

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590091

研究課題名(和文) 時計遺伝子 BMAL1 による脂肪細胞機能の制御とそのメカニズム

研究課題名(英文) Regulation of the adipose tissue functions by BMAL1

研究代表者

榛葉 繁紀 (SHIMBA, SHIGEKI)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：20287668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪細胞機能制御における分子時計システムの役割を明らかにする目的で、時計遺伝子 BMAL1 を脂肪細胞特異的に欠損したマウス(AKOマウス)を作製し、その解析を行った。

AKOマウスは、総摂食量に違いを示さないものの摂食時間がコントロールマウスとは異っており、過体重を示した。また AKOマウスでは皮下脂肪組織/精巣上体脂肪組織比の増大が認められた。比較的短時間の絶食後における血糖値は、コントロールマウスと比較して有意に低下していた。AKOマウスは、耐糖能の亢進を示した。これらの結果は、分子時計システムが、脂肪細胞機能の制御を介して全身のエネルギー代謝を調節していることを示している。

研究成果の概要(英文)：To understand the roles of the molecular clock system in the regulation of the adipose tissue functions, the mice specifically deleted Bmal1 gene, a core component of molecular clock system, in adipocytes (AKO mice) were established and analyzed in this study. Total food consumption of AKO mice was as much as that of control mice. However, the eating time of AKO mice was different from the control mice, and, as a result, AKO mice exhibited overweight. The effect of Bmal1 deficiency was observed in the localization of excess fat, i.e., the increase of the subcutaneous fatty tissue / epididymis fat tissue ratio was found in the AKO mice. The blood glucose level after the relatively brief fasting in AKO mice was significantly as lowered as compared to that in control mice. Also, the AKO mice showed increased glucose disposal rate. These results indicate that a molecular clock system controls systemic energy metabolism through the control of the adipose tissue functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：BMAL1 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進展にともない、“健康に長寿を全うしていく”ことは国民の切なる願いであり、医薬学界にとっても大きな課題となっている。一方でライフスタイルの変化により糖尿病、高血圧および脂質異常症などのいわゆる生活習慣病を複数クラスターし(メタボリックシンドローム)、最終的には動脈硬化症を発症する患者数は増加の一途をたどっている。メタボリックシンドロームを呈する原因は多種多様であり、脂肪性食品からのエネルギー過剰摂取、交通手段の発達による運動不足、過度のストレスなどが挙げられる。興味深いことに経年的な糖尿病患者数の推移と就寝時間の夜型への変化との間には相関性があり、夜型生活への移行もメタボリックシンドローム発症の一因であると考えられる(NHK 国民時間調査)。また21時以降に夕食をとる割合が20年前に比較して約3倍に増加していることも夜型生活とメタボリックシンドローム発症との因果関係を予測させる(厚生省国民栄養調査)。さらには我が国におけるシフトワークに関する大規模疫学調査が2006年にまとめられ、その結果においてもシフトワークによる肥満ならびに虚血性心疾患による死亡のリスク増大が示されている。これら結果は、生活時間帯のシフトによる生体リズムの乱れが、メタボリックシンドローム発症のリスクファクターであることを示唆している。

生体リズムは、細胞レベルにおいて時計遺伝子である Brain-Muscle Arnt Like Protein (BMAL)1 により制御されている。BMAL1 は血管内皮細胞を除きほぼ全身において発現を示すが、特に、脳、リンパ球そして脂肪組織において著しく高い発現を示す。我々は BMAL1 の発現が脂肪細胞分化モデルである 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化の進行に伴い増加することを見出した。マウス脂肪組織においても BMAL1 は成熟脂肪細胞画分に高く発現し、前駆脂肪細胞を含む stromal-vascular 画分には検出されない。さらにこの BMAL1 の発現増加は、脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨細胞へと分化する間葉系幹細胞においても脂肪細胞分化時においてのみ特異的に観察された。これらの事実は脂肪細胞機能における BMAL1 の重要性を予感させる。事実、我々は一連の採択研究において BMAL1 KO マウス胎児より調製した線維芽細胞が脂肪細胞への分化能を欠くことを明らかにし、さらにはそれら細胞にアデノウイルスを用いて BMAL1 を発現することにより分化能が回復することを示した。またそのメカニズムとして脂肪細胞内で脂質代謝を制御する転写因子である SREBP-1 ならびにそれらの標的遺伝子である脂質代謝系の酵素群の BMAL1 による発現制御を明らかにした。これらの知見を基に作製した全身性 BMAL1 KO マウスは、高脂肪食負荷による脂肪組織の肥大化に対して抵抗性を示し、その結果、脂肪組織に

