

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08594

研究課題名(和文)末梢体内時計障害の病態生理学的意義の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology and treatment strategies of peripheral clock disruption

研究代表者

安藤 仁 (ANDO, Hitoshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50382875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計は糖・脂質代謝など様々な生理機能の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが、臓器特異的時計遺伝子欠損マウスの解析などにより示唆されている。しかし、正常に機能する体内時計が障害された場合の影響、特に肝や脂肪組織などの末梢時計障害の影響は、十分に解明されていない。本研究では、正常マウスを用い、照明条件あるいは給餌時刻を変更することにより、全身性および末梢特異的体内時計障害モデルをそれぞれ開発した。両モデルとも摂餌量は低下するにもかかわらず体重への影響は認めず、前者では耐糖能の悪化も認められた。このことより、中枢時計と末梢時計はどちらも代謝の調節に重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The results of studies using tissue-specific clock gene knock out mice etc. suggest that circadian clocks play a significant role in maintaining homeostasis of various physiological functions including glucose and lipid metabolisms. However, it remains to be seen what happens if circadian clocks (in particular, peripheral clocks) are disrupted in bodies with innately intact clocks. In this study, we've developed the models of systemic and peripheral tissues-specific disruption of circadian clocks by changing the light/dark cycle or feeding time, respectively, using normal mice. Consequently, decreased food intake without change in body weight was found in both the models, and impaired glucose tolerance was seen in the systemic model. These results suggest that both central and peripheral clocks play an important role in regulating metabolisms.

研究分野：応用薬理学 内分泌代謝学 時間生物学

キーワード：体内時計 概日リズム 時計遺伝子 生活習慣病 糖尿病 肥満

### 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。近年、概日リズムの発振機構が解明され、その本体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であり、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ことが判明した。

また、体内時計の障害が2型糖尿病をはじめとする生活習慣病の一因であることも明らかになってきた。疫学研究では、交替勤務者は肥満、糖尿病、高血圧を発症しやすいことが示され、動物においても、時計遺伝子を欠損したマウスは、生活習慣病を発症しやすいことが報告された。興味深いことに、肝特異的、脾特異的に時計遺伝子を欠損させたマウスでは、肝細胞からの糖放出や膵細胞からのインスリン分泌がそれぞれ障害されており、末梢時計の重要性も示唆されるようになった。

不規則な生活を送らざるを得ない交替勤務者では、睡眠・覚醒リズムの制御にも関与する中枢時計の乱れは不可避である。一方、中枢時計が乱れたままでも末梢時計を整えることは可能であるため、もしも末梢時計が生活習慣病の発症に重要であるならば、末梢時計は生活習慣病を予防・治療するための新たな標的となり得る。

しかし、現在のところ、末梢時計特異的な障害モデルは“体内時計がもともと機能しない”遺伝子改変マウスしかなく、交替勤務者のように“正常に機能する体内時計”を有している場合に末梢時計が乱れる影響は不明である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究は、正常マウスを用い、照明条件を変更することにより全身性に体内時計を障害するモデルと、給餌時刻を変更することにより末梢時計特異的に体内時計を障害するモデルを開発、比較検討し、末梢時計の病態生理学的意義を解明することを第一の目的とした。また、それらのモデルに末梢時計制御薬を投与し、末梢時計障害を治療することにより生活習慣病の予防・治療が可能か否かを明らかにすることを最終目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 全身性体内時計障害モデルの開発

すべての動物実験は、自治医科大学動物実験委員会または金沢大学動物実験委員会の審査を経て、各大学の学長の許可のもと、関連法令等を遵守して実施した。

雄性 C57BL/6J マウス(日本チャールスリバーより購入)および雄性肝特異的 *Bmal1* 欠損 (*L-Bmal1<sup>-/-</sup>*) マウス(自家繁殖)を 12:

12 時間明暗周期、標準飼料(通常食)自由摂餌・自由飲水下で飼育し、6 週齢時に次の 2 群に分け、体重の推移を 12 週齢時まで観察した:

対照群 12:12 時間明暗周期を継続

全身性障害群 3:3 時間明暗周期に変更  
8 週齢時および 12 週齢時にはブドウ糖負荷試験により耐糖能を評価し、12 週齢時には血清および臓器のサンプリングも行った。また、一部のマウスには照明条件の変更とともに高脂肪高シヨ糖食を負荷し、同様の検討を行った。

