

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590666

研究課題名(和文)末梢体内時計を標的とした2型糖尿病の薬物療法の開発

研究課題名(英文)Development of pharmacological therapy targeting peripheral circadian clocks for treatment of type 2 diabetes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝や脂肪組織などの末梢組織における体内時計(末梢時計)の障害は、2型糖尿病を初めとする生活習慣病の一因であることが示唆されている。そこで、末梢時計を標的とした生活習慣病の予防・治療法を開発するために、末梢時計の制御が可能な薬物をマウスモデルを用いて探索し、2型糖尿病治療薬であるエキセナチドには摂餌刺激よりも強力な末梢時計制御作用があることを見出した。また、空腹時血糖の日内リズムは直接的には肝の体内時計により制御されていることを明らかにし、糖代謝制御機構における末梢時計の関与を明確にした。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have indicated that disrupted circadian clocks in peripheral tissues (peripheral clocks) are associated with the pathophysiology of lifestyle-related metabolic diseases including type 2 diabetes. To develop a strategy targeting peripheral clocks for treatment/prevention of metabolic diseases, whether exenatide could affect the rhythms of peripheral clocks was investigated in mice, and we found that exenatide modulates peripheral clocks more strongly than feeding. In addition, we evaluated the impact of peripheral clock in the liver and revealed that hepatic clock directly regulates the daily fasting blood glucose rhythm.

研究分野：内科学 臨床薬理学

キーワード：体内時計 概日リズム 時計遺伝子 糖尿病 生活習慣病 糖新生 暁現象

1. 研究開始当初の背景

(1) 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り発振されており、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。中枢時計は光刺激により時刻が調節される一方、末梢時計の時刻は食餌刺激により調節されており、末梢時計と代謝は相互に密接に関連している。

(2) 近年、様々な研究により、体内時計の障害と 2 型糖尿病を初めとする生活習慣病との関連が明らかになってきた。例えば、コア時計遺伝子である *Clock* に変異を有するマウスは高血糖、メタボリックシンドロームを発症すること、ヒトにおいても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が報告されている。また、末梢組織特異的あるいは肝特異的に時計遺伝子を変異させたマウスの解析により、代謝制御における末梢時計の重要性も確認された。一方、われわれは、肥満糖尿病モデルマウスおよび 2 型糖尿病患者の体内時計機能を解析し、2 型糖尿病では実際に末梢時計障害 (リズム性の減弱) を認めることを明らかにした (*Endocrinology* 146:5631, 2005; *Diabetologia* 52:329, 2009)。さらに、肥満糖尿病モデルである ob/ob マウスの体内時計を解析し、体内時計障害は末梢 (肝・脂肪組織) 特異的に認められ、肥満や代謝異常の出現に先行することを見出した (*Endocrinology* 152:1347, 2011)。したがって、体内時計障害、特に末梢時計障害は、2 型糖尿病を初めとする生活習慣病の一因である可能性が高い。

(3) しかしながら、代謝制御機構における末梢時計の具体的な役割に関しては、未だ不明な部分が多い。例えば、早朝には絶食下であっても血糖値が上昇することが「暁現象」として知られているが、これは深夜に分泌される成長ホルモンが早朝に肝のインスリン抵抗性を高め、肝糖産生を亢進させるためであることが臨床研究により示唆されている。一方、動物では、肝の糖新生には活動期の開始時をピークとする日内リズムを認め、このリズムは中枢時計を破壊した場合には消失することが報告されている。したがって、暁現象は中枢時計によって制御されていると考えられるが、肝の体内時計の直接的な役割に関してははっきりしていない。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究は、末梢時計障害を改善することにより 2 型糖尿病を予防、治療する方

法を開発するために、末梢時計の制御が可能な薬物 (2 型糖尿病治療薬) を見出すことを主要な目的とした。

(2) また、糖代謝における末梢時計の役割を明らかにするために、肝の体内時計と空腹時血糖の日内リズム (暁現象) との関連を検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス

