

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00901

研究課題名(和文)概日リズムリセット機構におけるグレリン、ニューロメジンUの新たな役割

研究課題名(英文) Novel roles of ghrelin and neuromedin U as a modulator of circadian rhythmicity

研究代表者

田尻 祐司 (Tajiri, Yuji)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：80469361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計の基本となる概日リズムは、光や食事など外界からの刺激によって修正される。肥満者や肥満動物に認められる食行動異常は、そのようなリセット機構の破綻が関与すると考えられる。高脂肪食(HFD)肥満マウスにおいて、血中グレリン濃度および視床下部ニューロメジンU(NMU)の日内リズムは、野生型(WT)に比べて逆転していた。NMUKOマウスでは、暗期終了前の自発運動量や探索行動が減少していた。さらに、HFDマウスにおいて胃の時計遺伝子の日内リズムの変調を認めた。以上の結果より、高脂肪食にて生じる食リズム異常に、摂食関連因子のリズム異常に伴う末梢時計遺伝子の変調が関与している事が示された。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythmicity based on biological clock is entrained by food or exercise other than light stimulation. In obese model, such an entrainment is thought to be disrupted leading to abnormal feeding behavior. Rhythmicities of plasma ghrelin concentration and neuromedin U (NMU) expression in the hypothalamus are completely inverted in obesity model mice. In NMU knockout mice, voluntary exercise and exploring activity at the end of dark period were significantly decreased compared to those in WT mice. Furthermore, disrupted rhythms of clock genes were observed in obese model. Taken together, it was demonstrated that abnormal feeding behavior observed in obese model could be attributable to disrupted rhythm of either appetite regulating hormones or clock genes.

研究分野：糖尿病，肥満

キーワード：食行動異常 肥満モデルマウス 高脂肪食負荷 時計遺伝子 グレリン ニューロメジン

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、1999年に本研究課題の連携研究者である児島ら¹⁾によりラットおよびヒトの胃から発見されたペプチドであり、摂食促進、脂肪蓄積など代謝系に対する様々な作用を有す。我々はグレリン遺伝子欠損(GKO)マウスを作出・維持しており、本マウスでは自律神経日内リズムが破綻していることを見出し、グレリンと生体リズムの関連が示唆される[基盤研究(C)課題番号 19590840, 22500361]。さらに、普通食(CD)で飼育した野生型(WT)マウスでは明瞭な食リズムが見られるが、高脂肪食(HFD)負荷により明期の摂餌量が増加し、いわゆるヒト肥満者の多くに認められる“ダラダラ喰い”を想起させるような食リズム異常を呈する事が判明した(図1)。

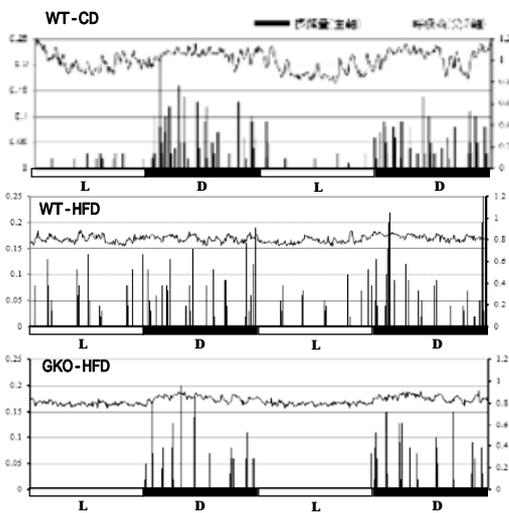


図1. 高脂肪食(HFD)負荷マウスでは明期の摂餌量が増加し呼吸商が平坦化する(中段)が、グレリン KO マウスではこのような変化が軽減する(下段)

ヒトの概日リズムは一般的に 24.2~24.6 時間といわれ、光の刺激や食事のリズムにより 24 時間サイクルに同調するリセット機構を有し、不規則な食事(朝食欠食や夜遅い夕食等)ではこのリセット機構がうまく機能しないために体内時計に歪みが生じ、ひいては多くの生活習慣病の原因ともなり得る。

正常マウスでは、7:00 と 19:00 に上昇するグレリンの日内リズムに伴う摂餌行動が概日リズムリセット機構の重要な trigger であり、本機構においてグレリンリズムが重要な役割を果たしているという仮説のもと検証