さらに、別のマウスには、同様の実験を 20 週齢から開始し、26 週まで観察した。

#### (2) 末梢特異的体内時計障害モデルの開発

雄性 C57BL/6J マウスを 12:12 時間明暗周期、標準飼料自由摂餌・自由飲水下で飼育し、6 週齢時に次の 2 群に分け、体重、食後血糖の推移を 12 週齢時まで観察した:

対照群 自由摂餌を継続

末梢性障害群 4 時間給餌:16 時間絶食の給餌周期に変更

#### (3) 統計解析

統計解析には IBM SPSS Statistics (ver. 24) を使用した。2 群間の連続データの比較には反復測定分散分析を用い、同一測定時点のデータの比較には *t* 検定を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 全身性体内時計障害モデルの開発と解析

照明条件を通常の 12:12 時間明暗周期から 3:3 時間明暗周期に変更することにより、いわゆる“時差ぼけ”を慢性的に呈するマウスモデルを作製した。このモデルマウスでは、6 週間後の同一時刻に測定した時計遺伝子の mRNA 発現量が各マウスで著しく異なっており、光刺激が同調因子として作用していないことが確認された(図 1)。

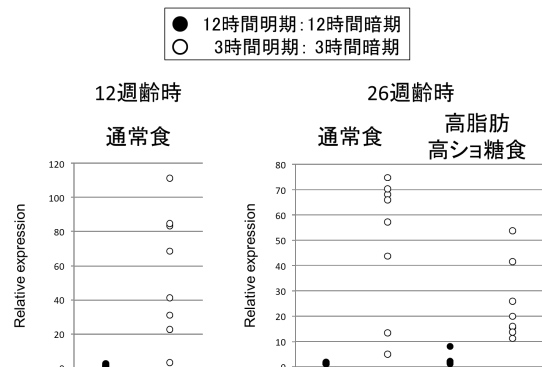


図 1. 照明条件変更 6 週後の肝における *Dbp* mRNA 量

このモデルの作製を 6 週齢時から開始したところ、観察期間全体では統計学的に有意な体重への影響を認めなかったが、初めの 2 週間は体内時計障害群で有意に体重が増加し

た(図2)。一方、観察期間中の摂餌量は、体内時計障害群ではむしろ少ない傾向を認めた。

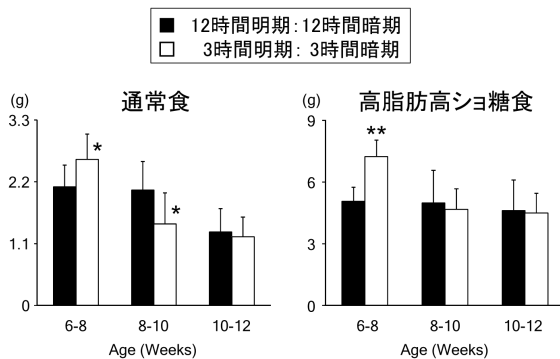


図2. 体重の推移(2週間ごとの変化量)

Data represent the mean + SD of 8 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

また、耐糖能を検討したところ、体内時計障害群では照明条件変更2週間後に空腹時からの有意な血糖上昇を認めたが、6週間後にはその影響は消失していた(図3)。また、高脂肪高シヨ糖食を投与した場合にも、同様の結果が得られた(図4)。

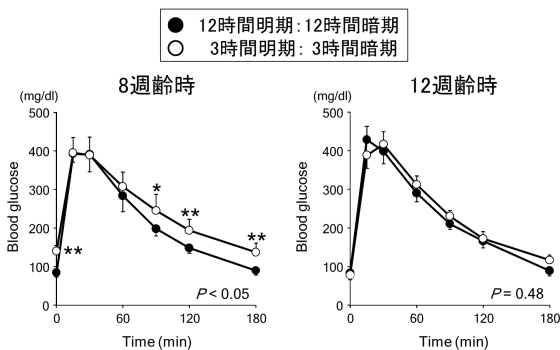


図3. 耐糖能への影響(ipGTT) 通常食

Data represent the mean & SD of 8 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

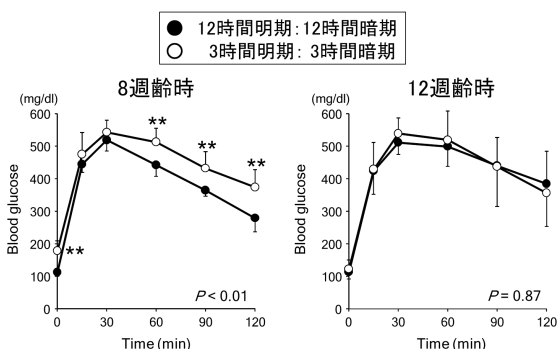


図4. 耐糖能への影響 高脂肪高シヨ糖食

Data represent the mean & SD of 8 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