雄性 C57BL/6J マウスおよび B6.V-Lep^{ob}/J (ob/ob) マウスを日本チャールスリバー (横浜) より購入し、12:12 時間明暗周期、自由摂餌下で 2 週間以上馴化した後に実験に供した。なお、すべての動物実験は自治医科大学動物実験委員会・遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て、関連法令等を遵守して実施した。

(2) 薬物投与

メトホルミン (和光純薬、大阪)、エキセナチド (シグマアルドリッチ、米国) はそれぞれ生理食塩水、0.02% マウス血清アルブミン添加生理食塩水に溶解し、150 mg/kg、10 nmol/kg を腹腔内投与した。オクトレオチド (サンドスタチン®LAR®, ノバルティスファーマ、東京) は 20 mg/kg で筋肉内投与した。

(3) 定量的リアルタイム PCR

摘出した肝より RNeasy Mini キット (キアゲン、米国) を用いて RNA を抽出し、逆転写後に TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック、米国) により各遺伝子の mRNA 量を測定した。データは *Rplp0* 遺伝子を内在性コントロールとして用いた比較 Ct 法により解析した。

(4) 統計解析

データは SPSS ソフトウェア (ver. 16.0J、日本 IBM、東京) を用い、ANOVA または *t* テストにより解析した。データの日内リズムはコサイン法 (*Biol Rhythm Res* 38:275, 2007) により解析した。

4. 研究成果

(1) 末梢時計を制御する薬物療法の開発

先の研究において、ob/ob マウスの末梢時計障害はレプチン欠損自体によりもたらされることが示唆された (*Endocrinology* 152:1347, 2011)。そこで、レプチンシグナル経路にある AMP 活性化プロテインキナーゼへの作用が報告されている 2 種類の糖尿病治療薬、ピグアナイド薬であるメトホルミンとグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬であるエキセナチドを選出し、肝の時計遺伝子 mRNA 発現量 (暗期の中間点) におよぼす影響を予備検討した。これらの薬物は

1日1回、暗期の開始時に4日間投与し、同時に、薬物投与による摂餌パターン変化の影響を除外するために給餌時刻を明期の12時間のみに制限する時刻制限給餌を行った。その結果、エキセナチドにはコア時計遺伝子 *Bmal1* mRNA 量におよぼす有意な影響が認められた(図1)。

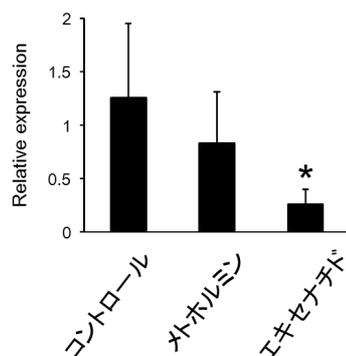


図1 肝における *Bmal1* mRNA 量
Data are means + SD.
* $P < 0.05$ vs. control (Dunnett test).

そこで次に、エキセナチドを同様に投与し時計遺伝子発現リズムの変化を検討したところ、エキセナチド投与群とコントロール群における肝の体内時計の位相には約8時間の差異が認められた(図2)。

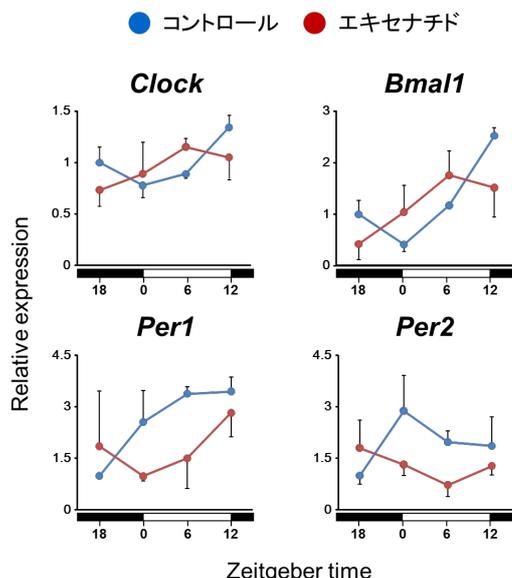


図2 肝における時計遺伝子 mRNA 発現リズム
Data are means and SD.

