

平成30年6月20日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04849

研究課題名(和文)末梢臓器における概日リズムの変調と代謝調節障害

研究課題名(英文)Peripheral Circadian Dysregulation and Metabolic Disorders

研究代表者

谷澤 幸生 (TANIZAWA, Yukio)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00217142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体には時計が備わっている。その本体は時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群で、フィードバックループを形成して、ほぼ24時間のリズムで周期的に増減を繰り返すとともに、下流の遺伝子の発現を調整して体内リズムを形成する。生体リズムは糖代謝を含む代謝の調節にも重要な役割を担い、その異常は糖尿病の原因となり得る。私たちは時計遺伝子の中でも、DBP/E4BP4という互いに逆の作用を持つ2つの遺伝子が糖代謝調節に重要であり、その異常は著しいインスリン分泌障害と血糖の上昇を来すことをマウスモデルで明らかにした。また、そのメカニズムを解明した。加えて、肝臓での代謝調節にも重要な役割を演じることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We all have biological clock inside the body. Biological clock is composed of clock genes, which have feedback loop of expression regulation, and make 24-hours circadian expression rhythm. Clocks regulate many biological processes including metabolism. Dysregulation of the biological clock causes many disease processes including metabolic disorders, such as diabetes mellitus. We found that DBP and E4BP4, which are reciprocally expressed and regulate the same set of target genes, play crucial role among clock genes. Abnormalities in this system cause severe insulin secretory defects and diabetes in a mouse model. In addition, those genes appear to be important in the regulation of liver metabolism.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：体内時計 糖尿病 糖代謝 インスリン分泌 E4BP4 DBP サーカディアンリズム

1. 研究開始当初の背景

生体リズムは生物の基本的形質であり、その根幹である時計遺伝子の発現リズムの障害は老化に伴う糖尿病、高血圧、癌など様々な疾患の発症・進展に関与する。体内時計と摂食には密接な関係があり、この関係の破綻が、肥満や糖尿病の要因になりうるということがわかってきた。多くの研究が、シフトワークは肥満や糖尿病のリスクファクターになることを示し、マウスでも同様の事象が観察される。つまり、体内時計の周期に合致しない明暗環境やリズム形成は、体内時計を不調にし、摂食行動のパターンを異常にし、結果的に肥満・糖尿病の発症・進展につながる。

生体の概日リズムの本体は時計遺伝子の振動である。脳(視床下部)の視交叉上核に概日リズムの中核が存在し、光刺激の情報を受けて視交叉上核のリズムが微調整され、それに同調するように各組織に存在する体内時計が制御される。

一方、肝臓や脂肪細胞のようなエネルギー代謝に関わる臓器では、時計遺伝子の発現の振幅は視交叉上核よりむしろ大きい。興味深いことに、それらの臓器では視交叉上核からのシグナルに加えて、摂食に大きな影響を受ける。通常夜間摂食するマウスに強制的に昼間摂食させると、視交叉上核での時計遺伝子発現は変化しないが、肝臓では位相が全く逆転してしまう。エネルギー代謝(エネルギーチャージ)が、その末梢臓器での時計遺伝子の発現リズムを変えてしまうのである。このことは、体内時計とエネルギー代謝調節との関わりをさらに強く示唆する。

我々は独自に、インスリン産生組織である膵ランゲルハンス氏島(ラ氏島)における時計遺伝子の振幅が非常に大きく、かつ、摂食の周期にその位相が同調することを見いだした(図3)。肝臓での解析に関する既報と照ら

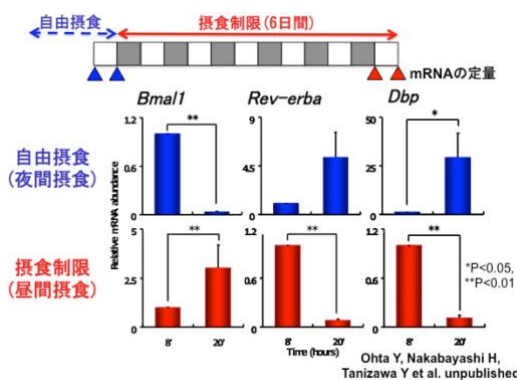


図3. 摂食制限により膵ラ氏島での時計遺伝子の発現パターンは逆転するし合わせると、膵ラ氏島と肝臓の時計遺伝子の振幅は同程度であり他の組織と比べて非常に大きい。また、その位相は全く同じであることがわかった。以上のことから、膵、肝における末梢時計遺伝子の変動は、代謝と密接に関連し、大きな生理的意義を持つことは間違いない。事実、core clock gene (*Clock* や *Bmal1*)の全身ノックアウトマウスでは肥満や耐糖能障害を来し、膵、肝について臓器別