蓄えられない過剰の脂質が循環し、肝臓ならびに骨格筋における異所性脂肪の蓄積、脂質異常症ならびに耐糖能の低下を示すことが前回ならびに前々回の採択研究において明らかになった(図1)。これら一連の我々の知見に加えて、BMAL1 のヘテロダイマーパートナーである Clock 遺伝子に変異を有するマウスがメタボリックシンドロームの症状を示すこと、ヒト BMAL1 の SNP 解析により BMAL1 が II 型糖尿病ならびに高血圧発症と強い相関を持つこと、さらにはメタボリックシンドローム患者の脂肪組織において BMAL1 機能不全が認められることが明らかにされ、BMAL1 の機能とメタボリックシンドロームの発症との関連性が急速にクローズアップされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、上述した知見を基に体内時計システムの異常によるメタボリックシンドローム発症メカニズムを明らかにする目的で、体内時計のマスターレギュレーターである BMAL1 を脂肪組織特異的に欠損したマウス(A-BMAL1 KO マウス)を作製し、その脂肪組織の病理的变化、耐糖能、アディポサイトカイン類の分泌ならびに遺伝子発現を解析することで脂肪細胞における体内時計システムの役割を提示する。

3. 研究の方法

A-BMAL1 KO マウスは、BMAL1 flox マウスをアディポネクチンプロモーター下流に Cre リコンビナーゼを組み込んだマウスと交配することにより作製した。血液生化学検査は常法に従い測定した。遺伝子発現は RT-qPCR 法により測定した。動物実験に関しては、申請者が所属する日本大学が定める動物実験指針に従い、動物愛護の精神を持って行った。遺伝子組換え生物実験に関しては、機関承認を受け、指定された拡散防止実験施設内において、日本大学で定める取り扱い規則に基づき行った。

4. 研究成果

A-BMAL1 KO マウスは、総摂取量に違いを示さないものの摂食時間がコントロールマウスとは異なっており、過体重を示した。その一方で精巣上体脂肪組織においては、脂肪細胞分化能の低下が示された。BMAL1 欠損の影響は、脂肪組織の局在に大きな影響を与え、A-BMAL1 KO マウスでは皮下脂肪組織/精巣上体脂肪組織比の増大が認められた。比較的短時間の絶食後における血糖値は、コントロールマウスに比較して有意に低下していた。また通常食飼育あるいは高ショ糖食飼育した A-BMAL1 KO マウスは、著しい耐糖能の亢進を示した。高脂肪食飼育により、この亢進はキャンセルされた。

A-BMAL1 KO マウスは、コントロールマウスに比較して、低い血中遊離脂肪酸量を示し

た。また A-BMAL1 KO マウス脂肪組織では、HSL 量ならびに ATGL 量のタンパク質レベルでの低下が認められた。一方、絶食あるいはイソプロテレノール処理後における A-BMAL1 KO マウスの血中遊離脂肪酸量は、コントロールマウスとほぼ同程度あった。またその際の活性型 HSL 量に関して、両マウスの間で差異は認められなかった。これらの結果は、脂肪細胞における分子時計システムが脂肪細胞分化ならびに臓器間シグナル伝達を介した摂食や糖代謝、そして脂質代謝を調節していることを示している。

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 20 件)

Yoshitane, H., Ozaki, H., Terajima, H., Du, N.H., Suzuki, Y., Fujimori, T., Kosaka, N., Shimba, S., Sugano, S., Takagi, T., Iwasaki, W., and Fukada Y.

