

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770060

研究課題名（和文） 核内受容体を介した体内時計の制御機構の解明

研究課題名（英文） Research of circadian clock regulation based on nuclear receptors

研究代表者

大石 勝隆（OISHI KATSUTAKA）

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：50338688

研究成果の概要（和文）：核内受容体 PPAR α （ α 型ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体）を介した体内時計の制御機構の解明を目指して研究を行った。炭水化物を制限したケトン体ダイエットを負荷した場合、PPAR α のリガンドであるフィブラートを投与した時と同様に、PPAR α の活性化と体内時計の位相前進が確認された。PPAR α の活性化に伴い、肝臓において FGF21 の時刻依存的な発現誘導が確認され、PPAR α の活性化に伴う体内時計の位相前進に、FGF21 が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Regulation mechanism of circadian clock by the activation of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α , a nuclear hormone receptor) was examined. Ketogenic diet activated the PPAR α and advanced the phase of circadian clock in mice. Hepatic FGF21 expression was induced by the PPAR α activation in a circadian phase-dependent manner. Rhythmic FGF21 induction might be involved in the regulation of circadian clock by PPAR α activation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物生理・行動

キーワード：体内時計、PPAR α 、フィブラート、FGF21、時計遺伝子、概日リズム

1. 研究開始当初の背景

社会の 24 時間化に伴う生体リズムの攪乱は、うつ病などの精神疾患や、不眠症や不登校、出社困難などの睡眠障害と深い関わりがあり、交通事故をはじめとした大小様々な産業事故の原因ともなっている。2006 年には、

日本大学の内山真教授により、睡眠障害による日本の経済的損失が、年間 3 兆 5 千億円であると試算されている。平成 20 年の国民健康・栄養調査結果によると、現代人の約 5 人に 1 人が睡眠に関する悩みを抱えているとされている。また、我が国における自殺者が

12年連続して3万人を超える状況の中で、約20%にあたる6千人がうつ病による自殺と報告されているが、体内時計の乱れによって引き起こされる概日（サーカディアン）リズム睡眠障害は、うつ病や神経症と深い関係があることもよく知られている。しかし、睡眠障害に対する代表的な治療法である抗うつ薬や精神安定剤の投薬には、連用による依存性や副作用など悪影響を及ぼすことも知られており、QOL向上のためには、副作用の少ない新たな治療法の開発が急務となっている。

2007年に申請者らは、高脂血症治療薬として広く用いられており、PPAR α （ α 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体）のリガンドであるフィブラートが、齧歯類において体内時計に作用し、活動リズムを前進させることを発見した。PPAR α リガンドによる体内時計の制御に関しては、申請者が世界に先駆けて発見した事象であり、国内はもちろん国外でもそれまでに報告は皆無であった。生物の活動リズムは、通常体内時計による制御よりも、外界の光による制御の方が強く働き、夜行性齧歯類では、昼間の光によって活動が強度に抑制される（マスクング）ことが知られている。それにもかかわらず、我々は、PPAR α のリガンドであるフィブラートを投与することにより、夜行性のマウスの活動時間帯が早まり、結果的に昼間の時間帯から活動を開始するようになることを発見した。このことは、PPAR α リガンドが、光による強度なりセット機構を上回る体内時計の位相調節因子として機能し得る可能性を示しており、体内時計に関する長い研究の歴史の中でも、新規で注目すべき発見であると考えられる。

2. 研究の目的

核内受容体 PPAR α を介した体内時計の制御機構を明らかにすることを目的とする。

- (1) ケトン体ダイエット負荷に伴う内在性の PPAR α の活性化が、時計遺伝子の日周発現および行動リズムに与える影響についてマウスを用いた検討を行う。
- (2) PPAR α の活性化に伴って、肝臓で発現が誘導される FGF21 について、その発現様式を検討する。

3. 研究の方法

- (1) ケトン体ダイエット負荷に伴う PPAR α の活性化が体内時計に与える影響

明暗 12:12 で飼育した ICR マウス(6~7 週齢、日本クレア)に、普通食 (CE-2、日本クレア)と AIN-93G (オリエンタル酵母)を改変したケトン体ダイエット(脂肪 73.9%、タンパク質 8.3%、炭水化物 0.73%、w/w)を自由に2週間摂取させた。

マウスの飲水行動をクロノバイオロジーキット(スタンフォードソフトウェアシステムズ)によって測定した。行動リズムを支配している内在性の時計の位相を調べる目的で、ケトン体ダイエット負荷から2週間後、マウスを恒暗条件下に移し、継続して飲水行動を測定した。

ケトン体ダイエット負荷から2週間後、深麻酔下にて4時間ごとに、全採血と組織の採取を行った。

ケトン体をはじめとした血液中の代謝パラメーターを測定した。

組織から RNA を抽出し、時計遺伝子および被時計制御遺伝子の発現量を調べた。

- (2) PPAR α の活性化に伴って、肝臓で発現が誘導される FGF21 について、その発現様式を検討する。

明暗 12:12 で飼育した ICR マウス(5~8 週齢、日本クレア)に、AIN-93M (オリエンタル酵母)および PPAR α のリガンドであるベザフィブラートを 0.5%w/w 混和した餌を自由に5日間摂取させた。肝臓を採取し、FGF21をはじめとした PPAR α の転写ターゲット遺伝子の時刻依存的な発現プロファイル調べた。