また、肝の時計遺伝子発現におよぼすエキセナチドと摂餌の影響を比較したところ、絶食後の摂餌は2時間後の比較的早期に時計遺伝子 *Per1* と *Per2* の mRNA 量をそれぞれ減少、増加させたが、エキセナチドにはそのような作用は認められなかった。一方、エキセナチドは投与12時間後に有意に *Per1* 発現量を減少させた。

以上のことより、エキセナチドには摂餌とは異なる機序により末梢時計を制御する作

用があることが判明した。また、その作用は時刻制限給餌下でも顕著に認められたことから、摂餌よりも強力であることが示された。このように強力に末梢時計に作用する2型糖尿病治療薬はこれまでに知られておらず、しかも、エキセナチドをはじめとする GLP-1 受容体作動薬はすでに2型糖尿病の治療に広く用いられていることから、本成果は高い新規性を有するとともに臨床的に重要な仮説をもたらす。すなわち、エキセナチド(あるいは GLP-1 受容体作動薬)を適切な方法で(適切な時刻に)投与することにより、2型糖尿病患者で認められることの多い末梢時計障害を改善できる可能性がある。一方、エキセナチドの不適切な投与は末梢時計障害を惹起、増悪させる可能性も考えられる。したがって、今後は、血糖値や糖尿病合併症への影響も含め、エキセナチドの投与方法が末梢時計と糖尿病の病態におよぼす影響を臨床において検討する必要がある。

(2)空腹時血糖の日内リズム形成における肝の体内時計の役割

まず初めに、C57BL/6J マウスを24時間絶食させ、その間の血糖値の推移を観察した。絶食を暗期の開始時から開始した場合には、血糖値は暗期中は徐々に低下したが、明期になると上昇に転じた。一方、絶食を明期の開始時から開始した場合には、血糖値は明期中は低下せず、暗期になってから徐々に低下した。そこで、絶食開始6時間後から24時間後までの血糖値を空腹時血糖と定義し、暗期の開始時から絶食を開始した場合と明期の開始時から絶食を開始した場合の空腹時血糖を合わせて解析した。その結果、空腹時血糖には暗期の開始時直前をピークとする有意な日内リズムを認めた(図3A)。また、顕著なインスリン抵抗性を有する *ob/ob* マウスでも同様に検討したところ、C57BL/6J マウスよりもさらに明確な暗期の開始時をピークとする日内リズムを認めた(図3B)。これらのピーク時刻は活動期の開始時にあたることから、本モデルは晝現象の観察に優れたモデルであると考えられた。

次に、マウスに対して明期(休息期)のみに給餌する時刻制限給餌を2週間行い、空腹時血糖の日内リズムが変化するか否かを検討した。この時刻制限給餌を行ったマウスでは、自由摂餌を継続した対照マウスと比べて、時計遺伝子群(*Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Dbp*)や肝糖産生関連分子(*Pgc1*, *Pepck*, *G6Pase*, *Glut2*)の mRNA 発現リズムの位相がほぼ12時間シフトし、完全に逆転していた。これらの結果に合致して、空腹時血糖の日内リズムのピーク時刻も明期の開始時頃にシフトすることが明らかになった(図3C・D)。さらに、コア時計遺伝子である *Bmal1* の発現を肝特異的に欠損させたマウスでは、空腹時血糖の日内リズムは消失していた(図4)。

