

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

マウス体内時計と脂質代謝の相互作用解明

Interaction between mouse circadian clock
and lipid metabolism

申請者

工藤	崇
Takashi	Kudo

電気・情報生命専攻
神経薬理学研究

2007年 5月

生体の生理機能やその活動は昼夜常に同じ状態を保っているわけではなく、ほぼ1日を周期とした概日リズム変動を示す。哺乳類においては脳の視床下部にある視交叉上核が体内時計の中心である。この視交叉上核を破壊すると体内時計が消失することがわかっている。体内時計は視交叉上核だけでなく、末梢組織にも存在する。この末梢の体内時計は視交叉上核からの液性因子または、神経因子によって調節されている。

時計遺伝子は、種によってその分子は異なるが、共通の振動原理で発振される。その振動原理とは、振動分子が振動分子自身を産生する過程を抑制するネガティブ因子として働く、ネガティブ・フィードバック機構である。振動周期はネガティブ因子の産生から抑制までの過程の時間のずれの大きさによって決定される。そのおおもとなっているのは時計遺伝子の発現量の振動である。摂食などの生命活動や様々な生活習慣病と体内時計との関係について、ヒトの研究に直接結びつくということで最近関心を持たれている。また時計遺伝子の一つであるBmal1遺伝子が脂肪細胞の分化に関わっているという報告もある。ところで時計遺伝子によって制御されている遺伝子は全遺伝子の約10%だという報告がある。この結果は多くの遺伝子が時計遺伝子によって支配されていることを示すものである。もし、脂質代謝に関係する重要な遺伝子が、時計遺伝子による制御を受けていた場合、時計遺伝子変異マウスでは脂質代謝に異常が生じる可能性がある。一方で、時計遺伝子発現は種々の外来刺激に対して応答反応するものがある。すなわち脂質代謝異常により細胞内情報伝達系が変化すると、そのことが体内時計の遺伝子発現に影響することが十分に考えられる。そこで、本研究ではマウスを用いて、脂質代謝と体内時計の相互作用を明らかにする研究を行った。

まず、第1章では高コレステロール食や肥満などメタボリックシンドローム状態が体内時計に与える影響について調べた。第1章1節では高コレステロール食が体内時計に与える影響について調べた。心筋梗塞は朝に多いことが報告されており、これは繊維素溶解系の低下と一部関係している。Pai-1遺伝子は繊維素溶解系に関係する重要な遺伝子であり、マウスの心臓と肝臓においては時計遺伝子の制御を受けている。高コレステロール血症はPAI-1増加に伴う繊維素溶解系の低下に関係し、粥状動脈硬化につながる可能性もある。高コレステロール食を与えたマウスの肝臓では時計遺伝子に変化は無いが、Pai-1遺伝子の時計出力増大が見られた。またコレステロールも肝臓に蓄積していた。この傾向は若いマウスよりも老化したマウスで顕著だった。しかし、心臓の時計遺伝子には変化は無かった。高コレステロール食によって増大した肝臓のPai-1遺伝子発現は普通食に戻すことによって発現量が下がった。Pai-1遺伝子を制御している遺伝子を複数調べた結果、Nr4a1遺伝子がリズム変動していることが分かった。また、中心時計である視交叉上核を破壊するとPai-1遺伝子

のリズムが消失した。本研究によって、高コレステロール食により、肝臓の時計遺伝子に変化は無いが **Pai-1** 遺伝子のリズム性が明白になることが分かった。

第 1 章 2 節では 2 型糖尿病が体内時計に与える影響について調べた。**Pai-1** 遺伝子は時計遺伝子だけでなくインスリンや中性脂肪のような液性因子によっても制御されている。よって、高血糖、高インスリン、高中性脂肪を示す 2 型糖尿病モデルマウス (**db/db** マウス) の肝臓の時計遺伝子、**Pai-1** 遺伝子、そして行動リズムを調べた。**db/db** マウスとはレプチン受容体に変異が起こっているマウスである。**db/db** マウスは肝臓の時計遺伝子の振幅が減っていることが分かった。さらに行動リズムも乱れていること、肝臓における **Pai-1** 遺伝子発現が増大していることもわかった。**db/db** マウスに餌を与える時間を制限すると肝臓の時計遺伝子の振幅が大きくなり、行動リズムも正常になり、**Pai-1** 遺伝子発現量も正常になった。また、糖尿病治療薬であるピオグリタゾン投与することによって **Pai-1** 遺伝子発現が減少した。以上のことから 2 型糖尿病が末梢時計の働きを阻害することが示された。また、糖尿病治療薬であるピオグリタゾンよりも餌を制限する方が効果的であることがわかった。

