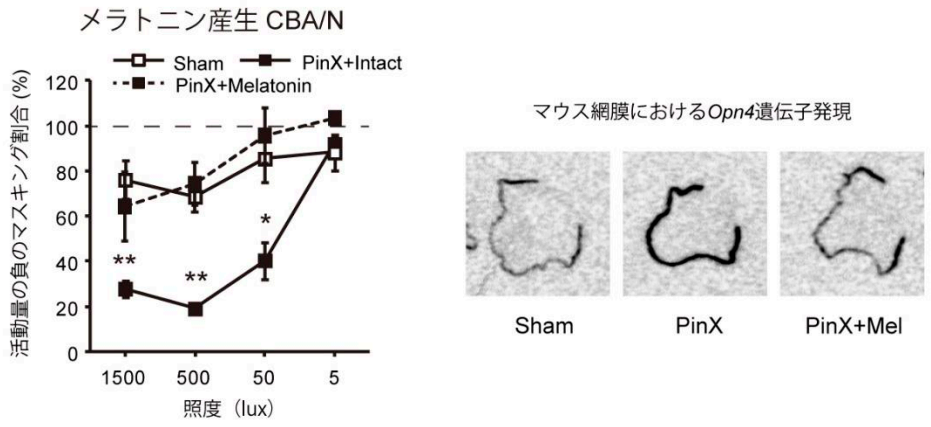
122　松果体メラトニンによる網膜の光感受性抑制機構の解明	池上　啓介

【目的】生物の多くの生理現象は約 24 時間周期の概日リズムを持っている。哺乳類では環境光は眼球の網膜で受容され、脳視床下部の体内時計中枢である視交叉上核に伝達され、時計をリセットさせる。松果体のメラトニンもこの経路で合成分泌を制御され、ヒトでは睡眠ホルモンとして働く。日本人の 10 人に 4 人が何らかの不眠や睡眠障害を抱えていると言われ、睡眠障害のうち、非 24 時間睡眠覚醒症候群は、通入眠と覚醒の時刻が毎日 1〜2 時間ずつ遅れ、睡眠覚醒リズムが 24 時間よりも長い周期を示す。原因として光感受性の低下が挙げられているが、その因果関係やメカニズムもわかっていない。我々のこれまでの研究で松果体を除去により光感受性が増加することが判明し、松果体メラトニンが光同調における光感受性に関与しているのではないかと考えられた。そこで、本研究では松果体メラトニンによる光感受性制御機構の解明を目的とした。

【方法】4〜5 週齢雄のメラトニン産生 CBA/N マウスおよびメラトニン欠損 C57BL/6 マウスの松果体を除去（PinX）後、16 時間明期 8 時間暗期の明暗環境下で、暗期に 1 時間光照射し、活動量の抑制（マスキング）効果を解析した。メラトニン投与によるマスキングの抑制効果を検証した。メラトニンが作用する部位を検証するため、網膜変性 rd/rdCBA/J マウスを用いてマスキング効果を解析した。次に青色と緑色の LED を用いて PinX マウスによるマスキング効果を検証し、網膜内層の青色吸収する光受容体 Opn4 の関与を確認した。さらに PinX およびメラトニン投与による Opn4 発現への影響を *in situ* hybridization 法およにウェスタンブロット法により検証した。最後に夜間薄明環境下（12 時間明期 400 lux、12 時間暗期 5 lux：12L12dL）で非 24 時間型睡眠障害様行動を示すマウスにおいて、メラトニン受容体アンタゴニストの慢性投与による改善効果を検証した。

【結果】CBA/N マウスにおいて、PinX によって増幅されていたマスキング効果は、メラトニン投与により低下した。C57BL/6 マウスでは PinX による影響はなく、メラトニンに光感受性が抑制されることが示唆された。網膜変性マウスでも PinX によってマスキング効果が増幅し、メラトニン投与により回復した。さらに青色光にのみ PinX によるマスキング効果増幅を示した。これらの発見は、メラトニンが網膜内層の MT1 に作用して Opn4 発現細胞の光感受性を抑制している可能性を示唆している。そこで、網膜 *Opn4* 発現を解析したところ、PinX により発現量が増加しメラトニンにより抑制された。タンパク質レベルでも同様の結果であったことから、メラトニンが Opn4 の発現量を抑制することを示唆した。しかし、MT1 アンタゴニスト慢性投与では非 24 時間睡眠覚醒症候群様行動を回復させる効果が得られず、今後濃度検討や遺伝子改変によるさらなる検討が必要である。

