

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12706

研究課題名(和文) 栄養素による時計遺伝子とメタボリック症候群の制御に関する研究

研究課題名(英文) Nutritional Regulations of metabolic syndrome

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) 2,800,000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を得られた初代培養肝細胞や株化線維芽細胞における時計遺伝子の発現リズムに異常があることを見いだした。ついで、動物性タンパク質と植物性タンパク質が、褐色脂肪のUCP1、UCP2遺伝子の発現量を亢進すること、肝臓のCyp7A1遺伝子のサーカディアンリズムに影響を与えることを明らかにした。以上のことより、メタボリック症候群モデル動物では、時計遺伝子の発現リズムに異常があること、摂取タンパク質は、脂質代謝のサーカディアンリズムに影響を与えることが示唆され、これらのことがメタボリック症候群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 elucidated that primary hepatocyte and established fibroblast cell line from rats with metabolic syndrome showed disorders in circadian rhythms of clock genes. Dietary proteins affected UCP1 and UCP2 mRNA expressions in brown adipose tissue that plays a significant role in energy expenditure. They also induced in abnormal circadian rhythms in hepatic Cyp7A1 mRNA expression.

研究分野：生体情報学

キーワード：栄養素 メタボリック症候群

1. 研究開始当初の背景

肥満は先進国だけでなく発展途上国でも増え続けており、2013年には世界の肥満人口が21億人にのぼることが明らかになった。日本では、成人のおよそ3割、40~74歳男性の半数がメタボリック症候群、またはその予備群に該当すると見込まれている。メタボリック症候群は内臓脂肪型肥満をベースに糖代謝異常、高血圧、脂質代謝異常などの生活習慣病を併発した状態を言い、これら疾患が重複すると、それぞれの程度が軽くとも、動脈硬化性の発症頻度が高くなることが知られている。

日本人の3大死亡率は、癌、脳血管障害、虚血性心疾患であるが、脳血管障害、虚血性心疾患を合わせた死亡率は癌と等しい。従って、脳血管障害、虚血性心疾患の発症の関与する動脈硬化症の発症を抑制する方策を探ることは日本人のQOLに寄与する。

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アニュアルリズム(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。

Moore 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、食事時のビタミン 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。

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儉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儉約遺伝子と名付けた。

脂肪組織とは、一般に皮下や内臓周囲に存在する白色の脂肪組織を言う。この白色脂肪組織の蓄積がいわゆる肥満であり、メタボリック症候群のリスクを増大させる。しかし、哺乳動物には白色脂肪組織と別に褐色脂肪組織が存在している。両者とも細胞内に多量の中性脂肪を蓄えているという点では同じだが、存在場所や構造、働きなどが大きく異なる。白色脂肪組織は体内にエネルギーを貯蔵し必要に応じて全身へ供給する一方、褐色脂肪組織はミトコンドリアを多量に含み、脂肪酸酸化による熱産生とエネルギー消費に関与する脱共役タンパク質1(UCP1)遺伝子を高発現している。褐色脂肪組織の UCP1 遺伝子の活性低下は肥満症の発症に繋がるが、その遺伝子発現は交感神経系で制御されている。例えば、寒冷曝露によって交感神経系が刺激を受けるとノルエピネフリンが分泌され、細胞膜上に存在する受容体 3 アドレナリン受容体(3AR)を介し、細胞内のシグナル伝達を受けて UCP1 遺伝子が活性化される。

白色脂肪と褐色脂肪に発現する 3AR が、儉約遺伝子として知られる。交感神経刺激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

体内時計は、睡眠、覚醒、血圧、体温、免疫という広範囲の生理現象を制御し、体

内時計の破綻はメタボリック症候群を発症させる要因となる。体内時計に関する研究は、遺伝学、生理学、細胞生物学などの分野で精力的に進められ、最もホットな研究分野の一つとなっている。体内時計のうち、中枢時計は視交叉上核に、末梢時計は全身組織に存在している。体内時計は、中枢時計と末梢時計のクロストークによって制御され、一方が破綻すると、もう一方が代償的に機能し、結果として体内時計の恒常性が保たれている可能性がある。体内時計の制御機構をヒトで直接的に検討すべきであるが、ヒトでの検討には限界がある。実験動物であるマウスやラットの遺伝子配列は、ヒトと高い類似性があり、これらの実験動物で得られる実験結果は、ヒトの体内時計を解析する上で、非常に重要な知見になると期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、大阪市立大学杉本地区実験動物委員会の承認を得て実施した。

(1) 正常動物と遺伝的にメタボリック症候群を自然発症する実験動物より肝細胞を分離し、次いで、この肝細胞を多様な細胞外マトリックスを含む EHS ゲル上で培養し、時計遺伝子のサーカディアンリズムを検討した。マウスの EHS 肉腫から得られる EHS ゲルは、ラミニン、エンタクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、タイプコラーゲンなどの多様な細胞外マトリックス蛋白質を含んでいる。EHS ゲルを培養デッシュにコーティングすると、肝細胞の基底膜に類似した環境を再構築でき、EHS ゲルをコーティングしたデッシュ上で培養した初代培養肝細胞は、肝特異的遺伝子やタンパク質の発現、ホルモンによる酵素誘導を、*in vivo* に近い状態で再現できる特性を有する。

(2) 株化した線維芽細胞(rat-1 fibroblast)を2時間高血清(50%)培地で培養すると細胞中の時計遺伝子 Per1、Per2 及び転写因子 Rev-Erb、Dbp などがリズムを刻み始めることが報告されている。しかし、メタボリック症候群を自然発症する実験動物由来の線維芽細胞は存在しない。そこで、遺伝的にメタボリック症候群を自然発症する実験動物由来の線維芽細胞の株化を試みた。

(3) 正常ラットに動物性タンパク質、植物性を与えて3週間飼育し、褐色脂肪を摘出し、UCP1、UCP2、UCP3 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 時計遺伝子 Cry1、Per2、Clock のサーカディアンリズムが、遺伝的にメタボリック症候群を自然発症する実験動物より分離した初代培養肝細胞と、正常動物より分離した初代培養肝細胞とで異なっているこ

とを明らかにした。このことより、EHS ゲルを用いた初代培養肝細胞は、*in vivo* サーカディアンリズムを再現できる有益な実験系となる可能性が示唆された。

(2) 線維芽細胞に特異的に発現する FSP-1 遺伝子が、株化した細胞に、発現することを確認した。時計遺伝子 Per2、Bmal1、Cry1 のサーカディアンリズムが、遺伝的にメタボリック症候群を自然発症する実験動物より株化した線維芽細胞と、正常動物より株化した線維芽細胞とで異なっていることを明らかにした。

(3) 褐色脂肪の UCP1、UCP2 遺伝子の発現量は、植物性タンパク質を摂取させると、動物性タンパク質を摂取した時に比べ上昇した。このことは、植物性タンパク質は、褐色脂肪での熱産生を亢進させ、肥満を抑制する可能性があると考えられる。実際に、植物性タンパク質を摂取すると、血漿コレステロールおよび中性脂肪濃度や肝臓コレステロールおよび中性脂肪濃度を抑制した。また、植物性タンパク質は、肝臓での胆汁酸合成の律速酵素 Cyp7A1 遺伝子の発現量を大きく上昇させ、サーカディアンリズムに影響を与えた。

<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).
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell*, 93(6):929-37(1998).

5. 主な発表論文等
研究を終えたばかり、実験結果をまとめている段階である。

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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