査 教 授 清野 進
教 授 春日 雅人
教 授 久野 高義

【はじめに】

光は約一日周期のサークルディアンリズムを環境の明暗周期に同調させる因子としては、最も強力なものとして知られている。近年、高照度の光照射が躁うつ病に伴う睡眠リズム異常に効果があることが知られているが、そのメカニズムについてはまだ十分解明されていない。

この研究では、光が副腎で視交叉上核(SCN)-交感神経系を介して遺伝子発現を引き起こすことを明らかにした。また、この遺伝子発現は、視床下部-下垂体軸を介さずに血漿中と脳脊髄液中のコルチコステロンレベルの上昇をもたらすことを明らかにした。光による副腎における遺伝子発現、およびコルチコステロン分泌がSCN破壊により誘導されなくなること、またその反応性に昼夜差があることは、この現象が直接に生物学的時計のサイクルにリンクされていることを示している。またこのコルチコステロンの分泌誘導が光の強度に応じて増強するということも明らかにした。光によって誘導されるコルチコステロンの分泌は、サークルディアンリズムと密接に結びついており、それが細胞内の代謝を周りの環境に同調させるメカニズムである可能性を示唆した。

【材料および方法】

C57BL/6JマウスおよびPer1遺伝子のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだPer1-lucマウスを使用した。動物を12時間/12時間の明期(蛍光灯、300ルクス)/暗期周期で同調後、恒暗室飼育下で実験を行った。光照射は白色光(400ルクス)を30分間露光した。血漿ホルモン測定(コルチコステロンとACTH)、DNAマイクロアレイ分析、ノーザンプロット、ウェスタンプロット、In situ hybridization、二次元フォトン装置によるマクロイメージング、電気生理学実験を行った。

【結果】

① 光で誘発された遺伝子発現は副腎特異的に起こる

光照射する前はわずかなPer1-lucルシフェラーゼ発光が副腎にみられ、他の腹部臓器ではほとんど発光はみられなかったが、光照射により副腎において発光の増大が確認された。これは、露光量の30分後に既に確認されて、60-120分以降、最大限度のレベルに達した。しかし肝臓か腎臓ではこのような現象はまったく起こらなかった。

② 光は副腎のさまざまな遺伝子発現の変化を引き起こす

光の副腎における遺伝子発現レベルでの影響を調べるために、DNAマイクロアレイを行った。その結果156の遺伝子発現を1.4倍以上の変化で増大させ、また39の遺伝子発現を減少させた。それらの中にはCrem、Cebpb、E4bp4、およびPer1などの転写調節因子、さらにNr4a1、Nr4a2、およびNr5a1などのCYP21

や、CYP11A1や、CYP11B2などステロイド合成のための主要な酵素の転写を制御する因子も含まれていた。ノーザンプロット法にて、これらの遺伝子変化を確認した。次に副腎における時計遺伝子発現変化が副腎のどの層でおこるかを調べるため、In situ hybridizationを行ったところ、皮質での変動であり、髓質ではこれらの変化は起きないことを確認した。

③ 光は遺伝子発現に続きコルチコステロン分泌も誘導する

光の副腎皮質遺伝子の変動が機能レベルでの変動をもたらすのかを検討するため、コルチコステロンの血漿中濃度を検討した。光照射後30分間は変化は無いが、光刺激後60-120分で著明に増加し、180分で元のレベルにもどることを確認した。非常に興味深いことに光パルスの後に、ACTHの変化は無かった。この現象と通常のストレスによる変動とを比較するため、強制水泳時の変化と比較した。強制水泳では、ACTH、コルチコステロンとともに、直後(2-5分)に最大のレベルにまで増加した。この結果より、ストレスではコルチコステロンはACTHを介して短時間で分泌されるが、光はACTHを介さずに、時間的に遅れて分泌されてくることが示唆された。

④ 光の副腎への影響は、視交叉上核(SCN)を介して、交感神経を介して起こる

SCN破壊マウスに光を照射したところ、コルチコステロン誘導や副腎における遺伝子変動は起こらなかったことより、この現象にはSCNが深く関与することが想定される。また、光の副腎における遺伝子発現やコルチコステロン誘導は、主観的明期には起こりにくいことも明らかにした。

