

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08550

研究課題名(和文)末梢体内時計障害の本態の解明と治療基盤の確立

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、体内時計の障害は生活習慣病の一因であることが判明した。そこで本研究は、われわれが見出した体内時計制御薬であるGLP-1受容体作動薬の作用機構を解明し、体内時計障害の治療基盤を確立することを目的とした。GLP-1受容体作動薬エキセナチドは、1.活動期開始時(ヒトでの朝)に投与すると不規則な食生活による肝体内時計障害を予防可能、2.規則正しい生活時には投与時刻にかかわらず肝体内時計への影響なし、3.中枢神経のGLP-1受容体を介して肝体内時計に作用することが明らかになった。これらの知見は、末梢時計障害の予防・治療法の開発に有用であり、新たな生活習慣病治療薬の開発につながるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、GLP-1受容体作動薬の体内時計を適切な時刻に投与することにより不規則な生活による体内時計障害を抑制できることが明らかになった。また、規則正しい生活をしている場合にはGLP-1受容体作動薬をいつ投与しても問題ないこと、GLP-1受容体作動薬は中枢神経を介して末梢臓器の体内時計を制御することも判明した。これらの成果はGLP-1受容体作動薬の治療効果の向上や新たな生活習慣病治療薬の開発につながる可能性があり、それらが実現した際の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence indicates that disruption of the circadian clock contributes to the development of lifestyle-related diseases. We have previously shown that exenatide, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist, can strongly affect the molecular clocks. This study aimed to investigate the underlying mechanism and appropriate regimen of exenatide in mice. Exenatide administration at the beginning of the active period (i.e., in the morning for humans), but not at the beginning of the rest period, counteracted the phase shift effect of the rest period-restricted feeding. On the other hand, exenatide did not influence the phase of the hepatic clock under the active period-restricted feeding regardless of the dosing time. The effect of exenatide in wild-type mice weakened in central nervous system-specific GLP-1 receptor knockout mice. These findings may be useful in developing novel therapeutic strategies to prevent the onset and progression of lifestyle-related diseases.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：生活習慣病 生体リズム 体内時計 時計遺伝子 肝 GLP-1

様式 C-19、F-19-1 (共通)

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、各臓器の体内時計(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。中枢時計の時刻は光刺激でセットされる一方、末梢時計の時刻は液性因子や自律神経を介して制御されるため、末梢時計は光刺激よりも食餌刺激の影響を強く受けている。

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、交替勤務者は肥満や糖尿病を発症しやすいこと(*Obesity* 16:1887, 2008; *J Occup Environ Med* 48:455, 2006)が示され、動物においても、照明条件を変更し作製した慢性時差ぼけモデルでは同様の表現型を呈すること(*Proc Natl Acad Sci USA* 108:1657, 2011)が報告されている。さらに、体内時計が障害された時計遺伝子 *Clock* 変異マウスは肥満や高血糖を呈し(*Science* 308:1043, 2005)、ヒトにおいても時計遺伝子 *CLOCK* や *BMAL1* の遺伝子多型は2型糖尿病、脂肪肝、高血圧の発症リスクと関連すること(*Cardiovasc Diabetol* 15:4, 2016; *World J Gastroenterol* 13:4242, 2007; *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14412, 2007)が明らかにされた。一方、われわれは、肥満糖尿病モデルマウスや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を認めることを世界に先駆けて明らかにした(*Endocrinology* 146:5631, 2005; *Biochem Biophys Res Commun* 346:1297, 2006; *Diabetologia* 52:329, 2009; *Endocrinology* 152:1347, 2011)。また、前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞において時計遺伝子 *Dbp* の発現を抑制した場合には、脂肪細胞への分化が抑制され、細胞内糖取り込みが減少すること(*Chronobiol Int* 29:982, 2012)、マウスで時計遺伝子 *Bmal1* を肝細胞特異的に欠損させた場合には、肝糖新生・糖放出関連分子の発現リズムが障害され空腹時血糖の日内リズムが消失すること(*Endocrinology* 157:463, 2016)、褐色脂肪細胞特異的に欠損させた場合には、褐色脂肪細胞における脂肪酸代謝および熱産生リズムが障害され肥満をきたしやすくなること(*Mol Metab* 49:101202, 2021)も見出した。*Bmal1* は膵β細胞特異的欠損によりインスリン分泌障害(*Science* 350:aac4250, 2015)を、骨格筋特異的欠損により糖取り込み障害(*Skeletal Muscle* 6:12, 2016)を惹起することも報告されており、これらの結果は、代謝関連臓器の末梢時計が生活習慣病を予防・治療するための重要な標的であることを強く示唆する。