ノックアウトでは、膵臓ではβ細胞機能不全(インスリン分泌低下と増殖能の低下)、肝臓ではグリコーゲン含量の低下、糖新生の低下を認めることが報告されている。概日リズムの異常が最終的に膵臓、肝臓、そして全身における糖代謝の変化(異常)につながるということは間違いないが、core clock gene から糖代謝へつながる経路はほとんどブラックボックスのままである。core clock gene は時計遺伝子ネットワークの構築には重要であるが、時計遺伝子以外の、代謝に影響を与える分子を直接発現制御しているわけではない。必ずcore clock gene と糖代謝制御分子の間をつなぐ分子があるはずであるが、十分解明されていないかった。

2. 研究の目的

概日リズム形成を司る時計遺伝子は、概日周期の中核である視交叉上核のみならず、肝臓や膵臓、骨格筋、脂肪組織といった代謝臓器を含め、ほぼ全ての臓器、細胞で発現される。

我々は、独自に開発した糖尿病モデルマウスである *Wfs1* ノックアウトマウスの膵ランゲルハンス氏島での時計遺伝子発現の解析から、時計関連遺伝子である *Dbp* および *E4bp4* の発現が大きく変化していることを発見した。そこで、このふたつの遺伝子が core clock gene と糖代謝を結びつける鍵ではないかとの仮説を立て、検証することにした。

本研究ではこの仮説のもとに、遺伝子改変マウスを用いて糖代謝に重要な個々の臓器(膵ランゲルハンス氏島、肝臓、骨格筋、脂肪組織)において、末梢の時計遺伝子が代謝上どのような役割を持つのか、個体としての代謝への影響は、そして、そのメカニズムは、という疑問に解答を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

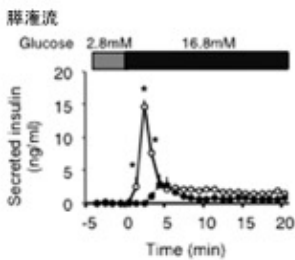
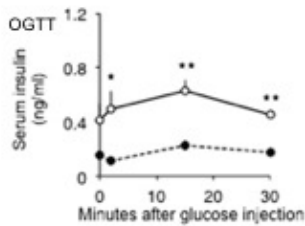
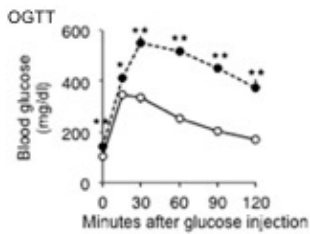
Dbp と *E4bp4* は時計関連遺伝子として core clock gene による発現調節を受ける。両者は互いに reciprocal に発現し、E4BP4 は発現抑制性の転写因子で、DBP は同じ標的配列を認識して発現促進に働く。そこで、組織特異的に E4BP4 を過剰発現すると、DBP の作用抑制が組織特異的に引き起こされることが期待される。そこで、E4BP4 組織特異的過剰発現トランスジェニックマウスを用い、DBP/E4BP4 の代謝組織での役割を解明することとした。

膵β細胞特異的 *E4bp4-TG* マウスとして、インスリンプロモーター下で E4BP4 を発現するマウス(MIP-*E4bp4* マウス)を作成し、全身の耐糖能とインスリン分泌能を解析した。インスリン分泌については、膵灌流、ならびに単離ランゲルハンス氏島を用いて詳細に検討した。また、ランゲルハンス氏島の組織学的変化や、遺伝子発現の変化を解析し、E4BP4 過剰発現による膵β細胞機能の変化とそのメカニズムを詳細に検討した。

