

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08291

研究課題名(和文) 時計遺伝子BMAL1によるエネルギー代謝を中心とした骨格筋機能の制御メカニズム

研究課題名(英文) Regulatory roles of BMAL1 in the regulation of energy metabolism in the skeletal muscle

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、体内時計システムによる骨格筋機能の調節機構を明らかにし、その知見を基にメタボリックシンドロームの時間薬物治療の分子基盤を提示することである。その目的を達成するため、体内時計調節において中心的な転写因子であるBMAL1を骨格筋特異的に欠損したマウス(M-BMAL1 KOマウス)を作製し、そのエネルギー代謝に関する特徴を生化学的及び病理学的観点から解析した。その結果、骨格筋においてBMAL1は、カルシウム量並びに酸素受容量の制御を行うこと、そしてこれらを介して脂肪酸燃焼並びにそれに続くエネルギー代謝を調節していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの疫学研究により不規則な生活時間を過ごすことが糖尿病などの代謝性疾患発症の一因となることが示されている。本研究では、その分子メカニズムを明らかにする目的で骨格筋特異的に体内時計システムを欠損したマウスの解析を行った。その結果、骨格筋における体内時計システムは、カルシウム量の調節を介して酸素受容量を制御すること、そしてこの制御が肥満時における骨格筋の糖代謝活性を決定することを明らかにした。これらの研究成果は、生活習慣病予防における「規則正しい生活」の励行に科学的エビデンスを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the regulation mechanism of skeletal muscle function by the biological clock system, and to present the molecular basis of the time drug treatment of metabolic syndrome based on the knowledge. In order to achieve this goal, we generated mice with a skeletal muscle-specific deletion of BMAL1, a key transcription factor in biological clock control (M-BMAL1KO mice), and analyzed the characteristics of their energy metabolism from biochemical and pathological viewpoints. The results showed that BMAL1 regulates calcium and oxygen uptake and through this regulates fatty acid combustion and subsequent energy metabolism in skeletal muscle.

研究分野：生化学、代謝学

キーワード：BMAL1 骨格筋 体内時計

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、高血圧及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(厚労省国民栄養調査)。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まとめられ、その結果においても虚血性心疾患による死亡のリスクがシフトワークにより増大することが示されている(Fujino et al. *Am J Epidemiol.* 2006)。これらの結果は、生活時間帯のシフトによる体内時計システムの乱れが、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おり、事実、我々は、体内時計システムを失ったマウスにおいて、糖尿病ならびに脂質異常症が発症する事を明らかにした(Shimba et al. *Plos one* 2011)。

体内時計システムは複数の時計遺伝子から構成されており、時計遺伝子の中でも転写因子 Brain-Muscle Arn't Like Protein (BMAL1) が中心的な役割を果たす。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。BMAL1 は、ほぼ全身の臓器において発現を示すが、その名が示すように、特に脳そして骨格筋において高い発現を示す。脳において、BMAL1 は視交叉上核に高い発現を示すことから、行動の概日リズム調節を司ると考えられている。一方、骨格筋における BMAL1 の役割は明らかではない。しかしながら(1)骨格筋が全身のエネルギー代謝の中心的臓器であること、そして上述したように(2)BMAL1 の発現量が骨格筋において極めて高いこと、さらには(3)全身における BMAL1 の欠損が代謝性疾患を招く事実は、骨格筋機能、特にエネルギー代謝調節における BMAL1 の重要性を予感させる。そこで我々は、骨格筋特異的に BMAL1 を欠損したマウス(M-BMAL1 KO マウス)を作製した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、体内時計システムの乱れによるメタボリックシンドローム発症機序を明らかにし、メタボリックシンドロームに対する時間薬物治療の分子基盤を提示することである。この目的を達成するため、体内時計制御因子である BMAL1 を骨格筋特異的に欠損したマウス(M-BMAL1 KO マウス)に関して、エネルギー代謝調節に関連した特徴を多面的(生化学的、病理学的、糖・脂質代謝活性、シグナル伝達さらには遺伝子発現)に解析することで体内時計システムによる骨格筋機能(主にエネルギー代謝)の調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) M-BMAL1 KO マウスの生化学的・病理学的解析

