

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247045

研究課題名(和文) 環境シグナルに応答する生体センサーの生理人類学的メタボローム解析

研究課題名(英文) INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL MOLECULES RESPONDING TO ENVIRONMENTAL SIGNALS

研究代表者

佐伯 茂 (SAEKI, Shigeru)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授

研究者番号：60211926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタボリック症候群を遺伝的に発症する実験動物において、光環境や低温環境の応答性に異常がある生体成分の探索を試みた。その結果、メタボリック症候群発症を発症する実験動物では、視交叉上核の時計遺伝子、肝臓の時計遺伝子やコレステロール合成系および分解系の遺伝子の光環境に対する発現リズムに異常があることを発見した。また、メタボリック症候群発症ラットでは、低温環境に暴露されても褐色脂肪の儉約遺伝子の発現が増加しないために、エネルギー消費が亢進しないことが示唆され、このことが肥満症の発症原因の一つであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present studies were undertaken to explore the biological molecules in rats with metabolic syndrome whose responses to light and darkness cycle or cold temperature are different from those in normal rats. Some biological molecules of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus and the liver showed abnormal circadian rhythms in rats with metabolic syndrome. Furthermore, cold exposure failed to produce the increase in the expression of the thrifty gene in brown adipose tissue in rats with metabolic syndrome.

研究分野：環境生理学

キーワード：環境シグナル 生体センサー

1. 研究開始当初の背景

体内時計は人類の進化と共に確立された制御システムであるが、文明の発達に伴う環境変化により、体内時計に狂いが生じている。例えば、人工照明、夜間労働、時差を越える東西移動はサーカディアンリズム(概日リズム)を狂わせ、人工温熱環境、季節を越える南北移動はサーカニアンリズム(概年リズム)を狂わせる。このようなことから、日本を含めた先進国でメタボリック症候群が急激に増加している原因の一つに、体内時計の攪乱が示唆されている。

1970年代において、MoorとEichlerの研究グループとStephanとZuckerの研究グループは、実験動物の視交叉上核を破壊すると行動やホルモンのリズムが消失したことから、哺乳類では視交叉上核が体内時計の座であることを見いだした。しかし、視交叉上核を破壊したラットに、人為的に一定時刻に食事を与えるとサーカディアンリズムが表れる。更に、ラットは夜行性であるが、食事を人為的に昼間だけ与えると、サーカディアンリズムは昼間に移行し、食事が投与される時刻を予期して消化酵素の分泌が亢進する。

体内時計の同調因子である光は、目(網膜)の光感受性網膜神経節細胞で感知されると、視交叉上核に伝達されて時計遺伝子の転写を亢進させ、松果体でのメラトニン合成を調節する。GastonとMenakerは、松果体を除去すると活動リズムが消失することを明らかにし、メラトニンが光情報の伝達物質であることを突き止めた。メラトニンは、トリプトファンから合成される神経伝達物質で、哺乳動物ではトリプトファンは体内では合成されず食事として摂取する必要がある。松果体に取り込まれたトリプトファンは、夜間にセロトニンを經由してメラトニンに合成される。食事は、メラトニンの供給源であるという点からも、体内時計の制御に関与していると考えられる。更に近年、食事のビタミンB12、葉酸、ベタインが、病態代謝を制御するだけでなく、直接ゲノムDNAにエピジェネティックな変化(DNAメチル化修飾)を引き起こし、生活習慣病発症リスクに影響を与えることが明らかになっている。

肥満は、ライフスタイルを含めた環境変化によって増加の一途をたどっている。肥満は、エネルギー蓄積とエネルギー消費のアンバランスによって引き起こると考えられる。ヒトを含む哺乳類には、機能が異なる2種類の脂肪組織、即ち、白色脂肪と褐色脂肪が存在する。白色脂肪は多量の脂肪滴を蓄え、エネルギー貯蔵器官として、褐色脂肪は多量のミトコンドリアを含有し、エネルギー消費器官として機能する。

1962年Neelは、オセアニアやアメリカ先住民に肥満や2型糖尿病が急増した原因を説明するために、集団遺伝学の立場から俟約遺伝子仮説を提唱した。この仮説は、現代社会では何時でも必要充分量のカロリーを摂

取することができるが、食糧を十分に摂取することができなかった原始社会では、摂取エネルギーを効率良く蓄積できる遺伝素因を有する者が生存に有利であり、淘汰されたという説である。しかし、現代社会では、効率的なエネルギー貯蔵は肥満の原因となり、Neelは、エネルギーを効率的に貯蓄することができる遺伝素因を俟約遺伝子と名付けた。