肝における DBP/E4BP4 の役割は、ヒトアル

ブミンプロモーターを用いた *E4bp4*-TG マウス作成し、解析を進めた。さらに、マクロファージ特異的 *E4BP4* 過剰発現マウスを用いて、脂肪組織をはじめとするインスリン感受性臓器への影響を検討することとした。

4. 研究成果

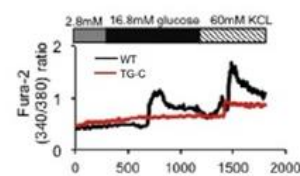
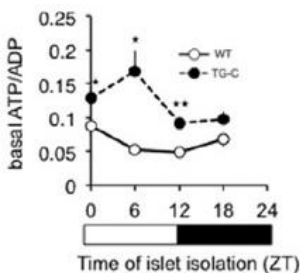


これによりグルコース刺激時の ATP/ADP 比及び細胞内カルシウムの上昇が阻害されていると考えられた。また、野生型 (WT) マウスの膵ラ氏島では、摂食時間に向けて *Glut2*(*Slc2a2*), *Ins1*, *Ins2*, *Rab37* といった、インスリン分泌に必要な遺伝子発現が増加するが、*MIP-E4BP4* マウスではこの増加が認められなかった。これらの日内変動は、インスリン分泌に必要な分子の発現を摂食時間(暗期、

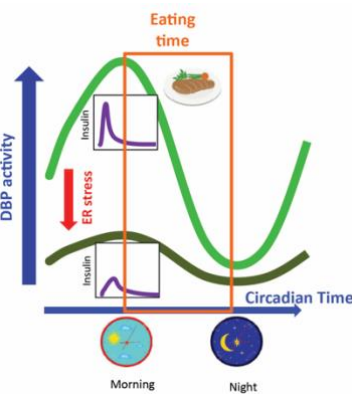
活動期)にむけて増加させている、と考えれば合目的である。この日内変動は DBP シグナルの変動に一致しており、すなわち、時計遺伝子は DBP シグナルをとおして、インスリン分泌を合目的的に調節していると考えられる。

今回糖尿病モデルとして用いた *Wfs1* ノックアウトマウスの膵島では、DBP の発現が低下し、*E4BP4* の発現が増強していた。このマウスのベータ細胞不全には小胞体ストレスが

膵β細胞特異的に過剰発現された *E4BP4* により恒常的に DBP シグナルが抑制される *MIP-E4bp4* マウスは、顕著なインスリン分泌不全を伴う耐糖能障害を呈した。*MIP-E4bp4* マウスの膵ラ氏島では、グルコース刺激による細胞内カルシウムの上昇とそれに伴うインスリン分泌が障害されていた。ATP/ADP 比の概日変化が消失し、グルコース刺激前から ATP/ADP 比が高値であり、



関与することが知られているが、小胞体ストレスが DBP を抑制し、*E4BP4* を増加させることを見出した。2型糖尿病患者を含めて糖



尿病のβ細胞では、小胞体ストレスが亢進していることが知られており、これによる DBP/*E4BP4* の発現変化が小胞体ストレスによるβ細胞不全の少なくとも一部を説明する可能性

がある。

さらに我々は、DBP シグナルの抑制による肝での糖脂質代謝の変化を明らかにするため、肝細胞特異的 *E4BP4* 過剰発現 (*MAP-E4bp4*) マウスを作成した。通常食下でインスリン負荷試験を行ったところ、*MAP-E4bp4* マウスにおいて顕著な糖産生抑制不全、インスリン抵抗性増大が認められた。血中遊離脂肪酸は、WT、*MAP-E4bp4* マウスともに非活動時間帯の ZT4 で最大となり、時間経過とともに徐々に低下し、活動時間帯の ZT16 で最小となる。ZT16 での血中遊離脂肪酸は *MAP-E4bp4* マウスで有意に高値であった。また、血中トリグリセリドも ZT12 において *MAP-E4bp4* マウスで有意に高値であった。活動時間帯 (ZT16~20) における呼吸商は WT と *MAP-E4bp4* 有意差は認められなかったが、非活動時間帯 (ZT4~8) では、*MAP-E4bp4* マウスで有意に高値であった。これらの解析結果から、WT マウスは非摂食時間帯に脂質をエネルギーとして利用するのに対し、TG-C マウスでは脂質利用障害があることが示唆された。