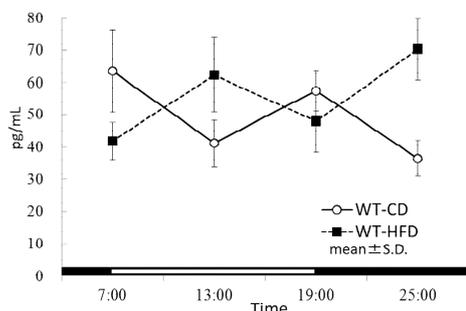


図2. 高脂肪食肥満モデルにおける血漿グレリン濃度のリズム異常

を進めてきた(図2)。しかしながら最近、GKO マウスでは HFD を負荷した際の食リズム異常(明期の摂餌量増加)がキャンセルされるものの、7:00 と 19:00 における摂餌行動の減弱は認められることから、グレリン以外の概日リズムリセット機構の存在が浮上した(図1)。

ニューロメジン U (NMU) は、1985 年に南野らにより発見された神経ペプチドであり²⁾、強力な子宮収縮作用を有する事が知られているが、体内時計の中核である視交叉上核にも存在し、概日リズム調節への関与が示唆されている³⁾。また、NMU 遺伝子欠損(NMUKO)マウスは過食のため肥満を呈することから⁴⁾、NMU は摂食抑制ホルモンであり、グレリンとは相反する作用を有するため、両ペプチドが拮抗的に働きながら概日リズムのリセット機構を形成している可能性は高い。体内リズムと摂食行動は深い関連が示唆され、ヒトにおいては起床時の光刺激と朝食によりリセットされるが、その詳細な機序については判明していない。グレリンや NMU など生体リズムに関与するペプチド性因子の機能解析を通じてエネルギー代謝調節機構と生体内リズム調節機構の相互作用を解明することは、将来的にメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病などにおける生活習慣の是正において、より効率的で新しい指導概念の導入につながり、新たな側面からのアプローチ方法をもたらす可能性をも秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、高脂肪食により生じる食行動異常と概日リズムリセット機構破綻のメカニズムの一つとして、摂食促進ホルモン・グレリンと摂食抑制ホルモン・ニューロメジン U の役割を明らかにすることを目的とする。

概日リズムリセット機構におけるグレリンおよびニューロメジン U の役割:

概日リズムのリセット機構における両ペプチドのクロストークの有無を日内リズムの観点より時間栄養学的に理解することが重要である。そこで、以下の 2 項目に関して研究を進める予定である。

1) NMUKO マウスにおけるグレリン日内リズムおよび高脂肪食の影響を検討し、それぞれのペプチド性因子の欠損により生じる概日リズムのリセット機構の変調を明らかにする。

2) NMUKO マウスにおいて、摂食行動、活動量や自発運動量の変化を調査する。

概日リズムのリセット機構破綻による食行動異常に関与する体内時計因子の病態:

この食リズムの変調は高脂肪食などの栄養学的な外的刺激により修飾される可能性がある。そこで、高脂肪食による食リズム異

常のメカニズムとして時計遺伝子の関与も調査する。

3. 研究の方法

概日リズムリセット機構におけるグレリンやニューロメジンUの役割:

これまでに申請者らは、高脂肪食負荷肥満マウスにおいてグレリン日内リズムの位相にズレが生じていることを見出し、グレリンリズムのズレにより概日リズムのリセット機構が狂い肥満の食行動異常が生じている、という仮説のもとに研究を進めてきた。しかしながら、HFD 負荷肥満 GKO マウスでは概日リズムのリセット機構における摂餌行動の減弱は残ることから、グレリン以外のペプチド性因子として、サーカディアンリズムの調節因子である NMU の関与を考え、以下の動物実験にて検証する。

1) 高脂肪食にともなう NMU リズムの変化: 4 週齢 WT マウスに普通食 (CD; 10 kcal% fat) あるいは高脂肪食 (HFD; 60 kcal% fat) を 12 週間給餌し、午前 1 時、7 時、13 時、19 時の時点で脳を摘出し、 -80°C にて保存し、後日視床下部を切り出して RNA を抽出し、RT-PCR 法にて書くポイントにおける NMU の発現量を測定し、日内リズムを比較する。

2) 概日リズムリセット機構における NMU の役割:

16 週齢の NMUKO マウスにおいて、午前 1 時、7 時、13 時、19 時の時点で大動脈より採血し (EDTA/アプロチニン入り)、血漿分離後に 10 v/v% の 1N HCl を添加混和して、 -80°C にて保存した。後日、血漿グレリン濃度を RIA 法にて測定した。

NMUKO マウスの概日リズムリセット機構について:

16 週齢の NMUKO と WT マウスの行動解析 (摂餌量、活動量および自発運動量) を ARCO システムを用いて比較検討する。

a) 明暗リズム (明期: 7 時 ~ 19 時) 下の自由摂餌における行動解析

b) 5 ~ 7 時、19 ~ 21 時の 2 時間ずつ制限給餌を施行した場合の行動解析

概日リズムのリセット機構破綻による食行動異常; 体内時計因子の病態解析:

上記 -1) で得られた視床下部のサンプルおよび同時刻に得られた胃組織のサンプルより各時計遺伝子の発現 (*Clock*, *Bmal1*, *Per2* など) を解析する。

4. 研究成果

1) 高脂肪食肥満モデルにおける NMU のリズム異常

視床下部の NMU 発現リズムは、WT マウスにおいて明期に上昇し暗期に低下するという明瞭なるリズムを有する。

高脂肪食肥満マウスではそのリズムが完全に逆転しており (明期に低下し暗期に上昇)、本モデル動物における明期の摂餌量の増加という食リズム異常の一因である事が示唆された (図 3)。

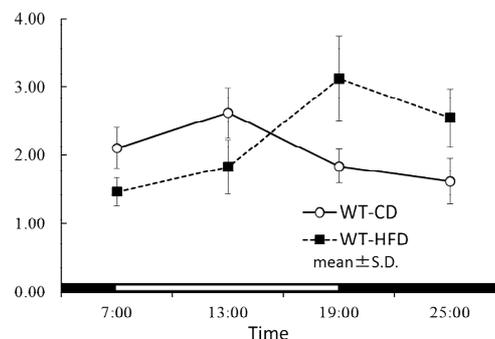


図3. 高脂肪食肥満モデルにおける視床下部NMUのリズム異常

2) 概日リズムリセット機構における NMU の役割

NMUKO マウスのグレリン日内リズム: 7、19 時において血中グレリン濃度が上昇し、13、25 時において低下する日内リズムが認められ、WT (図 1) と比べて差はなかった。

NMUKO マウスの概日リズムリセット機構について

a) 自由摂餌下では、WT マウスに比べて NMUKO マウスにおいては、明期および暗期摂餌量がともに有意に増加しており、食行動異常が認められた。

b) 明暗サイクル (明期: 7 ~ 19 時) 下にて、制限給餌時刻を 5 ~ 7 時、19 ~ 21 時の 2 時間ずつに設定した場合、両マウスともに制限給餌時刻に同調した自発運動が認められ、制限給餌時刻 5 ~ 7 時の運動量は NMUKO マウスにおいて WT マウスに比べて有意に減少していた (図 4)。また、制限給餌前の午前 4 ~ 5 時における NMUKO マウスの活動量は、WT マウスに比べて有意に減少しており、NMUKO マウスでは探索行動が低下していることが明らかとなった (図 4)。

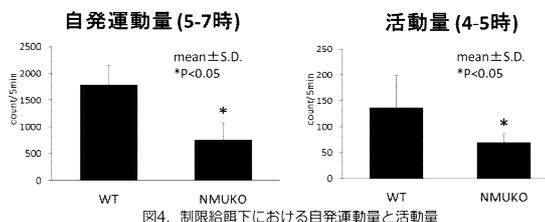


図4. 制限給餌下における自発運動量と活動量

以上の結果より、明期から暗期開始時刻における概日リズムのリセット機構にニューロメジン U の欠損により生じる変調は来たしていないが、暗期終了前の自発運動量や探索行動が NMUKO マウスでは減少していたことから、予知行動へのニューロメジン U の関与が示唆された。

3) 概日リズムのリセット機構破綻による体内時計因子の病態解析

高脂肪食による肥満モデルマウスの胃内

の *Per2*, *Bmal1*, *Clock* などの時計遺伝子の日内リズムを通常餌群と比較検討した。胃粘膜の *Per2*, *Bmal1* は、日内リズムは保たれていたが、HFD 群ではその発現が多くのポイントにおいて低下していた。*Clock* の発現はすべてのポイントにおいて、HFD 群では有意に低下しており、日内リズムも消失していた。一方、これらの時計遺伝子の日内リズムに対する高脂肪食の影響は、視床下部においては軽度であり、CD 群と HFD 群の差は顕著ではなかった (図 5)。