白色脂肪と褐色脂肪には、俟約遺伝子として知られる3アドレナリン受容体(3AR)が発現するが、交感神経刺から分泌されるノルアドレナリンは3ARを介して脂肪を脂肪酸に分解する。褐色脂肪のミトコンドリア内膜には脱共役タンパク質(UCP1)が高発現し、白色脂肪や褐色脂肪で生成した脂肪酸を熱として消費する。従来、褐色脂肪は、新生児や幼児でのみ存在していると考えられていたが、近年、成人にも充分量の褐色脂肪が存在し、褐色脂肪組織の量はBMI、体脂肪率、皮下脂肪面積、内臓脂肪面積と負の相関関係にあることが判明した。エネルギー代謝に果たす褐色脂肪の役割に注目が集まっている。

2. 研究の目的

ヒトの多くの生理現象(睡眠・覚醒、血圧、体温、ホルモン分泌、酵素活性など)は約24時間のサーカディアンリズムを有し、体内時計で制御されている。体内時計は環境シグナルに応答して環境情報を生体内に伝達し、生体の環境適応を制御する。光が光感受性網膜神経節細胞に取り込まれると視床下部に情報が伝達され、視交叉上核の時計遺伝子の転写が制御される。視床下部を薬物や電気的に破壊した実験動物や時計遺伝子欠損マウスではサーカディアンリズムが変動し、過食・肥満が発症する。ヒトでも光に対する体内時計の応答性が低下すると、精神障害、睡眠障害、摂食障害、自律神経障害のみならず、メタボリック症候群が発症する。一方、照度や日照時間は季節により変動するが、ヒトの生活パターンは年間を通じて一定である。また、視床下部を破壊した実験動物では、一定時刻に食事を摂取させるとサーカディアンリズムは回復する。このことは、食事でも体内時計を制御する重要な環境シグナルであり、光環境に応答する体内時計は食事によって修飾され、光環境と食事環境の相互作用によって生体センサーが作動し、体内時計を制御することを示唆する。そこで本研究では、メタボリック症候群を発症した際の、光環境に応答する生体成分の探索を計画した。

また、ヒトの体内時計の発現リズムの評価には、血液の白血球、あるいは口腔内粘膜細胞が生体サンプルとして用いられていた。しかし、前者は、採血による侵襲性が高く、被験者数が多くなると白血球の分離時間のズレが生じ、体内時計の発現リズムを正確に把握することが難しい。近年、毛根に付着する

毛包細胞を分離し、体内時計の発現リズムを測定する方法が試みられている。本法は、低侵襲的であり、サンプル調製に特別な技術、装置を必要とせず、簡単にサンプルを調製できるという利点を有する。そこで、本研究では、毛包細胞を用いた体内時計の発現リズムの解析は、体内時計の異常を把握し、それに基づく疾患予防や、時間生物学を活用した効果的な栄養療法を実施するための基礎的知見を提供すると期待できると考えた。

3. 研究の方法

本研究は、大阪市立大学杉本地区動物実験委員会と大阪市立大学生生活科学部研究科倫理委員会の承認を得て実施した。

メタボリック症候群発症ラットと正常ラットを自由摂取飲水、12時間明暗サイクルで1週間飼育した後 ZT0 ZT4 ZT8 ZT12, ZT16, ZT20, ZT24 に麻酔下で血液、視交叉上核、肝臓を摘出し、光環境に应答する生体成分を探索した。

メタボリック症候群発症ラットと正常ラットを、室温(24℃)で40日間飼育した。その後、各ラットを2群(n=6)に分け、低温環境下で15日間飼育した。実験最終日に麻酔下で血液と褐色脂肪、と白色脂肪を摘出し、低温環境に应答する生体成分を探索した。

被験者は健康な男子学生4名とし、身長、体重、体脂肪量、体脂肪率、筋肉量を測定すると共に、日常活動(起床時刻、就床時刻、食事時刻)の問診を行った。被験者の顎部の体毛(5本)と唾液の採取を、午前0時から3時間毎(0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24時)に行った。実験期間中はアルコールおよび刺激物の摂取を禁止し、体毛と唾液の採取1時間前から飲食を禁止した。