以上より、膵β細胞における DBP シグナルの低下はインスリン分泌不全を、肝細胞における DBP シグナルの低下はインスリンによる肝糖産性の抑制の破綻をきたすことが示唆された。このインスリン抵抗性には脂質代謝障害が大きく関与している可能性があり、現在、検討を進めている。

我々はマクロファージ特異的に *E4BP4* を過剰発現する TG マウスも既に作成し、その表現型の解析に着手している。

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 6 件)

1. Taguchi A., Ohta Y., Tanizawa Y.; Molecular clock as a regulator of β-cell function. *J Diabetes Investig.* 2018 Mar 15. doi: 10.1111/jdi.12835. [Epub ahead of print] (査読あり)

2. Kondo M, Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Morii T, Takahashi H, Seino S, Yamada Y, Tanizawa Y. Activation of GLP-1 receptor signaling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome *Diabetologia* 2018 in press (査読あり)
3. 太田康晴, 谷澤幸生 インスリン抵抗性研究の最前線—肝におけるインスリン抵抗性— 最新医学 Vol. 73, No. 1 (別冊 特集 糖尿病治療の最前線) 最新医学社 24-29, 2018, Jan. (査読なし)
4. Tanabe K., Amo-Shiinoki K., Hatanaka M., Tanizawa Y.. Interorgan Crosstalk Contributing to β -Cell Dysfunction. *J Diabetes Res.* vol. 2017, Article ID 3605178, 8 pages, 2017. doi: 10.1155/2017/3605178. Review. (査読あり)
5. Ohta Y., Taguchi A., Matsumura T., Nakabayashi H., Akiyama M., Yamamoto K., Fujimoto R., Suetomi R., Yanai A., Shinoda K., Tanizawa Y.. Clock Gene Dysregulation Induced by Chronic ER Stress Disrupts β -cell Function. *EBioMedicine.* 2017 Apr;18:146-156. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.040. (査読あり)
6. Hatanaka M., Anderson-Baucum E., Lakhter A., Kono T., Maier B., Tersey SA., Tanizawa Y., Evans-Molina C., Mirmira RG., Sims EK. Chronic high fat feeding restricts islet mRNA translation initiation independently of ER stress via DNA damage and p53 activation. *Sci Rep.* 2017 Jun 19;7(1):3758. doi: 10.1038/s41598-017-03869-5. (査読あり)
3. 椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 西村涉, 佐藤吉彦, 駒津光久, 増谷弘, 谷澤幸生 Wolfram 症候群をモデルとした細胞内ストレスによる膵 β 細胞可塑性制御の解明 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 30 年 5 月 24 日、25 日、26 日 東京国際フォーラム他 (東京) 抄録集 p. 132
4. 松村卓郎, 太田康晴, 田口昭彦, 福田尚文, 柳井章江, 水上洋一, 秋山優, 末富吏佐, 山本薫, 藤本留理子, 神吉けい太, 汐田剛史, 篠田晃, 谷澤幸生 肝における出力系時計遺伝子 DBP/E4BP4 によるエネルギー代謝調節 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成 30 年 5 月 24 日、25 日、26 日東京)
5. 田部勝也, 椎木幾久子, 幡中雅行, 谷澤幸生 Wolfram 症候群において β 細胞脱分化は糖尿病の成因として重要である 第 32 回日本糖尿病合併症学会 (平成 29 年 10 月 27 日、28 日、29 日東京) 抄録集 P 137
6. 松村卓郎, 太田康晴, 田口昭彦, 谷澤幸生, 福田尚文, 藤本留理子, 山本 薫, 神吉けい太, 汐田剛史 時計遺伝子 DBP, E4BP4 の機能異常と肝インスリン抵抗性 第 32 回日本糖尿病合併症学会 (平成 29 年 10 月 27 日、28 日、29 日東京)