では、SCNと副腎を繋ぐものは何であろうか。興味深いことに、光照射に伴う副腎の交感神経活動は昼夜差を示した。さらに副腎へ入る交感神経を切除すると、切除側の副腎では、光による遺伝子誘導は起こらないことも明らかにした。これらの結果は光の副腎に与える影響は、視交叉上核を介した交感神経活動に由来することを強く示唆するものである。

⑤ p44/42 MAPKは光による副腎での遺伝子発現に関与する

光は副腎におけるERK1/2のリン酸化を増加させたが、p38 MAPKのリン酸化レベルを変化させなかった。またCREBのリン酸化レベルも変化させなかった。副腎髓質のカテコールアミンが皮質のステロイド合成を増加させるのを示すことがすでに報告されている。われわれは光がアドレナリンの血漿濃度を増加させることを明らかにし、またアドレナリン処理(2mg/kg, s. c.)が副腎のPer1-luc発光と血漿コルチコステロンを劇的に増加させることを明らかにした。これらの結果は光で誘発されたステロイド合成に髓質-皮質間の相互作用がかかわっていることを示唆する。

⑥ 光の強さに依存してコルチコステロンの分泌が上昇する

血漿中コルチコステロンレベルは照射量に比例して増大し、40ルクスで最大限度のレベルに達した。40ルクスの露光量は夜行動物における様々な生生理

学的変化を引き起こすのに十分な強さであるということが文献上示されており、興味深い。

⑦ 光は脳脊髄液中のコルチコステロンの濃度も上昇させた

マイクロダイアリシス法を用いて、脳脊髄液中のコルチコステロンの量を測定したところ、光により有意にその濃度が上昇した。グルココルチコイドの中核への作用を考えると興味深い。

【考察】

この研究は、光刺激が、視交叉上核を介し、中枢の交感神経系のルートを通り、脊髄中間質外側核から副腎への交感神経を経て副腎皮質の遺伝子転写を変化させ、副腎皮質ステロイドの分泌を増加させることを示したものである。光により増大した糖質コルチコイドは骨、肝臓、心臓、肺、脳、腎臓、造血組織など全身の組織にある糖質コルチコイド受容体を介して、さまざまな作用を行うことが想定される。これは、うつ病やリズム異常の治療で用いられる高照度光照射によるリズム疾患の治療メカニズムの一端を明らかにした研究と言える。

神戸大学大学院医学系研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2016号	氏名	石田 敏士
論文題目 Title of Dissertation	Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release 光は副腎を活性化する:遺伝子発現と糖質コルチコイド分泌のタイミング		
審査委員 Examiner	主査 清野進 Chief Examiner 副査 齋藤紀人 Vice-examiner 副査 久野高義 Vice-examiner		
審査終了日	平成19年5月16日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【緒言】

光は約一日周期のサークルリズムを環境の明暗周期に同調させる因子としては、最も強力なものとして知られている。近年、高照度の光照射が躁うつ病に伴う睡眠リズム異常に効果があることが知られているが、そのメカニズムについてはまだ十分解明されていない。本研究では、光の副腎に対する効果について検討した。光刺激は、視床下部-下垂体軸を介さずに血漿中と脳脊髄液中のコルチコステロンレベルの上昇をもたらすことを示した。光による副腎での遺伝子発現やコルチコステロン分泌がSCN破壊により誘導されなくなること、またその反応性に昼夜差があることは、光刺激により惹起される副腎での現象が生物学的時計のサイクルと密接にリンクしていることを示している。

【方法】

C57BL/6JマウスならびにPer1遺伝子のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだPer1-lucマウスを使用した。動物を12時間/12時間の明期(蛍光灯、300ルクス)/暗期周期で同調後、恒暗室飼育下で実験を行った。光照射は白色光(400ルクス)を30分間露光した。血漿ホルモン測定(コルチコステロンとACTH)、DNAマイクロアレイ分析、ノーザンプロット、ウェスタンプロット、In situ hybridization、二次元フォトン装置によるマクロイメージング、電気生理学実験を行った。

