

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19356

研究課題名（和文）シフトワーカーの概日リズム障害起因性NAFLDに対する新たな治療戦略

研究課題名（英文）New therapeutic strategy toward circadian dysrhythmia induced NAFLD

研究代表者

藤田 浩司（FUJITA, KOJI）

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：30468160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：概日リズム障害を呈する事により脂質代謝と関係の深い時計遺伝子RORA発現の日内変動に変調を来し、休眠期に発現抑制されるべき脂質合成を司る遺伝子の発現促進を認め、動物モデルにおいて脂肪肝や脂質代謝異常を誘発する事が確認された。同時にsiRNAを用いてRORA発現を抑制する事で休眠期における脂質代謝関連遺伝子の発現抑制が確認され、概日リズム障害起因性NAFLDに対する新たな治療戦略に光明を見出す事が出来た。但し、既存薬の中でRORA発現調節に関係すると考えたメラトニン／オレキシン作動薬やPPAR作動薬によるRORA発現調節や脂肪肝改善効果は得られず、他既存薬発見や新薬開発を要する結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

就労人口の約20%がシフトワーカーであり、かつNAFLD罹患率が成人の約20%である事から、シフトワーカーNAFLDは成人人口のおよそ5%前後（300万人強）存在すると示唆される。その他にも近年、特に都会を中心に照明過多に伴う睡眠障害患者は急増しており、難治性である概日リズム障害起因性NAFLDも相当数潜在している事が予想される。極度の生活習慣病と言える概日リズム障害起因性NAFLDに対し、そのメカニズムの不透明性からこれまで薬物介入は困難であったが、メカニズムの一端を解明した事により、既存薬の応用や創薬に繋げる初動研究としての意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Irregular circadian rhythm modulated diurnal variation of the clock gene RORA expression which closely related to lipid metabolism. The expression of the lipid synthesis gene that should be suppressed during the dormant period was promoted, lead to induce fatty liver and abnormal lipid metabolism in animal models. It was also confirmed the expression of lipid metabolism-related genes during dormancy was suppressed by suppressing RORA expression using siRNA. I regret to find that the melatonin/orexin agonists and PPAR agonists, which were thought to be related to the regulation of RORA expression, could not have the effect of regulating RORA expression or improving fatty liver. The elucidation of the new mechanism could reveal the new therapeutic strategy for NAFLD caused by circadian rhythm disorder.

研究分野：消化器代謝学

キーワード：概日リズム障害 時計遺伝子 胃排泄障害 脂質代謝障害 NAFLD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

産業の近代化に伴い、就業人口の約 20% がシフトワーカーとして就労している。シフトワーカーを対象とした種々の対照研究の結果、規則的な生活を営む日勤労働者と比較し同等の運動強度とカロリー摂取にも関わらず、高血圧、肥満、2 型糖尿病、非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease) などのメタボリックシンドローム (MetS) 発症リスクの 20-30% 上昇 [Esquirol Y, et al. Chrono Inter 2009] のみならず、国際がん研究機関はシフトワークを発がんリスクが高い危険因子とし、冠動脈疾患での死亡リスクを見るとシフトワーカーは日勤労働者の 2 倍以上である [An Pan et al. PLOS 2012] といった生命に直接関わる健康障害が指摘されている。ところが、シフトワーカーは適切な運動やカロリー摂取者でも MetS を発症する為に MetS 治療の礎である食事運動療法が無効なケースが多い。適切な動物モデルが確立されていない事に加えてヒトに対しても横断観察研究が主体で縦断介入研究に関する報告が殆ど無くメカニズム解明に未だ至っていない事からテーラーメイド治療を有しておらず、現状では併発疾患に対する対処療法が行われているに過ぎない。シフトワーカーは自分の意思に関係なく長期間半ば強制的に従事させられ、原因からの離脱が困難な点からも国民の健康維持に貢献する為には可及速やかなメカニズム解明や治療法の開発が急務である。

これまで動物脂肪肝モデルを用いた NAFLD 病態メカニズム解明と治療薬開発を精力的に行う中で、NASH 病態進展を司る重要な因子として肝における VLDL (very low density lipoprotein) 合成障害が深く関与している事を世界で初めて証明し、肝臓病学のトップジャーナルである Hepatology に報告するなど、特に NAFLD の肝臓脂質代謝を中心に研究を進めてきた。2011 年から 2014 年まで米国 NIH へ留学し、留学先で NAFLD の遺伝的背景を研究した際に抽出された SNPs の 1 つに時計遺伝子を認めた事から、時計遺伝子発現異常を引き起こす概日リズム障害と NAFLD を含めた肝臓脂質代謝異常との相関性に興味を覚え、研究着手を開始した。