[学会発表] (計 28 件)

1. Tanizawa Y. Medical and Genetic alleviation of cellular stress restore β -cell function in Wolfram syndrome. 7th International Workshop on Wolfram Syndrome Paris, June 11-12, 2018.
2. 太田康晴, 田口昭彦, 松村卓郎, 福田尚文, 山本薫, 柳井章江, 秋山優, 藤本留理子, 神吉けい太, 汐田剛史, 水上洋一, 篠田晃, 谷澤幸生 シンポジウム時間生物学からみた生活習慣病の病態: Circadian Dysregulation によるインスリン分泌不全と肝インスリン抵抗性 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成 30 年 5 月 24 日、25 日、26 日東京)
7. Shinoki K., Tanabe K., Hatanaka M., Harano R., Masutani H., Tanizawa Y. Genetic Deficiency of TXNIP Prevents Diabetes Progression in the Mouse Model of Wolfram Syndrome. 77th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Abstract P289), Jun 9-13, 2017, San Diego, CA, USA.
8. 太田康晴, 松村卓郎, 田口昭彦, 福田尚文, 秋山 優, 藤本留理子, 神吉けい太, 汐田剛史, 谷澤幸生 Circadian Dysregulation と肝インス

- リン抵抗性 第 60 回日本糖尿病学会
年次学術集会 (平成 29 年 5 月 18 日、
19 日、20 日 名古屋市)
9. 椎木幾久子、田部勝也、幡中雅行、近藤 学、西村 涉、木村徳宏、星井嘉信、池田栄二、水上浩哉、八木橋操六、佐藤吉彦、駒津光久、谷澤幸生ヒトの糖尿病において β 細胞脱分化は β 細胞不全に関連する 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成 29 年 5 月 18 日、19 日、20 日 名古屋市)
 10. 田部勝也、椎木幾久子、幡中雅行、谷澤幸生 Wolfram 症候群のモデルマウスでは β 細胞脱分化を来す 第 90 回日本内分泌学会学術総会 (平成 29 年 4 月 21 日、21 日、22 日 京都市)
 11. 太田康晴、田口昭彦、松村卓郎、中林容子、秋山 優、藤本留理子、末富吏佐、山本 薫、谷澤幸生 DBP シグナルを介した時計遺伝子によるインスリン分泌調節機構 第 90 回日本内分泌学会学術総会 (平成 29 年 4 月 21 日、21 日、22 日 京都市)
 12. Ohta Y., Tanizawa Y.. Clock gene dysregulation induced by chronic endoplasmic reticulum stress disrupts β -cell function. The 11TH IDF-WPR Congress & 8TH AASD Scientific Meeting. 27-30 October, 2016, Taipei International Convention Center Taipei, Taiwan.
 13. 松村卓郎、太田康晴、谷澤幸生 肝細胞特異的 E4BP4 過剰発現マウスを用いた時計遺伝子を介する新たな肝臓の糖代謝調節機構の解明 第 37 回日本肥満学会 (平成 28 年 10 月 7 日、8 日 東京)
 14. Ohta Y., Taguchi A., Matsumura T., Nakabayashi H., Akiyama M., Suetomi R., Yanai A., Shinoda K., Tanizawa Y.. Clock gene dysregulation induced by chronic ER stress disrupts β -cell function. The Islet Study Group Meeting 2016 (Abstract P17), Sep.16-18, 2016, Riessersee Hotel Resort, Garmisch-Partenkirchen, Germany.
 15. Tanizawa Y.. De-differentiation is another pathway of the β -cell failure in Wolfram Syndrome. 6th International Workshop on Wolfram Syndrome. June 27-28. 2016, Vannes, France.
 16. Shinoki K., Tanabe K., Hatanaka M., Kondo M., Tanizawa Y.. Beta-cell Dedifferentiation Plays a Central Role in Beta-Cell Failure in a Model of Wolfram Syndrome. 76th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Abstract P282), June 10 - 14, 2016, New Orleans, LA, USA.
 17. 田部勝也、椎木幾久子、幡中雅行、谷澤幸生 β cell dedifferentiation plays a central role in β cell failure in a model of Wolfram syndrome シンポジウム (S15-3) 膝島のバイオロジー Current Topics of Islet Biology 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成 28 年 5 月 19 日、20 日、21 日京都市)
 18. 椎木幾久子、田部勝也、幡中雅行、近藤 学、谷澤幸生 *Wfs1* 欠損マウスにおける β 細胞脱分化とその意義の解明 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成 28 年 5 月 19 日、20 日、21 日京都市)
 19. 松村卓郎、太田康晴、田口昭彦、中林容子、秋山 優、末富吏佐、山本 薫、谷澤幸生、神吉けい太、汐田剛史、福田尚文 肝細胞特異的 E4BP4 過剰発現マウスを用いた時計遺伝子を介する新たな肝臓の糖代謝調節機構の解明 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成 28 年 5 月 19 日、20 日、21 日京都市)
 20. 太田康晴、田口昭彦、松村卓郎、中林容子、秋山 優、末富吏佐、谷澤幸生 DBP シグナルによるインスリン分泌調節機構の解明 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成 28 年 5 月 19 日、20 日、21 日 京都市)