松果体除去とメラトニン投与によるマスキング効果と網膜の *Opn4* 発現への影響



122. 松果体メラトニンによる網膜の光感受性抑制機構の解明

池上　啓介

愛知医科大学 医学部 生理学講座

Key words：松果体，メラトニン，網膜，Opn4，光感受性

緒　言

生物の多くの生理現象は約 24 時間周期の概日リズムを持っている。体内時計の主な同調因子で一番強力なのが光であり、環境光は眼球の網膜で受容され、脳視床下部に位置する体内時計の中枢である視交叉上核に伝達され、時計遺伝子の発現をリセットさせる。このようにして睡眠覚醒などの概日リズムは明暗環境に同調できる。松果体のメラトニンもこの経路で合成分泌を制御され、ヒトでは睡眠ホルモンとして働く。睡眠障害のうち、非 24 時間睡眠覚醒症候群は、通常の 24 時間周期の環境にも関わらず、入眠と覚醒の時刻が毎日 1～2 時間ずつ遅れ、睡眠覚醒リズムが 24 時間よりも長い周期を示す。視覚障害のない人にも多く見られることから、何らかの原因で生物時計の同調機構が正常に機能せず、内因性のリズムが表に現れ、フリーランしてしまうと考えられる［1］。原因として光感受性の低下が挙げられているが、その因果関係やメカニズムもわかっていない。

我々は夜間薄明環境下での飼育による非 24 時間型睡眠障害モデルプトロコールを世界で初めて確立した（Ikegami et al., unpublished data）。松果体で合成される睡眠ホルモンメラトニンを産生する CBA/N マウスは夜間薄明環境下で 24 時間に同調できずヒトの非 24 時間睡眠覚醒症候群のように長周期を示す一方、メラトニンが欠損した C57BL/6 マウスは 24 時間に同調できる。さらに CBA/N マウスの松果体を外科的手術で除去（PinX）したところ 24 時間に同調できるようになり、メラトニンが光同調における光感受性に関与しているのではないかと考えられた。実際、光により活動量が抑制される特性をマスキング試験［2］では、PinX CBA マウスでマスキング効果が増加する（Ikegami et al., unpublished data）。

そこで、本研究ではメラトニンが光感受性を低下させる効果があるかを薬理学的に検証し、網膜内層およびそこに発現する光受容体 Opn4［3，4］発現への影響を組織学および生化学的手法により検証した。さらにメラトニン受容体 MT1 アンタゴニストによるマウスの非 24 時間睡眠覚醒症候群様行動の改善効果を検証したので報告する。

方法および結果

1.　メラトニンによる光感受性制御効果

まず、4～5 週齢の雄 CBA/N マウスを購入し、全身麻酔下で松果体を除去した（PinX）。その後、遮蔽箱で 3 週間 16 時間明期 8 時間暗期の明暗環境（23±1℃）で飼育し、暗期開始 1 時間後から 1 時間異なる照度の光（1500、500、50、5 lux）を照射し、マスキングを解析した（図 1A）。その際に、メラトニンを暗期開始前 2 時間に腹腔内投与し、マスキングの抑制効果を検証することで、メラトニンによる光感受性の抑制効果を検索した。その結果、PinX によって増幅されていたマスキング効果は、メラトニン投与により偽手術（Sham）群と同じレベルまで有意に低下した（$P<0.001$、Two-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test）（図 1B）。C57BL/6J マウスでは PinX による影響はなかった（図 1C）。これらの結果から、PinX により光感受性が増加し、メラトニンによる抑制効果で回復することが判明した。

2.　メラトニンの網膜への作用機序

メラトニン受容体 MT1 が網膜神経節細胞（RGC）層に発現していることはわかっている。一方、Opn4 は 1 日の明暗周期に活動リズムが同調する上で重要で、マスキング効果にも関与し［5］、MT1 は Opn4 と共局在している。

そこで網膜内層における PinX とメラトニン投与の影響を検証するため、視細胞層が変性した rd/rdCBA/J マウスを用いてマスキング効果を解析した。その結果、PinX によるマスキング効果の増幅が検出でき、メラトニン投与により回復した。これは、松果体メラトニンが網膜内層に作用していることを示唆している。網膜内層で発現する Opn4 は青色を感受するため、次に青色と緑色の LED を用いて PinX マウスによるマスキング効果を検証した。その結果、予想通り青色光にのみ PinX によるマスキング効果増幅を示した（図 2A、B）。実際、網膜切片を用いた免疫組織化学法により RGC で MT1 と Opn4 が共局在していた（図 2C）。これらの結果は、メラトニンは MT1 に作用して Opn4 発現細胞の光感受性を抑制している可能性が示唆された。