われわれは、正常マウスを用いた実験により、インクレチンであるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の受容体作動薬エキセナチドには末梢時計制御作用があることを見出した(*PLoS One* 8:e81119, 2013)。その作用は食餌よりも強力であったことから、GLP-1 受容体作動薬は末梢時計制御薬として有用である可能性が高い。しかしながら、末梢時計障害を治療・予防するためにGLP-1 受容体作動薬をどのように用いればよいかは検討されておらず、そもそもGLP-1 受容体作動薬がどのようなメカニズムで末梢時計を制御するのかも不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究は、GLP-1 受容体作動薬の肝体内時計への作用におよぼす投与時刻、食餌(食習慣)ならびに中枢神経特異的GLP-1 受容体欠損の影響をそれぞれ検討することにより、末梢体内時計に着目したGLP-1 受容体作動薬の適切な用法と、GLP-1 受容体作動薬の末梢時計制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウスは購入により、中枢神経特異的GLP-1 受容体欠損(cGLP1RKO) マウスは *Glp1r*-floxed マウスと *Nestin-Cre* マウスを交配することにより得た。雄性マウスを12時間:12時間明暗周期下で飼育し、順化後に10週齢で実験に供した。

(2) 実験の時刻は明期の開始時を0時とするZeitgeber time (ZT) で表す。明期(ZT 0—12)のみ(L-TRF)、または暗期開始後の4時間(ZT 12—16)のみに給餌を制限した時刻制限給餌(D-TRF)のいずれかを使用した、次の5種類の実験を実施した。

① 実験1

C57BL/6J マウスを2群(各群16匹)に分け、エキセナチド(10 nmol/kg)またはvehicleをZT12に4日間連続で投与した。同時に24時間絶食後にL-TRFを3日間行った。マウスをZT 18、0、6、12に安楽死させて肝を採取し凍結保存した。

② 実験2

実験1と同様の実験を、エキセナチドの投与時刻をZT 0に変更し実施した。肝のサンプリングはZT 6、12、18、0に実施した。

③ 実験 3

C57BL/6J マウスを 2 群に分けエキセナチド (16 匹) または vehicle (8 匹) を ZT 0 に 5 日間連続で投与するとともに、両群に D-TRF を行った。肝のサンプリングは ZT 6、12、18、0 に実施した。

④ 実験 4

実験 3 と同様の実験を、エキセナチドの投与時刻を ZT 12 に変更し実施した。肝のサンプリングは ZT 18、0、6、12 に実施した。

⑤ 実験 5

cGLP1RKO (13 匹) および対照 (*Glpr*-floxed) マウス (17 匹) を、実験 1 と同様の実験に供した。肝のサンプリングは ZT 0 と ZT 12 に実施した。

(3) 凍結保存した検体より RNA を抽出し、逆転写後に時計遺伝子 (*Bmal1*, *Per1*, *Cry1*, *Nr1d1*) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により定量した。

4. 研究成果

(1) 実験 1 の結果、既報 (*PLoS One* 8:e81119, 2013) のように L-TRF は肝の時計遺伝子発現リズムの位相を劇的にシフトさせること、エキセナチドを ZT 12 (活動期の開始時) に投与することによりそのシフトを抑制できることを確認した (図 1)。

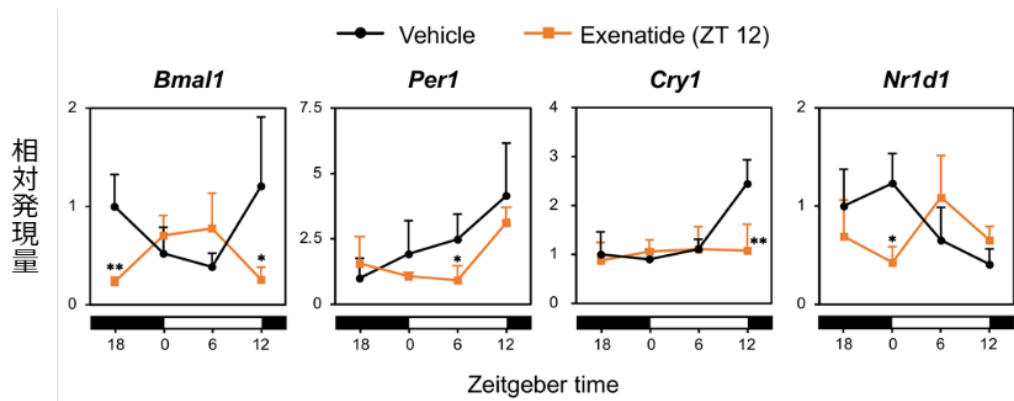


図1. 時刻制限給餌 (休息期) による体内時計位相シフトにおよぼすエキセナチドの影響 【活動期開始時に投与した場合】

一方、実験 2 においてエキセナチドを ZT 0 (休息期の開始時) に投与した場合には、エキセナチドは L-TRF による時計遺伝子発現リズムの位相のシフトを促進した (図 2)。

