

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790880

研究課題名(和文) 末梢体内時計の生理的・臨床的意義の解明と制御法の開発

研究課題名(英文) Evaluation of the pathophysiological significance of peripheral clocks and the development of methods of controlling them

研究代表者

安藤 仁 (ANDO HITOSHI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50382875

研究成果の概要(和文)：

末梢体内時計の生理的意義と制御機構を解明するために、肥満2型糖尿病モデルであるob/obマウスの体内時計を解析した。ob/obマウスの体内時計障害は、(1)中枢時計には認められず、末梢組織特異的に認められ、(2)代謝異常が出現する以前の3週齢時より存在し、(3)レプチンの短期間投与により改善した。したがって、末梢時計障害は代謝異常の結果としては生じていないこと、末梢時計の制御にはレプチンシグナルが重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

To elucidate the physiological significance and controlling mechanism of peripheral clocks, the biological clocks in obese diabetic ob/ob mice were studied. The impairment of circadian clocks in ob/ob mice was (1) found in the peripheral tissues, but not in the suprachiasmatic nucleus (central clock), (2) detectable before the development of metabolic abnormalities, and (3) improved by short-term treatment with leptin. These results suggest that the impairment of peripheral clocks is not a result of metabolic derangement and that leptin signaling is important for maintaining the peripheral clock functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム 体内時計 時計遺伝子 2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

摂食、糖・脂質代謝など様々な行動や生理機能には24時間の日内リズム(概日リズム)が存在し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。概日リズムは時計遺伝子群による転写・翻訳フィードバックループからなる細胞内体内時計によって発振されており、各末梢臓器の末梢時計は、視床下部に存在す

る中枢時計の調節を受けながら、様々な遺伝子発現を直接的に制御している。したがって、肝、脂肪組織、筋組織などの代謝関連臓器における糖・脂質代謝は各臓器の細胞内体内時計が制御している。

近年、研究代表者らの報告等により、体内時計機能障害は2型糖尿病を初めとする生活習慣病の発症と密接に関連することが明

らかになった。すなわち、体内時計は糖・脂質代謝に関わる転写因子群（PPARs, SREBP-1, PGC-1 など）の遺伝子発現を調節すること、時計遺伝子は脂肪細胞分化や脂肪合成を直接制御する転写因子でもあることが判明し、さらに、全身性の時計遺伝子変異マウスは高血糖、メタボリックシンドロームを発症すること、時計遺伝子の遺伝子多型は2型糖尿病、高血圧、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝の有病率と関連すること、2型糖尿病のモデルマウスおよび患者では実際に体内時計や様々な遺伝子の発現リズムが障害されていることが明らかになった。したがって、体内時計障害は2型糖尿病など生活習慣病の重要な一因であると考えられる。しかしながら、時計遺伝子の変異マウスや遺伝子多型は全身性の体内時計障害であり、時計遺伝子変異マウスは過食による肥満も認めることから、生活習慣病の発症には、中枢時計と末梢時計のどちらの体内時計障害の影響が大きいか、末梢時計ではどの臓器の体内時計が重要であるか等は不明である。

肝臓は糖・脂質・タンパク代謝や薬物代謝を担う中心的臓器であり、肝機能の恒常性の破綻は2型糖尿病や脂質異常症をもたらすことから、肝の体内時計はこれらの代謝異常の発症に深く関与する可能性がある。また、中枢時計は光刺激の影響を強く受ける一方、肝などの末梢時計は食事の影響を強く受けることが知られており、さらに肝の体内時計は薬物（PPAR 作動薬やグルココルチコイドなど）の影響も受けやすいことから、肝の体内時計障害は食事療法や薬物療法により治療できる可能性が高い。このことは、夜型や不規則な生活を送ることの多い現代人に対し、生活スタイルを変えることなく、肝の体内時計を整えることで生活習慣病を予防・治療できる可能性を示しており、そのような方法が開発できれば、現代社会の生活習慣病の急増に歯止めがかかるものと期待される。

2. 研究の目的

そこで本研究では、肝特異的に体内時計を障害した遺伝子改変マウスを解析し、肝の体内時計の生理的役割を解明することを第1の目的とした。さらに、末梢体内時計機能が減弱している2型糖尿病モデルマウスを用い、末梢時計障害機序を明らかにするとともに、その治療法（食餌療法・薬物療法）を見出すことを第2の目的とした。