21. 松村卓郎、太田康晴、田口昭彦、中林容子、秋山 優、末富吏佐、山本 薫、谷澤幸生 膵β細胞におけるDBPシグナルはfirst meal摂取時の鋭敏なインスリン分泌にとって重要である 第89回日本内分泌学会学術総会(平成28年4月21日、22日、23日 京都市)
22. 椎木幾久子、田部勝也、幡中雅行、香川正太、秋山 優、谷澤幸生 Wfs1欠損マウスにおける膵β細胞脱分化とその意義の解明 第27回分子糖尿病シンポジウム(平成27年12月5日 東京)
23. Shinoki K., Tanabe K., Hatanaka M., Tanizawa Y. Wfs1-Deficiency Causes Beta-Cell Dedifferentiation Associated with Enhanced ER Stress and Oxidative Stress, Independently of Hyperglycemia. 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meeting of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction November 21-22, 2015, Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong, China.
24. Akiyama M., Suetomi R., Ohta Y., Nakabayashi H., Kondo M., Tanabe K., Tanizawa Y. Adrenomedullin Has a Cytoprotective Role in Pancreatic β-Cells Against ER Stress. 75th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Abstract 2266-P), June 5 - 9, 2015, Boston, MA, USA.
25. Shinoki K., Tanabe K., Hatanaka M., Ohta Y., Tanizawa Y. Wfs1 Deficiency Causes Beta-Cell Dedifferentiation Associated with Enhanced ER Stress and Oxidative Stress, Independently of Hyperglycemia. 75th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Abstract 2259-P), June 5 - 9, 2015, Boston, MA, USA.
26. 椎木幾久子、田部勝也、幡中雅行、永尾優子、太田康晴、谷澤幸生 WFS1欠損膵島における膵β細胞脱分化機構の解析 第58回日本糖尿病学会年次学術集会(平成27年5月21日、2

2日、23日、24日下関市)

27. 松村卓郎、太田康晴、田口昭彦、中林容子、秋山 優、末富吏佐、谷澤幸生 DBPシグナルはグルコース応答性のインスリン分泌とりわけfirst meal摂取時のインスリン分泌にとって重要である 第58回日本糖尿病学会年次学術集会(平成27年5月21日、22日、23日、24日下関市)
28. Ohta Y., Taguchi A., Akiyama M., Nakabayashi H., Suetomi R., Yanai A., Shinoda K., Tanizawa Y. DBP/E4BP4 plays a pivotal role in circadian regulation of β-cell function. 16th Servier-IGIS(International Group on Insulin Secretion) symposium (Abstract P 32) April 9-11, 2015, St. Jean Cap Ferrat, France

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷澤 幸生 (TANIZAWA, Yukio)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00217142

(2) 研究分担者

太田 康晴 (OHTA, Yasuharu)
山口大学・医学部・准教授(寄附講座等)
研究者番号：60448280

田部 勝也 (TANABE, Katsuya)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00397994

幡中 雅行 (HATANAKA, Masayuki)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60572534

秋山 優 (AKIYAMA, Masaru)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90717547