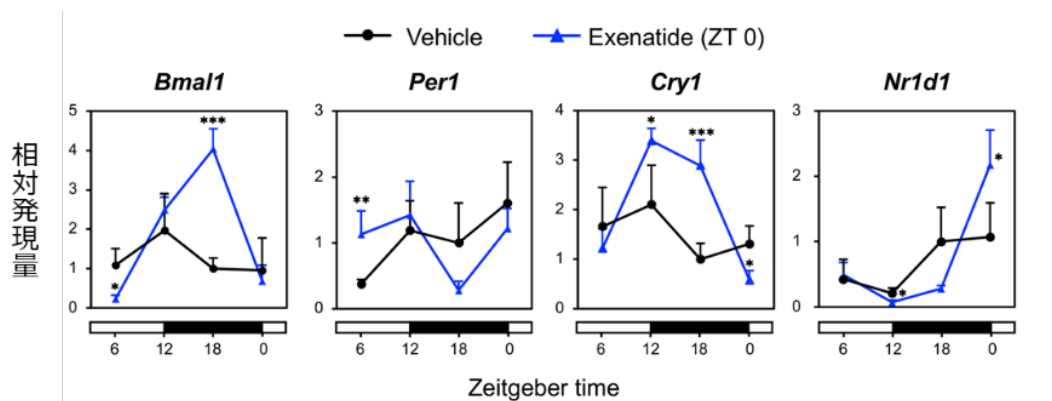


図2. 時刻制限給餌 (休息期) による体内時計位相シフトにおよぼすエキセナチドの影響 【休息期開始時に投与した場合】

(2) 活動期の開始時のみに給餌する D-TRF 下 (実験 3・4) では、投与時刻にかかわらず、エキセナチドによる時計遺伝子発現リズムの位相への影響は認めなかった (図 3)。

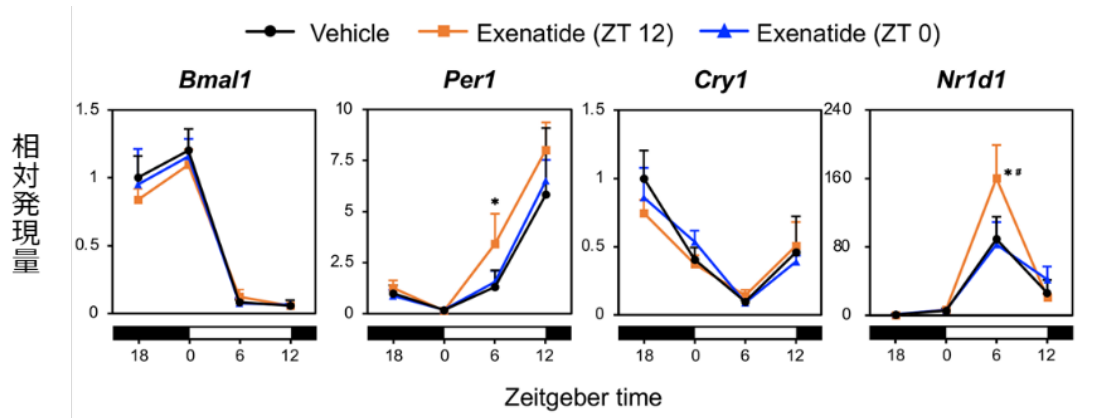


図3. 時刻制限給餌（活動期開始時）による体内時計位相シフトにおよぼすエキセナチドの影響

(3) 実験5においても、対照マウスではエキセナチドの ZT 12 投与は L-TRF による時計遺伝子発現リズムのシフトを抑制した（図 4）。一方、cGLP1RKO ではこの抑制作用が消失した。

(4) 以上の結果より、GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチドは、① 活動期の開始時（ヒトでは朝）に投与することにより、不規則な生活（食事）による肝の体内時計障害を予防できること、② 規則正しい生活（食事）をしている場合には投与時刻にかかわらず肝の体内時計への影響をほとんど認めないこと、③ 中枢神経の GLP-1 受容体を介して肝の体内時計に作用することが示唆された。これらの知見は、末梢時計障害の予防・治療法の開発に極めて有用であり、新たな生活習慣病の治療薬の開発につながるものと期待される。