第 1 章 3 節では 1 型糖尿病が体内時計に与える影響について調べた。すい臓のランゲルハンス島ベータ細胞を破壊するストレプトゾトシンを投与することにより、1 型糖尿病モデルマウスを作成した。血糖値が上昇したのを確認した後、肝臓の時計遺伝子発現と行動リズムを調べた。その結果、肝臓の **Per2** 遺伝子発現のリズム性が消え、**Bmal1** 遺伝子の位相が前進しているが、**Per1** 遺伝子は変化が無かった。**Pai-1** 遺伝子に関してはストレプトゾトシン投与の影響は見られなかった。また、行動リズムにも変化は無かった。

第 2 章では時計遺伝子の異常が脂質代謝に与える影響について調べた。第 2 章 1 節では時計遺伝子に変異が起こっているマウスに対する高脂肪食の影響について調べた。体内時計に異常が生じているマウスは脂質代謝に異常がある可能性を検討した。ワイルドタイプマウスまたはクロックミュータントマウスに普通食または高脂肪食を与えた。高脂肪食を与えている間、摂食量と体重を計測し、その後血液と肝臓をサンプリングした。検討した項目は①体重、②血液、③肝臓の脂質、④肝臓の遺伝子の 4 つである。体重についてはエサの条件によって増加の割合に変化があるかどうかを調べた。血液からは中性脂肪、脂肪酸を検討した。肝臓の脂質としては、コレステロール、中性脂肪を調べた。肝臓の時計遺伝子と脂質代謝に関係する遺伝子を解析した。まずは代表的な時計遺伝子である **Per2** と **Bmal1** を調べた。次に、脂質代謝に関する遺伝子を検討した。ただし、脂質代謝に関係する遺伝子は膨大な数に上るので全てを調べるにはとても時間がかかる。よって、脂質代謝に関係する遺伝子でさらに時計遺伝子による制御を受けている遺伝子に限定した。脂質代謝には取り込み、輸送、合成など様々な要因がある。脂質代謝のどの段階で時計制御が強く働いている

か検討した。高脂肪食による実験ではクロックミュータントマウスの肝臓では中性脂肪がたまりにくいことが分かった。またその原因遺伝子として、*Acs14*、*Fabp1*が候補として考えられた。この2つの遺伝子は時計遺伝子の制御を受けており、かつ脂質代謝でも重要な役割を果たす遺伝子である。

第2章第2節では時計遺伝子に変異が起こっているマウスに対する高コレステロール食の影響について調べた。まずクロックミュータントマウスとワイルドタイプマウスを用意した。普通食群と高コレステロール食群に分けエサを与えた。実験の際、1週間ごとに体重と摂食量を計測し、普通食と高コレステロール食またはワイルドタイプマウスとクロックミュータントマウスで差があるかを解析した。4週間目に体重をはかってから、肝臓、血液のサンプリングを行った。4時間ごとにサンプリングを行うことにより、日内リズムを観察することができる。肝臓からは脂質を抽出し、コレステロールを測定した。次に*Bmal1*、*Per1*などの時計遺伝子や、*Hmgcr*、*Cyp7a1*などのコレステロール代謝にかかわる遺伝子を調べた。血液からは、コレステロールを調べた。脂質代謝にはコレステロールの取り込み、コレステロールの合成、コレステロールの排出など様々な要因がある。コレステロール代謝のどの段階で時計制御が強く働いているかを検討した。また、コレステロール代謝の各ステップにおける重要な遺伝子を調べ、変化が起こっているかどうかを検討した。高コレステロール食による実験ではクロックミュータントマウスの肝臓でコレステロールがたまりやすいことが分かった。またその原因遺伝子として *Cyp7a1*が候補として考えられた。この遺伝子は時計遺伝子の制御を受けており、かつ脂質代謝で重要な役割を果たす遺伝子である。

以上の結果、高脂血症、肥満、糖尿病などメタボリックシンドローム状態になると、体内時計遺伝子発現に影響が出現したり、その下流遺伝子発現にも異常が出てくるなど、メタボリックシンドロームそのものが体内時計機構を異常にすることがわかった。また体内時計が異常なマウスではコレステロールや脂質代謝に異常が出現しやすいこともわかった。本研究成果が現在社会問題となっているメタボリックシンドロームの病因解明や治療に役立つ情報提供になることを期待する。