3. 研究の方法

(1)肝特異的 Bmal1 ノックアウトマウスの作製

まず、体内時計のコア遺伝子である Bmal1 の Exon11 とその周辺の intron を loxp では

さみ、Cre の存在下で Exon12 以下をフレームシフトでノックアウトするターゲティングベクターを構築した。試験管内で Cre-loxp システムが作動することを確認後、ターゲティングベクターを ES 細胞 (C57BL/6 マウス) にトランスフェクションし、相同組み換え ES 細胞を作製した。ES 細胞を Balb/c マウス胚盤胞にインジェクションし、ICR マウスの子宮内に移植して得られたキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配し、毛色が黒色である C57BL/6 バックグラウンドの F1 マウスを得た。その後、交配により Bmal1 flox ホモマウスを作出し、さらにアルブミン-Cre マウスとの交配により肝特異的 Bmal1 ノックアウトマウスを得ることにした。

(2)ob/ob マウスの末梢時計障害機序の解析および治療法の開発

雄性 C57BL/6J および ob/ob マウスを5週齢で購入し、12時間明暗周期、自由飲水・自由摂食下で飼育した。一部のマウスには、重量当たりのカロリー量が通常食の1/2である高セルロース食を6週齢より4週間投与し、また、別のマウスには9週齢よりレプチン1.5 mg/kg を1日1回7日間腹腔内投与した。10週齢時に、各マウスより視交叉上核、肝、精巢上体周囲脂肪組織を24時間の4時点（6時間毎）で採取し、各サンプルの時計遺伝子 mRNA 発現量を real-time PCR により定量した。

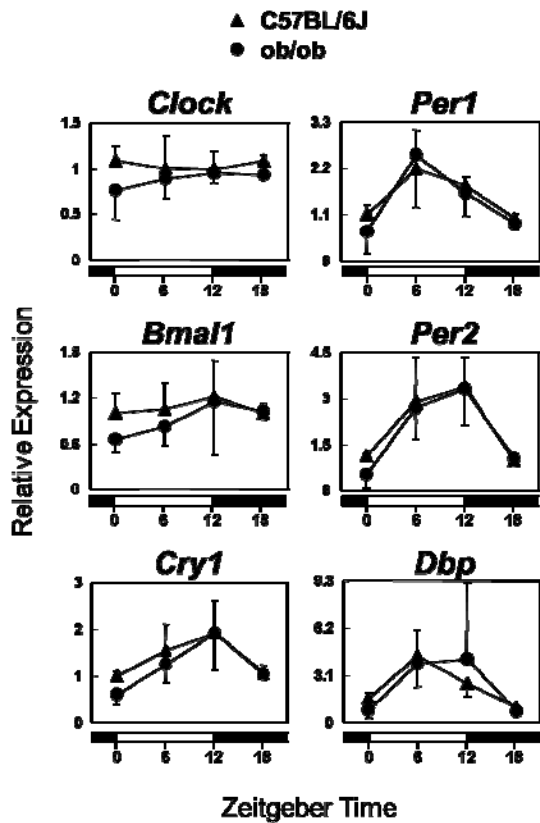
4. 研究成果

(1)Bmal1flox マウスの作製

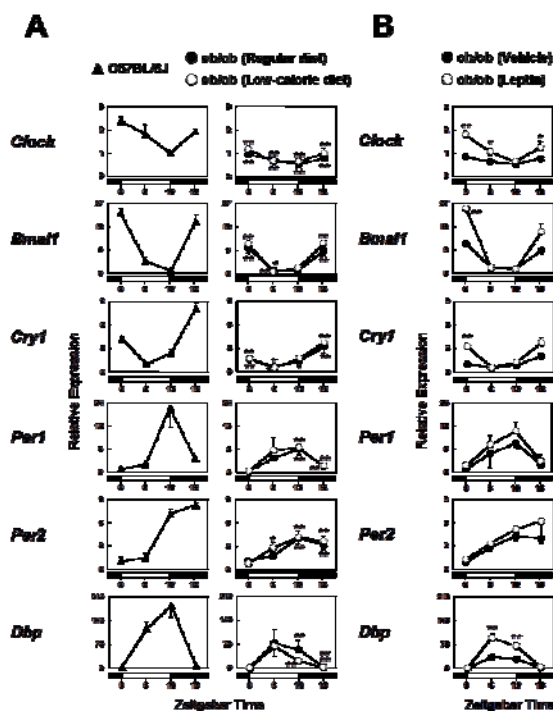
作出した Bmal1 flox ホモマウスは、Cre マウスとの交配なしに、低体重、骨格異常、不妊を認め、ほとんどのマウスは短命であった。この表現型は、これまでに報告されている全身性の Bmal1 ノックアウトマウスのもと同であり、今回作出した Bmal1 flox マウスは、Bmal1 の発現は認めたものの、機能的にはシンプルノックアウトマウスであることが判明した。この時点で、すでに国内外の複数のグループが Bmal1 flox マウスの作製に成功していたため、日本大学・榛葉繁紀博士のグループより Bmal1 flox マウスを譲り受け、肝特異的 Bmal1 ノックアウトマウスの解析を開始した。