点灯から2時間後、および消灯から2時間後に、ベザフィブラートを 100 mg/kg BW 腹腔内に投与し、肝臓における FGF21 の発現誘導を比較した。

ベザフィブラートの投与による FGF21 の発現誘導が、PPAR α に依存していることを確認する目的で、PPAR α のノックアウトマウス (PPAR α KO マウス)にベザフィブラートを5日間慢性投与し、FGF21 の発現誘導を野生型マウスと比較した。

4. 研究成果

- (1) ケトン体ダイエット負荷に伴う PPAR α の活性化が体内時計に与える影響

明暗条件下におけるケトン体ダイエット負荷は、暗期後半の活動量を極端に減少させたものの、活動の開始時刻は消灯時刻に一致していた(図1)。しかしながら、マウスを明暗から恒暗条件下に移すことにより、活動開始時刻が6時間程度も前にシフトしていることが確認された。このことは、行動リズムを制御している内在性の時計が、ケトン体ダイエット負荷により、位相前進したことを示している。

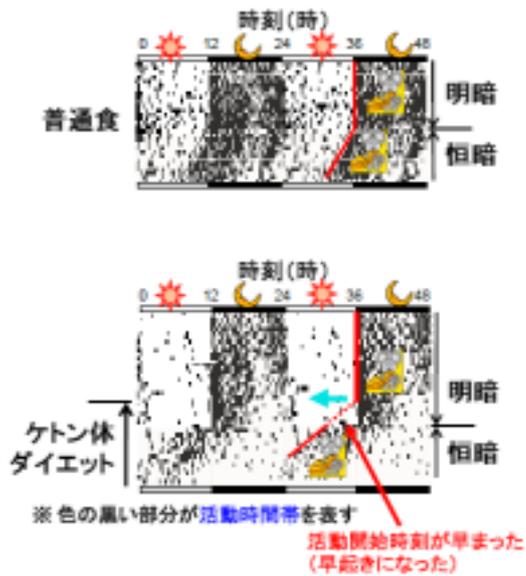


図 1. ケトン体ダイエット負荷による体内時計の位相前進。

血液中の代謝パラメーターの測定から、ケトン体ダイエットの2週間の摂取により、顕著な低血糖と高コレステロール、および総ケトン体の増加が認められた。

心臓、肝臓、腎臓および脂肪組織における時計遺伝子 *Per2* と被時計制御遺伝子 *DBP* の mRNA 発現を調べた。その結果、調べた全ての組織において、これらの遺伝子の発現リズムに位相前進が認められた (図 2)。

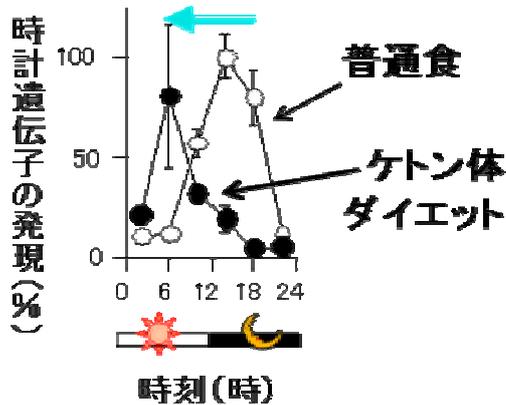


図 2. ケトン体ダイエット負荷により、腎臓での *Per2* 遺伝子の発現位相が顕著に前進した。

これらの結果を考え合わせると、ケトン体ダイエット負荷は、行動を司る体内時計や、様々な組織の末梢時計の位相を、明暗条件下においても前進させる可能性が示された。これまで申請者は、*PPARα* を活性化させるベザフィブ

ラトが、体内時計の位相を前進させることを報告してきたが、今回行ったケトン体ダイエット負荷によっても *PPARα* が顕著に活性化されることが知られており、*PPARα* の活性化が何らかの形で関与している可能性が考えられる。

- (2) *PPARα* の活性化に伴って、肝臓で発現が誘導される *FGF21* について、その発現様式を検討する。

ベザフィブラートを餌に混ぜ、5日間自由に摂餌させ、肝臓における *FGF21* 遺伝子の発現を調べた。その結果、*FGF21* 遺伝子の発現誘導には、暗期後半から明期前半にかけてピークとなる時刻依存性が認められた (図 3)。