次に、モデルの作製を20週齢時から行ったところ、若齢から開始した場合は異なり、作製開始直後にも体重増加は認めなかった(図5)。また、摂餌量は有意に減少していた。

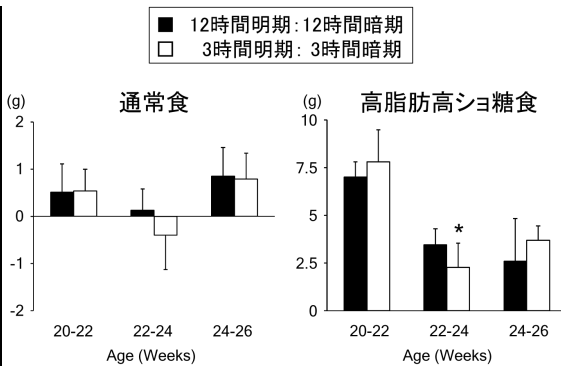


図5. 体重の推移(2週間ごとの変化量)

Data represent the mean + SD of 8 mice. \* $P < 0.05$ .

耐糖能に関しては、通常食と高脂肪高シヨ糖食のいずれの場合も、体内時計障害群では照明条件変更2週間後に有意な耐糖能の悪化を認めた(図6)。この影響は少なくとも通常食下では6週間も持続しており、体内時計障害群の空腹時血糖は有意に大であった( $91.3 \pm 11.1$  vs.  $112.9 \pm 24.5$  mg/dl,  $P < 0.05$ )。

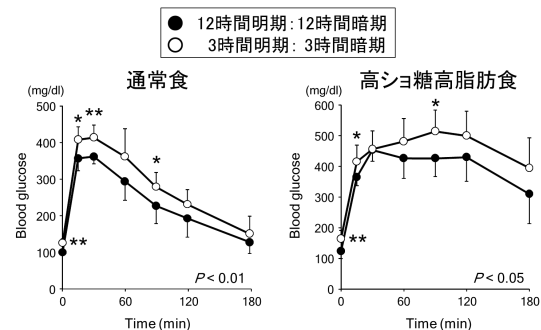


図6. 耐糖能への影響 22週齢時

Data represent the mean & SD of 8 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

肝は糖代謝を担う主要な臓器であることから、本モデルの耐糖能悪化の主座は肝の体内時計にある可能性がある。そこで次に、肝特異的体内時計欠損 *L-Bmal1<sup>-/-</sup>* マウスを用いて同様の検討を行ったところ、このマウスでは有意な耐糖能の悪化は認められなかった(図7)。

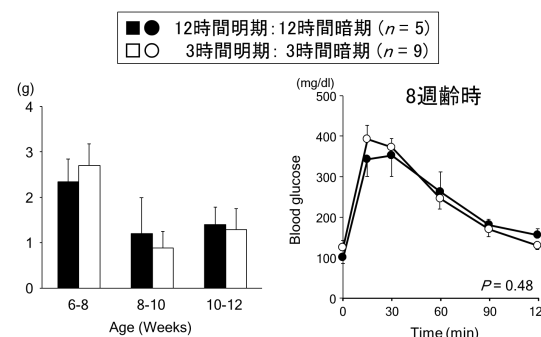


図7. *L-Bmal1<sup>-/-</sup>* マウスにおける照明条件変更の体重および耐糖能への影響

Data represent the mean & SD.

以上のように、体内時計が明暗周期と同調できないために、若齢では体重増加を伴った一過性の耐糖能悪化をきたし、成熟後には体重増加を伴わずに耐糖能悪化が持続するモデルを開発した。肝特異的体内時計欠損マウスではこの影響が減弱することから、少なくとも一部には肝の体内時計障害により耐糖能悪化をきたすことが示唆された。

## (2)末梢特異的体内時計障害モデルの開発と解析

中枢時計は光刺激により時刻がセットされる一方、末梢時計は光刺激よりも摂餌刺激の影響を強く受けることが知られている。また、体内時計は1日20時間の短い周期には同調できないことも示されている。そこで、給餌を20時間ごとに行うことにより、末梢時計のみを障害するモデルの作製を試みた。