【結果と考察】、光照射する前はわずかな Per1-luc ルシフェラーゼ発光が副腎にみられ、他の腹部臓器ではほとんど発光はみられなかったが、光照射により副腎において発光の増大が認められた。副腎における発光は、これは、露光量の 30 分後に既に認められ、60-120 分以降、最大限度のレベルに達した。しかし、肝臓か腎臓ではこのような現象は全く起らなかった。次に光の副腎における遺伝子発現レベルでの影響を調べるために、DNA マイクロアレイを行った。その結果 156 の遺伝子発現を 1.4 倍以上の変化で増大させ、また 39 の遺伝子発現を減少させた。それらの中には Crem および Per1 などの転写調節因子、また Nr4a1 などステロイド合成のための主要な酵素の転写を制御する因子も含まれていた。ノーザンプロット法にて、これらの遺伝子変化を確認した。次に副腎における時計遺伝子発現変化が副腎のどの層でおこるかを調べるために、in situ hybridization を行ったところ、皮質での変動であり、髓質ではこれらの変化は認められなかった。

光の副腎皮質遺伝子の変動が機能レベルでどのような変動をもたらすのかを検討するため、コルチコステロンの血漿中濃度を検討した。光照射後30分間は変化は無いが、光刺激後60-120分で著明に増加し、180分で元のレベルに復することが認められた。非常に興味深いことに光パルス後、血中ACTHの変化は認められなかった。この現象と通常のストレスによる変動とを比較するため、強制水泳時の変化と比較した。強制水泳では、ACTH、コルチコステロンとともに、直後(2-5分)に最大のレベルにまで増加した。この結果より、ストレスではコルチコステロンはACTHを介して短時間で分泌されるが、光はACTHを介さずに、時間的に遅れて分泌されてくることが示唆された。SCN破壊マウスに光を照射したところ、コルチコステロン誘導や副腎における遺伝子変動が認められなかったことより、この現象にはSCNが深く関与することが想定された。また、光の副腎における遺伝子発現や

コルチコステロン誘導は、主観的明期には起こりにくいことも判明した。

さらに、光照射に伴う副腎の交感神経活動は昼夜差を示した。非常に重要なことは、副腎へ入る交感神経を切除すると、切除側の副腎では、光による遺伝子誘導は惹起されなかった。これらの結果は光の副腎に与える影響は、視交叉上核を介した交感神経活動に由来することを強く示唆する。また、光は副腎におけるERKのリン酸化を増加させたが、p38 MAPKのリン酸化レベル、CREBのリン酸化レベルを変化させなかった。副腎皮質のカテコールアミンが皮質のステロイド合成を増加させるのを示すことがすでに報告されている。今回、光刺激がアドレナリンの血漿濃度を増加させることができ明らかにされたことと、またアドレナリン処理(2mg/kg, s.c.)が副腎のPer1-luc発光と血漿コルチコステロンを劇的に増加させることができ明らかにされたことにより、光で誘発されたステロイド合成には髓質-皮質間の相互作用が関与していることが示唆された。

また、血漿中コルチコステロンレベルは照射量に比例して増大し、40ルクスで最大限度のレベルに達した。この結果は、40ルクスの露光量は夜行動物における様々な生理学的变化を引き起こすのに十分な強さであるという報告と併せて考えると興味深い。

【結論】

光刺激が視交叉上核を介して中枢の交感神経系のルートを介し、脊髄中間質外側核から副腎への交感神経を経て副腎皮質の遺伝子転写を変化させ、副腎皮質ステロイドの分泌を増加させることができ明らかとなった。

本研究は、光の副腎に対する効果について、遺伝子発現変化と糖質コルチコイド分泌の点から研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった、視交叉上核から交感神経を介した糖質コルチコイドの分泌について重要な見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。

This candidate, having completed studies on "Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release", with a specialty in biological clock, and having advanced the field of knowledge in the area of the relationship between clock genes and functions of adrenal gland, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D. (Medicine).