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	○Takashi Kudo, Toru Tamagawa, Mihoko Kawashima, Natsuko Mito, Shigenobu Shibata. [Attenuating effect of <i>Clock</i> mutation on triglyceride contents], [Journal of biological rhythm] in press
論文	○Takashi Kudo, Emiko Nakayama, Sawako Suzuki, Masashi Akiyama, Shigenobu Shibata. [Cholesterol diet enhances daily rhythm of <i>Pai-1</i> mRNA in the mouse liver], [Am J Physiol Endocrinol Metab.], 287(4):E644-651, 2004
論文	○Takashi Kudo, Masashi Akiyama, Koji Kuriyama, Motoki Sudo, Takahiro Moriya and Shigenobu Shibata. [Night-time restricted feeding normalises clock genes and <i>Pai-1</i> gene expression in the <i>db/db</i> mouse liver], [Diabetologia], 47(8):1425-1436, 2004
総説	○ Takashi Kudo, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata. [Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: the circadian clock and hyperlipidemia], [J Pharmacol Sci], 103(2):139-43. 2007
講演	○工藤崇、吉田晶子、井筒裕之、平井千紗子、山口正太郎、八板強志、堀川和政、柴田重信「気分障害治療薬と体内時計遺伝子の役割」 第13回日本時間生物学会学術大会 プログラム p,58 東京 2006年11月30日～12月2日
講演	○工藤崇、川島美穂子、多摩川徹、柴田重信、「高脂肪食における ICR系クロックミュータントマウス脂肪組織への影響」、第83回日本生理学会大会、プログラム p、93、前橋 2006年3月28日
講演	○工藤崇、川島美穂子、多摩川徹、柴田重信、「ICR系クロックミュータントマウスの高脂肪食負荷時における脂質代謝」、第79回日本薬理学会年会、プログラム p、65、横浜 2006年3月8日
講演	○工藤崇、川島美穂子、多摩川徹、八板強志、山村勇介、柴田重信、「マウスにおける糖尿病、高脂肪食、高コレステロール食と体内時計」、第12回日本時間生物学会学術大会ワークショップ2「生活習慣病と体内時計」W2-1、つくば、2005年11月24日

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	○工藤崇、新井幸代、柴田重信、「生体リズムに関連した運動処方の開発」、第1回環境生理学プレコングレス、プログラム p,12、仙台 2005年 5月 17日
講演	○工藤崇、柴田重信、「糖尿病モデルマウスの体内時計異常に対する薬物・非薬物療法」、第4回時間薬理・治療を考える会、静岡 2004年 9月 18日
国際学会	○Takashi Kudo, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, [Role of 5-HT1a/ 5-HT7 receptors in central and peripheral circadian clocks], [Serotonin Club sixth IUPHAR satellite meeting on serotonin], Sapporo, Japan, (June 2006)
その他 (論文)	Ishihara A, Matsumoto E, Horikawa K, Kudo T, Sakao E, Nemoto A, Iwase K, Sugiyama H, Tamura Y, Shibata S, Takiguchi M. [Multifactorial Regulation of Daily Rhythms in Expression of the Metabolically Responsive Gene <i>Spot14</i> in the Mouse Liver], [JBR], 2007 (掲載決定)
その他 (論文)	Shirai H, Oishi K, Kudo T, Shibata S, Ishida N. [PPARalpha is a potential therapeutic target of drugs to treat circadian rhythm sleep disorders], [Biochem Biophys Res Commun], [Epub ahead of print] 2007
その他 (論文)	Wakatsuki Y, Kudo T, Shibata S. [Constant light housing during nursing causes human DSPS (delayed sleep phase syndrome) behaviour in Clock-mutant mice], [Eur J Neurosci], (8):2413-24, 2007
その他 (論文)	Hayasaka N, Yaita T, Kuwaki T, Honma S, Honma KI, Kudo T, Shibata S. [Optimization of Dosing Schedule of Daily Inhalant Dexamethasone to Minimize Phase-shifting of Clock Gene Expression Rhythm in the Lungs of the Asthma Mouse Model], [Endocrinology], [Epub ahead of print] 2007
その他 (論文)	Kuriyama K, Sasahara K, Kudo T, Shibata S. [Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse], [FEBS Lett], 13;572(1-3):206-210, 2004

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他(国際学会)	○ Kudo Takashi, Kawashima Mihoko, Tamagawa Toru, Shibata Shigenobu, [Attenuating effect of <i>Clock</i> mutation on triglyceride contents], GRC, Aussois, France, (May 2007)
その他(国際学会)	○ Kudo Takashi, Kawashima Mihoko, Tamagawa Toru, Shibata Shigenobu, [High Fat Diet Failed to Increase the Content of Liver Triglyceride in <i>Clock</i> -Mutant Mice Carrying ICR Background] , [The 6 th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies(FAOPS)], Program p,230, Seoul, Korea, (October 2006)
その他(国際学会)	○ T Kudo, M Kawashima, S Shibata, [Influence of cholic acid containing diet on circadian cell cycle regulation in mouse liver], [Gordon Research Conferences Chronobiology], Program p,5, Newport, USA, (August 2005)
その他(国際学会)	○ T Kudo, S Shibata, [Night time restricted feeding normalizes clock gene and <i>Pai-I</i> gene expression in the db/db mouse liver], [1 st World Congress of Chronobiology], Sapporo, Japan (September 2004)
その他 (国際学会・講演)	2 件
その他 (国際会議・ポスター)	1 件
その他 (講演)	3 件
その他 (ポスター)	9 件