## 2. 研究の目的

予備実験として、摂食量は一定に保った上で光の照射時相をずらす事で作成したシフトワーカーモデルマウスを用いて病態解析を行った所、肝内脂肪沈着の増量と NAS スコアの上昇が認められた。その要因として、通常は活動期前半に集中する摂食活動が睡眠期も認められるなど摂食リズムが不安定化されていた事に加え、時計遺伝子の日内リズムが平坦化され睡眠期の発現量が亢進した事により、肝臓から脂質エネルギーが放出される睡眠期においても肝臓へのエネルギー取り込みが亢進している事が考えられた。摂食量は変えずに摂食時間を活動期に制限する事で病態の改善を認めた他、食生活スタイルの是正なしに標的時計遺伝子の発現のみを是正する事で肝臓脂質代謝シグナルが改善され NAFLD 病態改善を認めた。

得られた知見を元に実臨床応用を目指し、2 つのテーマに焦点を絞り研究を進める。

1 つ目は、シフトワーカー MetS は病態特性から消化管蠕動遅延が予想され、消化管運動能の亢進により食物通過時間を短縮する事で NAFLD 病態改善を図る。2 つ目は時計遺伝子の発現調整に密接に関わるメラトニンの発現制御により NAFLD 病態改善を図る。いずれも既存薬の利用が可能で開発を要しない事から、臨床への早期導入が期待出来る。

## 3. 研究の方法

シフトワーカー 不規則な光 / 摂食刺激 肝臓末梢時計の乱調 肝臓内エネルギー代謝異常 概日リズム障害起因性 NAFLD 発症進展という機序に対し、肝臓末梢時計の是正を目指しメラトニン発現リズムの恒常化と食物通過吸収時間の短縮に焦点を絞り研究計画を作成した。概日リズム障害の日内メラトニン分泌リズムを測定し、メラトニンやその合成材料である 5-THE をマウスやヒトに適切なタイミングで投与し日内メラトニン分泌リズムを是正する事で NAFLD 病態改善に繋がるか検討すると共に、概日リズム障害の食物通過吸収時間遅延を消化管運動胃排出促進剤により是正する事で NAFLD 病態改善に繋がるかに関しても、胃排出能や運動能、小腸吸収能を鋭敏に反映する [13C] オクタン酸呼吸テスト法を用い評価する。研究が計画通りに進まない危険性を考慮し、全く異なる 2 機序による機能解析と治療アプローチを同時並行で進めていく。具体的には下記に示すような方法を計画した。

### 1) メラトニン制御による概日リズム調整能と治療法の検討

概日リズム障害モデルマウスの概日メラトニン分泌異常の経時変化を詳細に検討。健康群に近似した日内メラトニン分泌曲線作成する為の至適投与量と投与タイミングを検討。

日内メラトニン分泌曲線を長期に是正維持する事で概日リズム障害モデルマウスの NAFLD 病態改善作用を検討。

概日リズム障害ボランティアのメラトニン日内分泌を詳細検討。

倫理委員会承認後、概日リズム障害ボランティアへメラトニンサプリメント等を投与し、健康群ボランティアと近似した日内メラトニン分泌曲線を作成出来る投与量やタイミングを検討。