CLOCK-controlled polyphonic regulations of circadian rhythms through canonical and non-canonical E-boxes

Mol Cell Biol.(in press) (査読有) .

Kawai, M., Kinoshita, S., Shimba, S., Ozono, K., and Michigami, T.

Sympathetic activation induces skeletal Fgf23 expression in a circadian rhythm dependent manner.

J Biol Chem. 17;289(3):1457-1466. (2014) (査読有) .

Watabe, Y., Tomioka, M., Watabe, A., Aihara, M., Shimba, S., and Inoue, H.

The clock gene Brain and Muscle Arnt-Like Protein-1 (BMAL1) is involved in hair growth. *Arch. Dermatol. Res.* 305:755-761 (2013) (査読有) .

Wada T, Sunaga H, Ohkawara R, and Shimba S.

Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates NADPH oxidase activity via direct transcriptional regulation of p40phox expression.

Mol Pharmacol. 83(5):1133-1140 (2013) doi: 10.1124/mol.112.083303 (査読有) .

榎葉 繁紀

概日リズムと疾患：脂質代謝異常

日本臨床(日本臨床社)71: 2119-2123 (2013) (査読無) .

榎葉 繁紀

肥満発症にかかわる時計遺伝子の役割

日本臨床(日本臨床社)71: 244-248 (2013) (査読無) .

Takarada, T., Kodama, A., Hotta, S., Mieda, M., Shimba, S., Hinoi, E., and Yoneda, Y.

Clock genes influence gene expression in

growth plate and endochondral ossification in mice.

J Biol Chem. 287(43):36081-36095 (2012) (査読有) .

Maekawa, F., Shimba, S., Takumi, S., Sano, T., Suzuki, T., Bao, J., Ohwada, M., Ehara, T., Ogawa, Y., and Nohara, K.

Diurnal expression of Dnmt3b mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork.

Epigenetics 7(9):1046-1056 (2012) (査読有) .

Fustin, J.-M., Doi, M., Yamada, H., Komatsu, R., Shimba, S., and Okamura, H. Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: Temporal segregation of metabolites

Cell Reports 1:341-349 (2012) (査読有) .

榎葉 繁紀

時計遺伝子による代謝調節と疾患
化学と生物(日本農芸化学会)50: 794-800 (2012) (査読有) .

榎葉 繁紀

脂質代謝と概日リズム

GI research (先端医学社)20:15-21 (2012) (査読無) .

榎葉 繁紀

体内時計をどう治療に活用するか~脂質異常症を治療する

Heat View (メジカルビュー社)16: 97-102 (2012) (査読無) .

榎葉 繁紀

時計遺伝子と代謝疾患

Bio Clinica (ニューサイエンス社)27: 29-32 (2012) (査読無) .

榎葉 繁紀

時計遺伝子とメタボリックシンドローム
Anti-aging Science (メディカルレビュー社)4:50-53 (2012) (査読無) .

Tahira K, Ueno T, Fukuda N, Aoyama T, Tsunemi A, Matsumoto S, Nagura C, Matsumoto T, Soma M, Shimba S, Matsumoto Y.

Obesity alters the expression profile of clock genes in peripheral blood mononuclear cells.

Arch Med Sci. 7:933-940 (2011) (査読有) .

Shimba, S., Ogawa, T., Hitosugi, S., Ichihashi, Y., Nakadaira, N., Kobayashi, M., Tezuka, M., Kosuge, Y., Ishige, K., Ito, Y., Komiyama, K., Okamatsu-Ogura, Y., Kimura, K., and Saito, M.

Deficient of a Clock Gene, Brain and Muscle Arnt-Like Protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation

PLoS ONE 6(9): e25231. doi:10.1371/journal.pone.0025231 (2011).

(査読有)

榎葉 繁紀

脂質代謝の日内リズム.
医学のあゆみ(医歯薬出版社)239:882-885
(2011)(査読無).

榎葉 繁紀

体内時計による代謝調節とメタボリックシンドローム.

ファルマシア(日本薬学会)47:627-630
(2011)(査読有).