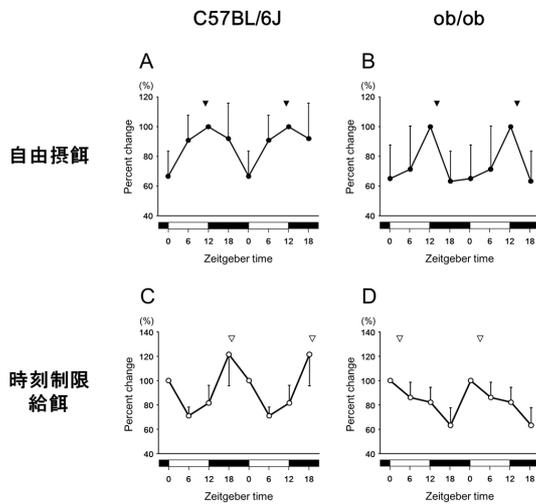


図3 空腹時血糖の日内リズム
空腹時血糖の変化率 (means and SD) をダブルプロットした。矢頭は頂値位相を示す。

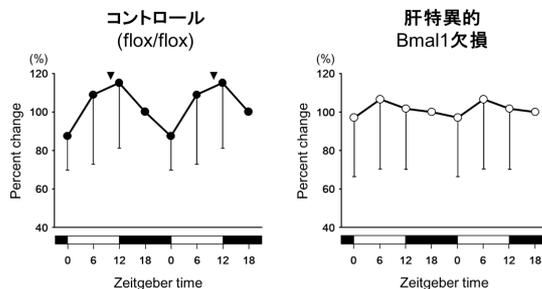


図4 肝特異的 Bmal1 欠損マウスと対照マウスにおける空腹時血糖の日内リズム
空腹時血糖の変化率 (means - SD) をダブルプロットした。矢頭は頂値位相を示す。

最後に、ヒトで示されているように、本マウスモデルの暁現象の形成にも成長ホルモン分泌が関与しているか否かを検討した。C57BL/6J マウスに対し、暗期の開始時にオクトレオチドを投与し絶食を開始したところ、24 時間後には成長ホルモンがほぼ感度以下に抑制された。それにもかかわらず、すべてのマウス ($n=6$) において、明期の中間点から暗期の開始時にかけての空腹時血糖の上昇、すなわち暁現象が認められた。

以上のことから、少なくともマウスにおいては、空腹時血糖の日内リズムは肝の体内時計により直接的に制御されており、したがって、そのリズムは光刺激よりも食餌刺激の影響を強く受けることが明らかになった。また、今回の実験条件下では成長ホルモンの分泌を抑制した場合にも暁現象が認められており、このことから肝糖産生の日内リズム形成には肝の体内時計の関与が大であることが示された。これらの知見は、糖代謝における末梢時計の重要性をさらに裏付けるものであり、今後は末梢時計障害が代謝を破綻させる機序についても明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 安藤 仁、藤村昭夫. サーカディアンリズムと肥満. 医学のあゆみ 査読無 253:239-243, 2015.
2. Ando H, Ushijima K, Fujimura A. Indirect effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 on the peripheral circadian clocks in mice. *PLoS One* 査読有 8:e81119, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0081119.
3. 安藤 仁. 体内時計と生活習慣病. 臨床病理 査読無 61:1044-1050, 2013.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 安藤 仁、藤村昭夫. マウスでは肝の体内時計が暁現象を規定する. 第 87 回日本内分泌学会学術集会. 2014 年 4 月 24 日. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
2. 安藤 仁、藤村昭夫. 体内時計障害と糖尿病. 第 20 回日本時間生物学会学術大会. 2013 年 11 月 10 日. 近畿大学東大阪キャンパス (大阪府東大阪市).
3. 安藤 仁、牛島健太郎、藤村昭夫. 体内時計におよぼす Exendin-4 の影響. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2013 年 5 月 16 日. 熊本ホテルキャスル (熊本県熊本市).
4. 安藤 仁. 時計遺伝子と生活習慣病. 第 21 回日本臨床化学会関東支部総会・第 69 回日本臨床検査医学会関東甲信越支部例会連合大会. 2013 年 5 月 11 日. 自治医科大学地域医療情報研修センター (栃木県下野市).
5. 安藤 仁、牛島健太郎、藤村昭夫. 体内時計におよぼすエキセナチドの影響. 第 19 回日本時間生物学会学術大会. 2012 年 9 月 15 ~ 16 日. 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市).

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.jichi.ac.jp/rinshoyakuri/>

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

(2) 連携研究者

牛島健太郎 (USHIJIMA, Kentaro)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70448843

篁 俊成 (TAKAMURA, Toshinari)
金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授
研究者番号: 00324111