倫理委員会承認後、概日リズム障害 NAFLD 患者へメラトニンサプリメントやメラトニ

ン受容体作動薬等とプラセボを2重盲検で半年間服用して頂き、NAFLD病態改善効果を検討。

2) 消化管運動能の亢進による食物通過時間短縮がNAFLD病態に果たす役割を検討

[13C]オクタン酸 Breath ID を用い概日リズム障害マウスの胃運動を対照群と比較。

概日リズム障害モデルマウスに消化管運動胃排出促進剤を投与し、胃排出能の短縮を検討。

概日リズム障害モデルマウスを用い、食物通過時間短縮群と対照群を24週観察し、NAFLD病態改善効果を検討。

概日リズム障害ボランティアの胃運動能を13C呼気テストで検討。

倫理委員会承認後、概日リズム障害ボランティアへ消化管運動胃排出促進剤を投与し、胃排出能を対照群と比較検討。

倫理委員会承認後、概日リズム障害NAFLD患者へ消化管運動胃排出促進剤とプラセボを2重盲検で半年間服用して頂き、NAFLD病態改善効果を検討。

#### 4. 研究成果

##### 1) メラトニン制御による概日リズム調整能と治療法の検討

はじめにマウスを用いた概日リズム障害起因メタボマウスモデルの作成に従事した。人のシフトワーカーに近似したマウスモデルを確立する為、摂食量は一定に保った上で光の照射時相をずらす事で代謝障害を有するよう3つのデザイン(4日毎8時間前傾, 4日毎8時間後傾, 4日毎ランダム変化)で病態解析を行った所、特に4日毎に8時間前傾モデルにおいて肝内脂肪沈着の増量とNASスコアの上昇が認められた。メタボモデルが作成された要因としては、1) 前傾する事で本来であれば休眠期の蓄積エネルギー利用(放出)を促す代謝サイクル時に摂食活動が行われ、放出<蓄積にシフトした事、2) 活動期前半に集中する摂食活動が休眠期も認められるなど摂食リズムが不安定化され、時計遺伝子(RORA)の日内リズムが平坦化され、休眠期におけるRORA発現量が亢進した事により、肝臓から脂質エネルギーが放出される休眠期においても肝臓へのエネルギー取り込みが亢進している事が考えられた。上記の根拠を裏付けるデータとして、摂食量は変えずに摂食時間を活動期に制限する事で脂肪肝病態の改善を認めた点、食生活スタイルの是正なしに標的時計遺伝子(RORA)の発現のみを是正する事で一定の脂肪肝病態の改善を認めた点があげられる。

次に概日リズム障害起因メタボマウスモデルを用いて脂肪肝形成のメカニズムと時計遺伝子(RORA)の関係性について検討を進めた。活動期/休眠期におけるエネルギー代謝にRORA遺伝子がどう関与しているかを検討するため、正常概日リズム/概日リズム障害マウスのRORA遺伝子を過剰発現/発現調整なし/発現抑制し脂質代謝に与える影響を6群間で検討した。RORA遺伝子の発現量と肝脂肪沈着量の間に相関が認められたが事は既報通りだが、表現型としては肝臓においてPPAR, SREBP1c, Plin2, DGAT2 mRNA, 血中においてFFA, Insulin と RORAmRNA 発現量の間に正の相関が認められ、肝臓MTTPmRNA と RORAmRNA 発現量の間に負の相関が認められた。また正常概日リズムであれば休眠期に発現抑制されていた肝臓PPAR, SREBP1c, Plin2, DGAT2 mRNA が概日リズム障害モデルにおいて有意差をもって発現増加を示しており、siRNAを用いてRORAmRNA発現を抑制する事で休眠期における脂質代謝関連遺伝子の発現抑制が確認できた。概日リズム障害により時計遺伝子の1つであるRORAの概日発現異常(特に休眠期におけるRORAmRNA発現増加)がシグナル下流の脂質代謝関連遺伝子(PPAR, SREBP1c, Plin2, DGAT2, MTTP)の特に休眠期における発現増加を来とし、肝臓における脂質蓄積(エネルギー循環不全)を呈しているものと思われた。

時計遺伝子(RORA)の発現変化による脂質代謝障害は確認できた一方で、メラトニン分泌の発現変化については脂肪肝モデルマウスと対照正常群との間で有意な変化を認めることはなく、また概日リズム障害マウスと対照正常群との間においても発現リズムの変調は有していたものの1日あたりの総発現量において有意な変化を認めることはなかった。メラトニン分泌日内リズムの変調が脂肪肝形成に与える影響を検討するため、概日リズム障害高脂肪食負荷マウスにメラトニン投与を行い、メラトニン分泌日内リズムを正常リズム高脂肪食負荷マウスに近似させ脂肪肝形成に与える影響を検討したところ、脂肪肝形成において多少の是正は認めたものの有意差は認められなかった(P=0.223)。また概日リズム障害に影響を与えている事が先の研究で確認されていたRORAmRNA発現やシグナル下流の脂質代謝関連遺伝子(PPAR, SREBP1c, Plin2, DGAT2, MTTP)の発現も同様に調べたところ、メラトニン制御が直接RORAmRNA発現に影響を与えることはなく、下流の脂質代謝関連遺伝子発現においても2群間で有意差を得られなかったことから、メラトニン制御による脂質代謝/脂肪肝制御は困難である事が確認された。メラトニンと同様、睡眠

調節と脂質代謝に寄与しているオレキシンにおいても同様に検討を行ったが、こちらにおいても有意な差を認めることは出来なかった。PPAR 作動薬として既に脂肪肝改善効果が報告されているチアゾリジンをを用いて RORAmRNA 発現に与える影響も検討を行ったが有意差は認められなかった。既存の薬剤において時計遺伝子 RORA を調節することができる薬剤の発見に至らず、今後、RORA 発現に影響を与える既存薬の発見や新薬開発が望まれる結果となった。