榎葉 繁紀

体内時計と生活習慣病.

医学のあゆみ(医歯薬出版社)237:709-713
(2011)(査読無).

榎葉 繁紀

概日リズムとメタボリックシンドローム.
Medical Science Digest.(ニューサイエンス社)37: 18-21 (2011)(査読無).

[学会発表](計19件)

榎葉 繁紀

時計遺伝子 BMAL1 による代謝調節

(第17回日本病態栄養学会年次学術集会
2014年1月 大阪)

榎葉 繁紀

分子時計システムによる脂肪細胞機能の
制御機構の解析

(第34回日本肥満学会 2013年10月 東京)

吉田 賢新、和田 平、榎葉 繁紀

時計遺伝子 BMAL1 による胆汁酸の代謝及び
排泄機能の調節

(第12回次世代を担う若手ファーマサイ
オ・フォーラム 2013年9月 東京)

石井 孝幸、大友 麻衣子、鈴木 一将、
和田 平、榎葉 繁紀

脂肪細胞の分子時計システムによる摂食な
らびに耐糖能の制御

(第18回アディポサイエンスシンポジウ
ム 2013年8月大阪)

大友 麻衣子、石井 孝幸、和田 平、
榎葉 繁紀

脂肪細胞の分子時計システムによる血中
遊離脂肪酸量の制御

(第18回アディポサイエンスシンポジウ
ム 2013年8月 大阪)

榎葉 繁紀

時計遺伝子と生活習慣病

(日本睡眠学会第38回定期学術集会 2013
年6月 秋田)

榎葉 繁紀

時間薬物治療への招待

(日本薬学会第133年会 2013年3月 横
浜)

榎葉 繁紀

時計遺伝子 BMAL1 による組織特異的な代謝
調節

(第35回日本分子生物学会年会 2012年12
月 福岡)

榎葉 繁紀

BMAL1 による臓器特異的機能ならびに臓器
間クロストークの制御

(第19回日本時間生物学会学術大会 2012年
9月 札幌)

榎葉 繁紀

体内時計による代謝制御とメタボリック
シンドローム

(栄養学若手研究者の集い第46回サマーセ
ミナー 2012年8月 熱海)

榎葉 繁紀

Tissue specific regulation of energy
metabolism by BMAL1

(Society for research on biological
rhythms biannual meeting 2012 2012年5月
米国)

榎葉 繁紀

体内時計とメタボリックシンドローム

(第6回 四国先端糖尿病研究会 2012年3
月 高松)

榎葉 繁紀

体内時計システムによる代謝調節とその
かく乱によるメタボリックシンドローム

(第39回薬物活性シンポジウム 2011年
11月 福岡)

榎葉 繁紀

時計遺伝子欠損によるメタボリックシン
ドローム発症とその分子メカニズム

(第32回日本肥満学会 2011年9月 淡路
島)

榎葉 繁紀

体内時計による代謝制御とその乱れによ
るメタボリックシンドローム

(第88回日本栄養・食糧学会関東支部大会、
平成23年度 日本食品科学工学会関東支
部会 合同シンポジウム 2011年9月 藤
沢)

榎葉 繁紀

時間薬理学の分子基盤 -時計遺伝子欠損
マウスの解析からみえるもの-

(第13回応用薬理シンポジウム 2011年9
月 船橋)

榎葉 繁紀

体内時計による脂質代謝調節

(日本油化学会 2011年若手の会サマースク
ール 2011年8月 大府)

榎葉 繁紀

メタボリックシンドロームの背景 過
去・現在そして未来

(サプリメント医療薬学研究会 2011年6月
千葉)

榎葉 繁紀

体内時計とメタボリックシンドローム

(New insights of molecular science on
growth disorders 2011年6月 東京)

[図書](計1件)

榎葉 繁紀

「体内時計の分子機構と脂質代謝」

時間薬理学における最新の治療戦略 大戸茂
弘編(医薬ジャーナル社)(2013)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/eisei.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

榎葉 繁紀 (SHIMBA, Shigeki)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：20287668