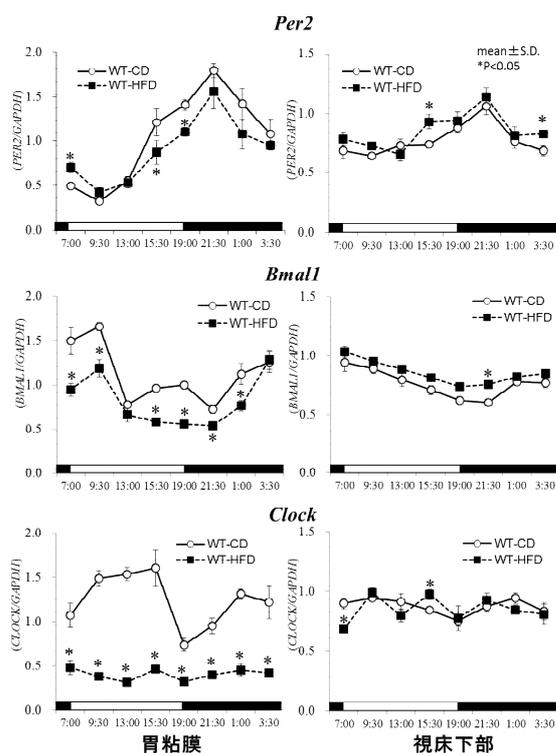


図5. 高脂肪食にともなう胃粘膜と視床下部における時計遺伝子の日内リズムの変化

以上の結果より、高脂肪食にて生じる食リズム異常には、摂食促進作用を有すグレリン以外の摂食抑制因子や末梢時計遺伝子の日内リズム異常も関与し、摂餌リズム異常との関連を示唆する結果であると考えられる。今後は、両 KO マウスおよびダブル KO マウス (GKO/NMUKO) に対して各アゴニストを用いた実験、および WT マウスに対する各アンタゴニストを用いた実験などを追加して、両ペプチド因子の概日リズムリセット機構における役割に関して詳細に検討して行く予定である。

文献

- 1) Kojima M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999
- 2) Minamino N, et al. Neuromedin U-8 and U-25: novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 1078-1085, 1985
- 3) Nakahara K, et al. The gut-brain peptide neuromedin U is involved in the mammalian

circadian oscillator system. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 156-161, 2004

- 4) Hanada R, et al. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med* 10: 1067-1073, 2004

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 0 件)

[学会発表](計 9 件)

Hiroharu Mifune, Yuji Tajiri, Kento Hara, Shimpei Iwata, Yoshihiro Nishi, Masayasu Kojima, Kentaro Yamada: A disrupted rhythm of appetite-regulating hormone is relevant to abnormal feeding behavior in high fat diet induced obese mice. 51th EASD Annual Meeting. Sep 14 ~ 18, Stockholm, Sweden

坂井 勇介, 原 健人, 岩田 慎平, 西 芳寛, 田尻 祐司, 児島 将康, 御船 弘治: 肥満モデルマウスの食リズム異常における時計遺伝子発現の関与. 第 2 回時間栄養科学研究会. 2015 年 09 月 02 日, 東京

Yuji Tajiri, Kento Hara, Yusuke Sakai, Kentaro Yamada, Ryoichi Mitsuzono, Masayasu Kojima, Hiroharu Mifune: A surge of appetite regulating hormone, ghrelin, and its relevance to motivation for the initiation of voluntary exercise in mice. 52th EASD Annual Meeting. Sep 12 ~ 16, Munich, Germany

Kento Hara, Yuji Tajiri, Yusuke Sakai, Hiroharu Mifune, Masayasu Kojima, Kentaro Yamada: Effects of ghrelin on the expression of clock genes in gastric tissue: a possible mechanism of altered food: anticipatory activity. 52th EASD Annual Meeting. Sep 12 ~ 16, Munich, Germany

御船弘治, 坂井勇介, 河原幸江, 原 健人, 田尻祐司, 児島将康: グレリンのドーパミン報酬系を介した自発運動の動機付けについて. 第 90 回日本内分泌学会学術総会. 2017 年 4 月 20 日 ~ 22 日, 京都

御船弘治, 坂井勇介, 佐藤貴弘, 田尻祐司, 角間辰之, 児島将康: 概日リズムの自発運動発現機構におけるグレリンの役割. 第 38 回日本肥満学会. 2017 年 10 月 7 日 ~ 8 日, 大阪

佐藤貴弘, 坂井勇介, 田尻祐司, 角間辰之, 児島将康, 御船弘治: グレリン遺伝子欠損マウスに見られる自発運動の異常について. 第 24 回日本時間生物学会. 2017 年 10 月 28 日 ~ 29 日, 京都

Yuji Tajiri, Yusuke Sakai, Yukie Kawahara, Akinori Nishi, Masayasu Kojima, Hiroharu Mifune: Voluntary exercise can modify the preference for palatable food through the modulation of central reward circuit by peripheral ghrelin signal. 53rd EASD Annual Meeting, Sep 11 ~ 15, Lisbon, Portugal

Hiroharu Mifune, Yuji Tajiri, Yusuke Sakai, Takahiro Sato, Masayasu Kojima: Ghrelin regulates the motivation for voluntary exercise under the control of circadian rhythmicity in mice.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田尻 祐司 (TAJIRI, YUJI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：80469361

(2)研究分担者

御船 弘治 (MIFUNE, HIROHARU)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：70174117

(3)研究分担者

山田 研太郎 (YAMADA, KENTARO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：10191305

(4)連携研究者

児島 将康 (KOJIMA, MASAYASU)
久留米大学・分子生命科学研究所・教授
研究者番号：20202062