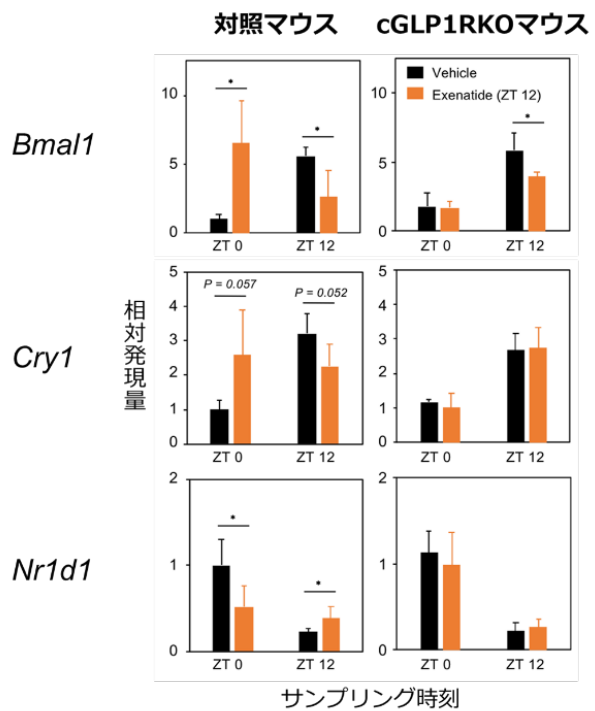


図4. エキセナチドの体内時計障害抑制効果におよぼす中枢神経特異的GLP-1受容体欠損の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miura Kotomi, Morishige Jun-ichi, Abe Jotaro, Xu Pingping, Shi Yifan, Jing Zheng, Nagata Naoto, Miyazaki Ryo, Sakane Naoki, Mieda Michihiro, Ono Masanori, Maida Yoshiko, Fujiwara Tomoko, Fujiwara Hiroshi, Ando Hitoshi	4. 巻 153
2. 論文標題 Imeglimin profoundly affects the circadian clock in mouse embryonic fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 215 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Satoshi, Hosono Takashi, Ono Masanori, Daikoku Takiko, Michihiro Mieda, Kagami Kyosuke, Iizuka Takashi, Chen Yuchen, Shi Yifan, Morishige Jun-ichi, Fujiwara Tomoko, Fujiwara Hiroshi, Ando Hitoshi	4. 巻 153
2. 論文標題 Desynchronization between Food Intake and Light Stimulations Induces Uterine Clock Quiescence in Female Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 2283 ~ 2290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tjnut.2023.06.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasan Nazmul, Sugimoto Koki, Yamada Koki, Morishige Jun-ichi, Ushijima Kentaro, Fujimura Akio, Nagata Naoto, Ando Hitoshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Chronic Treatment with Metformin Has No Disrupting Effect on the Hepatic Circadian Clock in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 293 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina58020293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando Hitoshi, Nagata Naoto, Hosono Takashi, Hasan Nazmul, Morishige Jun-ichi, Daikoku Takiko, Maida Yoshiko, Ono Masanori, Fujiwara Tomoko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Sustained effect of habitual feeding time on daily rhythm of core body temperature in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Nutrition	6. 最初と最後の頁 966788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnut.2022.966788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Pingping Xu, Jun-ichi Morishige, Zheng Jing, Naoto Nagata, Hitoshi Ando
2. 発表標題 Exendin-4 dosing time-dependently affects hepatic circadian clock through GLP-1 receptors in the central nervous system
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 許 平平, 盛重 純一, 靖 ジョウ, 長田 直人, 安藤 仁
2. 発表標題 GLP-1受容体作動薬は中枢神経への直接作用を介して肝の体内時計障害を改善する
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安部 丈太郎, 三浦 琴美, 盛重 純一, 許 平平, 史 一帆, 靖 暉, 長田 直人, 三枝 理博, 安藤 仁
2. 発表標題 イメグリミンはメトホルミンとは異なり体内時計に強力に作用する
3. 学会等名 第30回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Pingping Xu, Jun-ichi Morishige, Zheng Jing, Naoto Nagata, Hitoshi Ando
2. 発表標題 Exendin-4 administration time-dependently affects the hepatic circadian clock through glucagon-like peptide-1 receptors in the central nervous system
3. 学会等名 第30回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤 仁
2. 発表標題 不規則な朝食習慣が健康に及ぼす影響
3. 学会等名 第10回日本時間栄養学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤 仁
2. 発表標題 時間治療と体内時計治療
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 JPW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤 仁
2. 発表標題 朝食の時刻が深部体温の日内リズムに与える影響 朝食欠食者がたまたま朝食を摂るのはいいことなのか？
3. 学会等名 第44回日本臨床栄養学会総会・第43回日本臨床栄養協会総会 第20回大連合大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤 仁
2. 発表標題 体内時計を考慮した薬物治療
3. 学会等名 第41回日本眼薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤 仁
2. 発表標題 時間薬理学・時間治療の現状
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤原 浩 (Fujiwara Hiroshi) (30252456)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	大黒 多希子 (Daikoku Takiko) (30767249)	金沢大学・疾患モデル総合研究センター・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------