2) 消化管運動能の亢進による食物通過時間短縮が NAFLD 病態に果たす役割を検討[13C]オクタン酸 Breath ID を用い概日リズム障害マウスの胃運動を対照群と比較検討を行ったところ、概日リズム障害群に有意な胃排泄能の遅延を認めた。この結果を踏まえ、医療機関で就労する脂質代謝障害を有しない健常ボランティア 12 名を 2 群 (A: 日勤のみ 6 名、B: 夜勤や当直等にも従事するシフトワーカー 6 名) に分け、[13C]オクタン酸 Breath ID を用い上記マウス実験と同様に呼気テストによる胃排泄能検査を施行したところ、B 群において多少の排泄遅延傾向は認めたものの、有意差は認められなかった ( $P=0.189$ )。検査日時や[13C]オクタン酸投与量などの条件を変更し再度試みるも、概日リズム障害群において明確な胃排出能の遅延は認められなかった。考えられる理由として、(1)マウスと比較してヒトの概日リズムは就労 / 生活環境以外の要因においても制御されており、対象者個々の概日リズム障害の程度にばらつきを有している事が考えられた。また、(2)概日リズム障害マウスモデルと比較して今回検討に協力頂いたボランティアシフトワーカーの概日リズム障害の程度が軽い事が寄与している可能性が示唆された。タクシー運転手や消防署勤務者、海上自衛隊船内勤務者など、より顕著なシフトワーク業務に従事している対象者での検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ma Yanling, Belyaeva Olga V., Brown Philip M., Fujita Koji, Valles Katherine, Karki Suman, Chen Vincent, Speliotes Elizabeth K., Nestlerode Cara, Thomas Emmanuel, Kleiner David E., Zmuda Joseph M., Sanyal Arun J., Kedishvili Natalia Y., Liang T. Jake, Rotman Yaron,	4. 巻 69
2. 論文標題 17 Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase 13?Is a Hepatic Retinol Dehydrogenase Associated With Histological Features of Nonalcoholic Fatty Liver Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1504 ~ 1519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.30350	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 該当する

1. 著者名 Honda Yasushi, Kessoku Takaomi, Ogawa Yuji, Tomeno Wataru, Imajo Kento, Fujita Koji, Yoneda Masato, YSaito Satoru, Ono Masafumi, Oeda Satoshi, Eguchi Yuichiro, Aoi Wataru, Sato Kenji, Itoh Yoshito, Nakajima Atsushi	4. 巻 17
2. 論文標題 Efficacy of glutathione for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an open-label, single-arm, multicenter, pilot study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-017-0652-3	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 該当する

1. 著者名 Imajo Kento, Kessoku Takaomi, Honda Yasushi, Tomeno Wataru, Ogawa Yuji, Mawatari Hironori, Fujita Koji, Yoneda Masato, Taguri Masataka, Hyogo Hideyuki, Sumida Yoshio, Ono Masafumi, Eguchi Yuichiro, Inoue Tomio, Yamanaka Takeharu, Wada Koichiro, Saito Satoru, Nakajima Atsushi	4. 巻 150
2. 論文標題 Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 626 ~ 637. e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2015.11.048	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 該当する

1. 著者名 Honda Yasushi, Imajo Kento, Kato Takayuki, Kessoku Takaomi, Ogawa Yuji, Tomeno Wataru, Kato Shingo, Mawatari Hironori, Fujita Koji, Yoneda Masato, Saito Satoru, Nakajima Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 The Selective SGLT2 Inhibitor Ipragliflozin Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0146337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0146337	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 該当する

1. 著者名 Honda Yasushi、Yoneda Masato、Kessoku Takaomi、Ogawa Yuji、Tomeno Wataru、Imajo Kento、Mawatari Hironori、Fujita Koji、Hyogo Hideyuki、Ueno Takato、Chayama Kazuaki、Saito Satoru、Nakajima Atsushi、Hotta Kikuko	4. 巻 46
2. 論文標題 Characteristics of non-obese non-alcoholic fatty liver disease: Effect of genetic and environmental factors	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1011～1018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.12648	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 該当する

1. 著者名 Ogawa Yuji、Imajo Kento、Honda Yasushi、Kessoku Takaomi、Tomeno Wataru、Kato Shingo、Fujita Koji、Yoneda Masato、Saito Satoru、Saigusa Yusuke、Hyogo Hideyuki、Sumida Yoshio、Itoh Yoshito、Eguchi Kosei、Yamanaka Takeharu、Wada Koichiro、Nakajima Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Palmitate-induced lipotoxicity is crucial for the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in cooperation with gut-derived endotoxin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29735-6	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----