この時刻制限給餌を6週齢より15週間負荷し、体重および血糖値の推移を観察したところ、自由摂餌を継続した対照群と比し、明らかな差異は認められず(図8)、21週齢時の空腹時血糖も同等であった(対照群  $101.2 \pm 20.0$  vs. 末梢性障害群  $101.3 \pm 7.4$  mg/dl)。

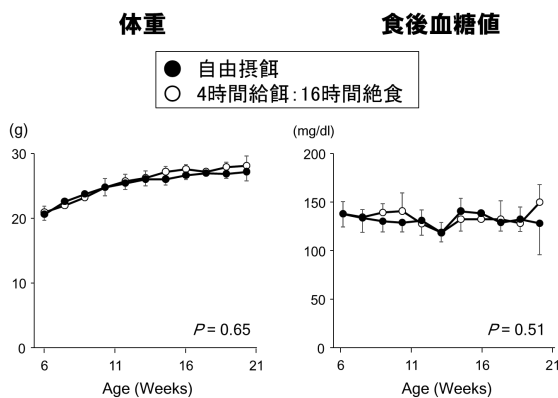


図8. 体重および血糖値の推移

Data represent the mean & SD of 6 mice.

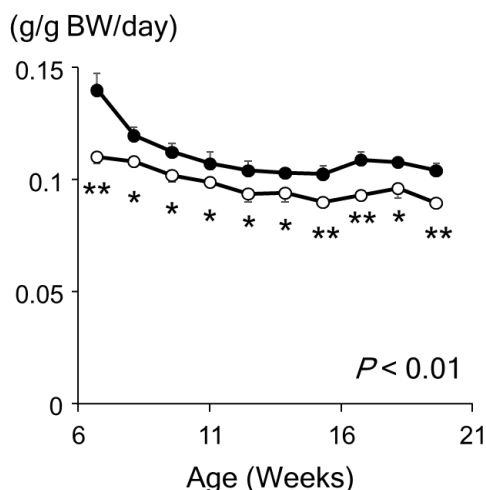


図9. 摂餌量の推移

自由摂餌, ○ 4時間給餌:16時間絶食.  
Data represent the mean & SD of 3 cages.  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

一方、摂餌量に関しては、時刻制限給餌開始時より観察期間終了まで一貫して対照群よりも有意に少なかった(図9)。この摂餌量の減少は全身性体内時計障害モデルでも認められており、これらのモデルではともにエネルギー代謝が低下している可能性がある。今後は自発行動量や消費熱量の測定を行い、摂餌量が低下するにもかかわらず、体重が減少しない機序を明らかにするとともに、高カロリー(高脂肪高シヨ糖食)摂取時の代謝への影響も検討し、本モデルも確立させる予定である。また、*L-Bmal1<sup>-/-</sup>*マウスを用いて本モデルを作製した場合の影響や、本モデルに末梢時計制御薬を投与した場合のエネルギー代謝への影響を検討し、末梢体内時計の病態生理学的意義をさらに明らかにしたい。

本研究により、正常に機能する体内時計を有するマウスにおいても、体内時計の障害は代謝異常をもたらすことが判明した。今回開発した体内時計障害モデルは、体内時計障害と代謝異常との関連を解明する上で有用であると期待される。

## 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4件)

Kapse S, Ando H, Fujiwara Y, Suzuki C, Ushijima K, Kitamura H, Hosohata K, Kotani K, Shimba S, Fujimura A. Effect of a dosing-time on quetiapine-induced acute hyperglycemia in mice. *J Pharmacol Sci.* 133(3):139-45, 2017. 査読あり.

doi: 10.1016/j.jphs.2017.02.008.

Ando H, Ushijima K, Shimba S, Fujimura A. Daily Fasting Blood Glucose Rhythm in Male Mice: A Role of the Circadian Clock in the Liver. *Endocrinology.* 157(2):463-9, 2016. 査読あり.

doi: 10.1210/en.2015-1376. 安藤 仁. 食べ方と肥満: 体内時計の観点から. *Pharma Medica.* 34:17-20, 2016. 査読なし.

安藤 仁. 体内時計障害と2型糖尿病. *Animus.* 88:25-8, 2016. 査読なし.

### [学会発表](計1件)

安藤 仁. 体内時計を標的とした生活習慣病の予防・治療法の開発に向けて. 第90回日本内分泌学会学術総会, 2017.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安藤 仁 (ANDO, Hitoshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 50382875

(2)研究分担者

なし

(3)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

簗 俊成 (TAKAMURA, Toshinari)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00324111

(4)研究協力者

なし