3. メラトニンの Opn4 への作用機序

次に PinX およびメラトニンによる Opn4 発現に及ぼす影響を検証した。12 時間明期 12 時間暗期で 2 週間飼育した PinX マウスおよびメラトニン投与（サンプリング 2 時間前、腹腔内）マウスの眼球を暗期開始 1 時間後にサンプリングし、固定切片作成を行った。放射性同位元素 (RI、^{35}S) 標識 RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法により網膜切片における *Opn4* 発現を解析したところ、PinX により網膜中心部における *Opn4* の発現量が増加し、メラトニンにより減少した（One-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test）（図 2D）。さらに上記マウスの眼球を明期開始 8 時間後および 14 時間後にサンプリングしてタンパク質抽出し、ウェスタンブロット法により Opn4 の発現量を定量したところ、CBA/N マウスでは時刻に依存することなく PinX により有意に発現が低下し（図 2E）、C57BL/6J マウスでは低下しなかった（One-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test）。これらの結果は、メラトニンが Opn4 の発現量を抑制することを示唆した。

4. 非 24 時間睡眠覚醒症候群モデルマウスにおける治療効果

夜間薄明環境下（12 時間明期 400 lux、12 時間暗期 5 lux：12L12dL）での飼育で CBA/N マウスは非 24 時間型睡眠障害様行動を示し、PinX で 24 時間に同調できることから（Ikegami et al., unpublished data）、メラトニンが光同調における Opn4 の光感受性に関与しているのではないかと考えられた。そこで、MT1 アンタゴニスト (S26131) をビーズワックスに混ぜて非 24 時間睡眠覚醒症候群様行動を示す正常 CBA/N マウスの背中に埋め込み、夜間薄明条件に同調できるようになるかを検証しところ、一部のマウスで同調できるようになったが、有意な効果が得られなかった （P＞0.05、Fisher's exact test）。濃度検討や遺伝子改変によるさらなる検討が必要であろう。

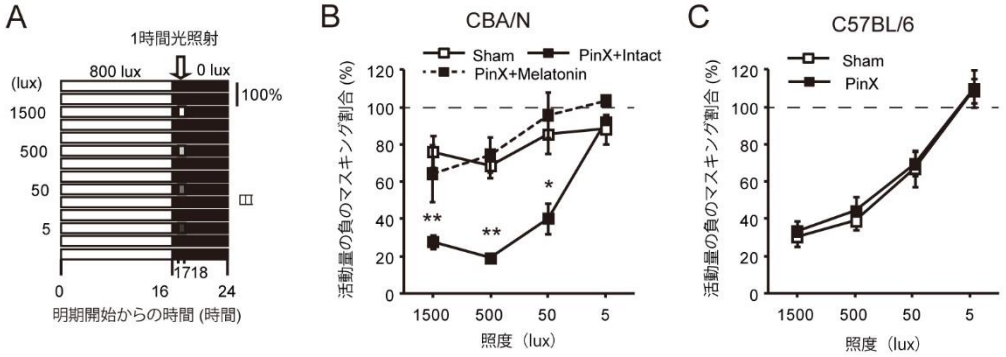


図 1. 活動量のマスキングにおける PinX およびメラトニンの効果

A) マスキング試験の方法。16 時間明期 8 時間暗期で飼育し、暗期開始 1 時間後に 1 時間光照射したときの活動量の減少割合を測定する。

B) CBA/N マウスにおけるマスキング効果。PinX は偽手術（Sham）群と比べて有意に活動量が低下し、メラトニン投与により回復した。*P＜0.05、**P＜0.01 vs. Sham (Two-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test)、Mean±s.e.m.、n = 4。