4. 研究成果

メタボリック症候群発症ラットの視交叉上核の時計遺伝子 Clock と Cry1 や、肝臓の時計遺伝子 Cry1, Per2, Dec2, E4bp4 の発現リズムに異常があることを発見した。メタボリック症候群発症ラットの肝臓におけるコレステロール合成系遺伝子の発現ピークが低く、コレステロール分解系遺伝子の発現リズムが消失していることを発見した。メタボリック症候群発症ラットの脂肪組織における時計遺伝子 Bmal1, Clock, Per2 や、脂質代謝や糖質代謝の重要な転写因子である PPAR α の発現リズムに異常があることを発見した。以上のことより、メタボリックシンドローム発症時における時計遺伝子の概日リズムの乱れは、中枢時計が存在する視交叉上核だけでなく、末梢時計が存在する肝臓や脂肪組織でも確認された。肝臓は脂質・糖質代謝の中心臓器であり、また脂肪組織は種々の生理活性物質を産生・分泌し、脂質代謝・糖質代謝を制御する。これらのことから、メタボリック症候群発症ラットで見られたメタボリックシンドロームの発症は、時計遺伝

子の日内リズムの乱れによって引き起こされた可能性が示唆された。

褐色脂肪 3AR 発現量は、室温環境下ではメタボリック症候群発症ラットと正常ラットに有意差が無かったが、低温環境下では正常ラットでのみ有意に上昇した。褐色脂肪の UCP1 発現量は、室温環境下では正常ラットに比べメタボリック症候群発症ラットで有意に低かったが、低温環境下では正常ラット、メタボリック症候群発症ラット共に有意に上昇した。白色脂肪のトリグリセリド分解系遺伝子の発現量も、低温環境下では正常ラットで有意に上昇したが、メタボリック症候群発症ラットでは上昇しなかった。以上の実験結果より、メタボリック症候群発症ラットでは、低温環境に暴露されても褐色脂肪 3AR の発現が増加しないために、エネルギー消費が亢進しないことが示唆され、このことが肥満症の発症原因の一つであると考えられた。

時計遺伝子(CLOCK, BMAL1, PER2, CRY1)の発現リズムは被験者によって異なり、生活リズムが不規則な被験者では、ピークのずれやリズムの消失が見られた。また、唾液中の cortisol 濃度は、起床後に最も高くなることが知られており、本研究においても、被験者の通常の起床時刻後にピークを示した。これらの結果より、毛包細胞の時計遺伝子の発現リズムの日内変動は、被験者の生活リズムを反映していると考えられた。

以上のことより、毛包細胞を用いた時計遺伝子の発現リズムの解析法は、ヒトの体内時計を解析する上で有用であると考えられた。

<引用文献>

- Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42(1):201-206(1972).
- Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(6):1583-1586(1972).
- Gaston S, Menaker M. Pineal function: the biological clock in the sparrow? *Science*, 160(3832):1125-1127(1968).
- NEEL JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*, 14: 353-362 (1962).
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308(5724): 1043-1045(2005).

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)

曾根良昭(SONE, Yoshiaki)
美作大学・生活科学部・教授
研究者番号: 60145802

[学会発表](計4件)

Misato Ikutani, Miwako Deguchi, Fumikazu Hayashi, Akemi Hosoda, Azumi Yamagishi, Shin Ebihara, Dong-Ho Kim, Shigeru Saeki, Effects of cold exposure on energy metabolism-related genes expressions in rats with spontaneous metabolic syndrome, 12th Asian Congress of Nutrition Abstract Book, p252, May 15, 2015, Pacifico Yokohama (Yokohama, Kanagawa)

生谷美紗都、出口美輪子、海老原伸、細田明美、山岸あづみ、金東浩、佐伯茂、メタボリック症候群モデル動物のエネルギー代謝関連遺伝子発現に対する寒冷暴露の影響、日本農芸化学会 2015 年度大会プログラム集、p.53、2015 年 3 月 37 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

出口美輪子、植木沙織、細田明美、金東浩、佐伯茂、時計遺伝子を指標とする男子大学生の体内時計アセスメント、日本生理人類学会第71回大会要旨集 p.68, 2014.年11月2日、神戸大学(兵庫県・神戸市)

生谷美紗都、出口美輪子、林史和、福村智恵、金東浩、佐伯茂、メタボリック症候群モデル動物のエネルギー代謝関連遺伝子発現に対する寒冷暴露の影響、第53回日本栄養・食糧学会近畿支部大会講演要旨集、p.36、2014年10月25日、京都府立大学(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 茂 (SAEKI, Shigeru)
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授
研究者番号: 60211926

(2) 研究分担者

西川禎一 (NISHIKAWA, Yoshikazu)
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授
研究者番号: 60183539

羽生大記 (HABU, Daiki)
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授
研究者番号: 60183539

由田克士 (YOSHITA, Katsushi)
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授
研究者番号: 60299245