(2)ob/ob マウスの末梢時計障害機序の解析

ob/ob マウスの視交叉上核の時計遺伝子 mRNA 発現リズムを調べたところ、正常コントロールである C57BL/6J マウスのもと同らかな差異はなかった（図1）。一方、肝（図2A）および脂肪組織の時計遺伝子発現リズムは、ob/ob マウスでは著明に減弱していた。これらのことより、ob/ob マウスの体内時計障害は末梢組織特異的であることが明らかになった。

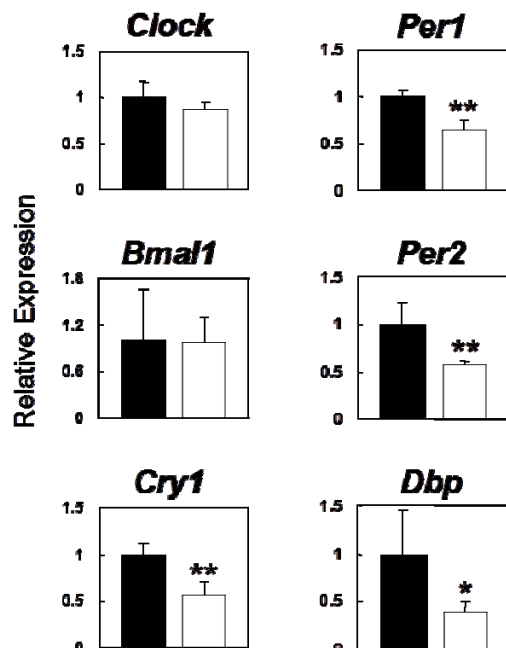


【図 1】視交叉上核の時計遺伝子 mRNA 発現リズム



【図 2】肝の時計遺伝子 mRNA 発現リズム (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

次に、代謝異常の改善により ob/ob マウスの末梢時計障害が軽減するか否かを検討した。高セルロース食を 4 週間投与したマウスは、体重増加が顕著に抑制され、高血糖の改善、高インスリン血症および高コレステロール血症の軽減を認めた。しかしながら、肝 (図 2A) および脂肪組織の時計遺伝子発現リズムはまったく改善しなかった。一方、レプチンを zeitgeber time 1 に 7 日間反復投与した ob/ob マウスは、高セルロース食負荷マウスと同程度の代謝異常の軽減であったにもかかわらず、肝 (図 2B) および脂肪組織の時計遺伝子発現リズムが有意に改善した。さらに、体重増加や代謝異常を来していない 3 週齢の時点においても、ob/ob マウスではコントロール (ob/+, +/+) マウスに比し、ピーク時刻の時計遺伝子 mRNA 量が有意に低下していた (図 3)。これらのことより、ob/ob マウスの末梢時計障害は代謝異常の結果ではないことが明らかとなった。また、末梢時計の制御にはレプチンシグナルが重要であることも判明した。



【図 3】Zeitgeber time 12 における脂肪組織の時計遺伝子 mRNA 発現量 (■C57BL/6J マウス, □ob/ob マウス; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

これらの知見は、末梢時計の重要性を示唆するとともに、その制御法の開発に向けた重要な情報である。今後は、ノックアウトマウスの解析により肝の体内時計の生理的意義を明らかにするとともに、レプチンによる末梢時計の制御機構をさらに解明し、末梢時計障害の治療法の開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, Fujimura A. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology* 152:1347-54, 2011 査読有り

②Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Eto T, Takamura T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A. Associations of metabolic parameters and ethanol consumption with messenger RNA expression of clock genes in healthy men. *Chronobiol Int* 27:194-203, 2010 査読有り

③Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Takamura T, Yokota N, Saito T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A. Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65:9-13, 2010 査読有り

[学会発表] (計5件)

①安藤 仁、健常人女性における末梢血時計遺伝子発現におよぼす年齢およびシフトワークの影響、第16回日本時間生物学会学術大会、2009年10月27日、大阪国際会議場(大阪市)

②安藤 仁、健常人において体内時計と関連する因子とは? 末梢血時計遺伝子 mRNA 発現量を指標とした検討、第83回日本内分泌学会学術総会、2010年3月26日、国立京都国際会館(京都市)

③安藤 仁、糖尿病の時間治療、日本薬学会第130年会、2010年3月28日、ホテルグランヴィア岡山(岡山市)

④Hitoshi Ando, Mechanism of impairment of circadian clocks in the peripheral tissues of ob/ob mice, The 26th Conference of the International Society for Chronobiology, 2010年7月8日、Vigo (Spain)

⑤安藤 仁、ob/ob マウスにおける末梢体内時計障害機序の解明、第84回日本内分泌学会学術総会、2011年4月23日、神戸国際会議場(神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 仁 (ANDO HITOSHI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50382875