C) C57BL/6 マウスにおけるマスキング効果。PinX は影響なかった。P＞0.05 (Two-way ANOVA)、Mean±s.e.m.、n = 4。

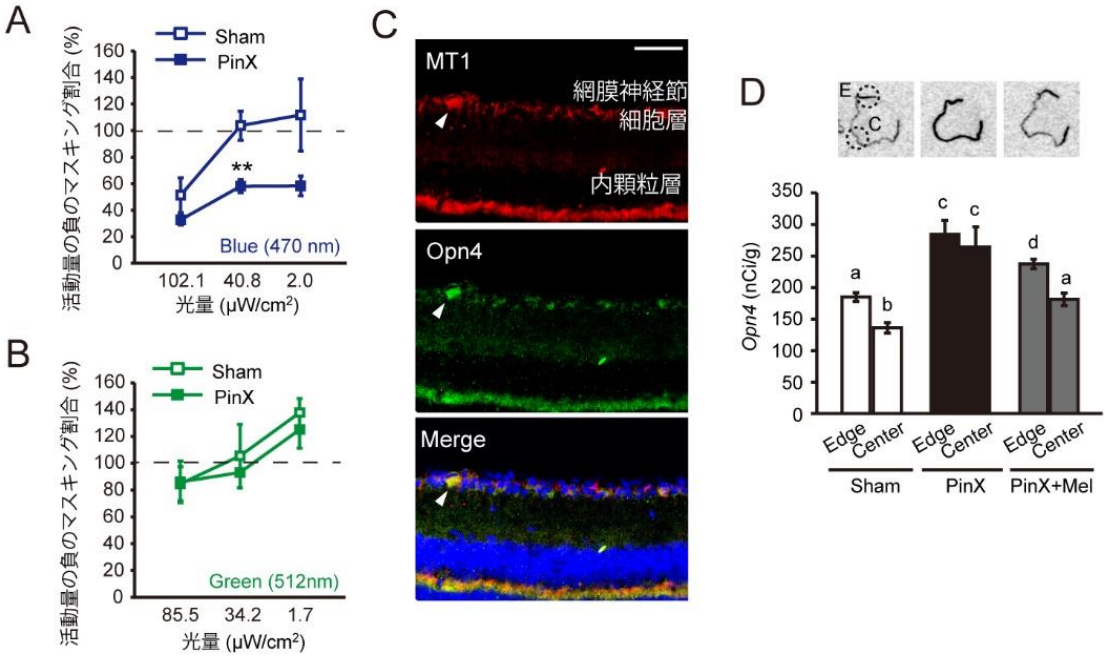


図 2. 松果体メラトニンの Opn4 発現抑制効果

A) 青色光（470 nm）によるマスキング効果。**P＜0.01 vs. Sham（Two-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test）、Mean±s.e.m.、n＝5～6。

B) 緑色光（512 nm）によるマスキング効果。P＜0.05 vs. Sham（Two-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test）、Mean±s.e.m.、n＝5～6。

C) 蛍光免疫組織化学法による MT1（赤）と Opn4（緑）の網膜神経節細胞における共発現。核染色 DAPI（青）。スケールバー：50 μm。

D) RI 標識プローブを用いた *in situ* hybridization 法によるオートラジオグラフと *Opn4* 発現の定量結果。PinX により *Opn4* は増加しメラトニンにより抑制された。a、b、c は有意差があることを示す（P＜0.05、Two-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test）、Mean±s.e.m.、n＝5～7。E：Edge、C：Center。

考　察

PinX により光感受性が増加し、松果体メラトニンによる抑制効果で回復することが判明した。網膜でもメラトニンが産生されるが、PinX マウスでメラトニン投与の影響を受けることから、PinX における光感受性増加は松果体メラトニンが欠損したことによる効果であると考えられる。また、メラトニンは MT1 に作用して Opn4 発現細胞の光感受性を抑制している可能性が示唆された。MT1 が Opn4 発現 RGC に発現していることはこれまでの報告と一致する［1］。*Opn4*$^{-/-}$マウスは光同調ができなくなり［3，4］、さらにマスキング効果が抑制されるため［5］、メラトニンによるマスキング効果の抑制は Opn4 の光感受性に作用していると考えられる。さらに、メラトニンが *Opn4* の発現量を抑制することを示唆した。MT1 にメラトニンが結合すると Gi を活性化してアデニル酸シクラーゼ活性が低下し、細胞内 cAMP 濃度が低下する。*Opn4* 発現は CREB（cAMP response element binding protein）により発現が促進されるため、RGC に作用したメラトニンによって cAMP が減少し、*Opn4* 発現促進が抑制されたのではないかと考えられる。しかし、MT1 アンタゴニストの慢性効果が非 24 時間睡眠覚醒症候群様行動に対してあまり見られなかった。至適濃度検討や遺伝子改変によるさらなる検討が必要だろう。現在作製中の *Opn4*$^{-/-}$マウスを用いたマスキング効果や非 24 時間睡眠覚醒症候群様行動への影響も今後検証する予定である。

謝　辞

本研究の共同研究者は、近畿大学医学部解剖学研究室の重吉康史教授である。また近畿大学医学部 RI 共同研究室、分子形態共同研究室、分析機器共同研究室に協力いただいた。

文　献

1） Sengupta A, Baba K, Mazzoni F, Pozdeyev N V, Strettoi E, Iuvone PM, Tosini G. Localization of melatonin receptor 1 in mouse retina and its role in the circadian regulation of the electroretinogram and dopamine levels. PloS one. 2011 Jan [cited 2015 Mar 25];6(9):e24483. DOI: 10.1371/journal.pone.0024483 PMID: 21915336

2） Mrosovsky N. Masking: History, Definitions, and Measurement. Chronobiology International. 1999 Jan 7;16(4):415–429. DOI: 10.3109/07420529908998717 PMID: 10442236

3） Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau K-W. Melanopsin and rod–cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. Nature. 2003 Jul 15;424(6944):75–81. DOI: 10.1038/nature01761 PMID: 12808468

4） Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay S a, Van Gelder RN, Hogenesch JB. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. Science. 2003;301(5632):525–527. DOI: 10.1126/science.1086179 PMID: 12829787

5） Lupi D, Oster H, Thompson S, Foster RG. The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. Nature Neuroscience. 2008 Sep 17;11(9):1068–1073. DOI: 10.1038/nn.2179 PMID: 18711396