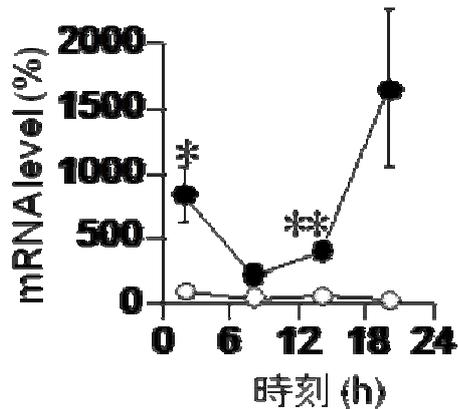


図 3. ベザフィブレート慢性投与により、*FGF21* 遺伝子の発現量は時刻依存的に誘導された。

ベザフィブレートによる時刻依存的な *FGF21* の発現誘導が、*PPARα* の感受性などの内在性の時計制御に依存したものが、それとも、摂食リズムに起因したものであるのかを調べる目的で、点灯直後と消灯直後にベザフィブラートを腹腔内投与し、*FGF21* 遺伝子の発現誘導を比較した。興味深いことに、*FGF21* mRNA の発現誘導は、消灯直後に投与した場合において顕著であり、ベザフィブレートに対する応答性に時刻依存性が存在することが示された。

ベザフィブレートは、*PPARα* 以外にも *PPARβ* や *PPARγ* の活性化も誘導することが知られており、今回得られた知見が、*PPARα* の活性化を介していることを検証する目的で、*PPARα* KO マウスを用いた検討を行った。ベザフィブラートを5日間餌に混和して慢性投与し、昼夜で肝臓における *FGF21* mRNA の発現量を調べたところ、野生型マウスでは、前述したように、夜間に高い発現誘導を示した一方で、*PPARα* KO マウスにおいては、昼夜ともに *FGF21* の発現誘導は認められなかった。この結果は、ベザフ

イブラートが PPAR α を介して FGF21 の発現を誘導していることを示している。

FGF21 は、新しいタイプの FGF ファミリーに属し、ヘパリン結合ドメインを有しないことから、肝臓において発現された後、ホルモンのように全身に作用する可能性が考えられている。2007 年になって、FGF21 が、血液脳関門を通過することや、時刻依存的な低体温現象に関与する可能性が報告され、申請者がそれまで見出してきた、PPAR α の活性化による体内時計の制御に関与する可能性を考えた。本研究により、FGF21 の発現が、PPAR α を介して時刻依的に誘導されることが示され、今後、FGF21 と体内時計との関連に着目して研究を進めてゆきたいと考えている。

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 5 件)

Doi R, Oishi K, Ishida N (2010) CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of *Glycogen synthase 2*. *J Biol Chem* (in press). 査読有

Oishi K, Sakamoto K, Konishi M, Murata Y, Itoh N, Sei H (2010) FGF21 is dispensable for hypothermia induced by fasting in mice. *Neuro Endocrinol Lett* 31: 198-202. 査読有

Oishi K, Uchida D, Ohkura N, Doi R, Ishida N, Kadota K, Horie S (2009) Ketogenic diet disrupts the circadian clock and increases hypofibrinolytic risk by inducing expression of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1571-7. 査読有

Oishi K, Miyazaki K, Uchida D, Ohkura N, Wakabayashi M, Doi R, Matsuda J, Ishida N (2009) PERIOD2 is a circadian negative regulator of *PAI-1* gene expression in mice. *J Mol Cell Cardiol* 46: 545-52. 査読有

Oishi K, Uchida D, Ishida N (2008). Circadian expression of *FGF21* is induced by PPAR α activation in the mouse liver. *FEBS Lett* 582: 3639-3642. 査読有

[学会発表](計 4 件)

大石勝隆(2009.11.6)体内時計と肥満(第

5 回 TSOD (肥満・糖尿病)マウス研究会情報交換会)東京(東京八重洲ホール)
Oishi K, Uchida D, Ohkura N, Ishida N, Kadota K, Horie S (2009.10.27) Ketogenic diet disrupts the circadian clock and increases hypofibrinolytic risk by inducing expression of plasminogen activator inhibitor-1 (第 16 回日本時間生物学会学術大会)大阪

大石勝隆(2009.6.20)時計遺伝子による糖・脂質代謝調節と血栓症(第 10 回 Pharmac-Hematology シンポジウム)東京
大石勝隆、内田大輔、石田直理雄(2008.11.8)PPAR α アゴニストによる FGF21 の時刻特異的な発現誘導(第 15 回日本時間生物学会)岡山

[その他]

プレス発表等

1. 「ダイエット食品を食べると早起きになれる?!最新!オドロキ科学ニュース コカ・トビ」平成 21 年 10 月 1 日(子供の科学 2009 10 月号)
2. 「体内時計進行~炭水化物減で~」平成 21 年 9 月 11 日(科学新聞 第 3259 号 2 面)
3. 「食事で体内時計を制御~産総研・女子栄養大 炭水化物の関与解明」平成 21 年 9 月 4 日(日刊工業新聞 20 面)
4. 「炭水化物 1%以下 体内時計早める~睡眠障害治療に期待~」平成 21 年 7 月 29 日(東京新聞夕刊 D 版 8 面)
5. 「低炭水化物ダイエット 睡眠障害改善に可能性~体内時計調節機能を発見~」平成 21 年 7 月 27 日(化学工業日報新聞朝刊 9 面)
6. 「炭水化物減らすと時差ぼけに効果?~産業技術総合研究所 体内時計に変化~」平成 21 年 7 月 25 日(毎日新聞朝刊 22 面)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大石 勝隆 (OISHI KATUSTAKA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究グループ長

研究者番号: 50338688