全身のエネルギー代謝の中心的臓器である骨格筋において体内時計システムの欠損は、

多くの代謝機能に変化をもたらすと予想できる。そこで本マウスの詳細な生化学的ならびに生理学的な特徴を明らかにする目的で、マウスを通常食ならびに高脂肪食（12 週間）下で飼育し、以下のパラメーターを解析した。

- ① 体重、摂餌量、組織（骨格筋および精巣上体脂肪組織）重量、握力（グリップストレッチ）、血液パラメーター（コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸およびアディポサイトカイン類）量を測定した。
- ② 大腿部より採取した骨格筋および精巣上体脂肪組織に関して病理組織切片を作製し、視野面積あたりの細胞数ならびに大きさを定性的に観察した。骨格筋組織に関しては、併せて電子顕微鏡写真を撮影し、Z 帯構造ならびにミトコンドリアを中心に細胞内の微細構造における変化を観察した。ミトコンドリア DNA 量を qPCR により定量した。またミトコンドリア由来遺伝子の発現量に関する測定も行った。
- ③ 骨格筋における中性脂肪蓄積量並びに脂質代謝に関連した因子の遺伝子発現を検討した。また肝臓における中性脂肪蓄積量ならびに遺伝子発現量も測定し、骨格筋における変化が他の臓器に対して与える影響の有無を解析した。
- ④ 自発的行動量ならびにその概日リズムを測定した。自発的行動量の測定には輪まわし行動量を用いる場合が多いが、骨格筋の持久力の変化が輪まわし行動量の値に影響を与える可能性が十分に考えられる。そこで本研究では、赤外線行動量センサーを用いて自発的な行動を解析した。また持久力に関しては以下（3）において検討した。

（2）耐糖能ならびにインスリン感受性の検討

代謝調節における骨格筋の主たる役割のひとつは、インスリン依存的な糖の取込みである。そこで M-BMAL1 KO マウスの耐糖能ならびにインスリン感受性を検討した。

通常食あるいは高脂肪食下で飼育した M-BMAL1 KO マウスならびにコントロールマウスにグルコース負荷を行い、その後 2 時間に渡って血糖値ならびに血中インスリン量を測定した。またインスリン負荷を行い、負荷後 2 時間に渡る血糖値の変化を測定した。

（3）脂質燃焼活性の検討

骨格筋は、高い酸素消費能を利用して脂質燃焼を司る。そこで M-BMAL1 KO マウスにおける酸素消費能ならびに脂質燃焼活性を以下の方法で評価した。

- ① 通常食あるいは高脂肪食により飼育したマウスに関して 24 時間にわたり呼吸商（酸素吸入量・二酸化炭素排出量）を測定した。
- ② 骨格筋より調製した切片を用いて ATPase 染色ならびに COX 染色を行い、エネルギー代謝を定性的に測定した。
- ③ 各タイプのみオシン重鎖、トロポニンならびに β 酸化に関与した酵素の遺伝子発現を測定した。また β 酸化関連酵素に関しては、活性も測定した。
- ④ トレッドミルシステム上において強制走行を行う。走行を自発的に停止したまでの時間ならびに走行距離から持久力を評価した。

（4）骨格筋におけるカルシウム依存性シグナル伝達の解析

骨格筋の機能発現には複数のカルシウム依存性シグナルが重要な役割を果たす。本研究では、それらの中でもエネルギー代謝調節に関与したシグナル伝達に焦点を絞り以下の解析を行った。

- ① 血液中ならびに骨格筋中のカルシウム量を 24 時間にわたり測定した。
- ② 骨格筋におけるカルシウムチャネルサブユニットの遺伝子発現量を 24 時間にわたり解析した。

- ③ 骨格筋においてカルシウムは、筋細胞形成に必須である転写因子 NFAT の核移行を促す。そこで組織切片を作製し、NFAT の核移行を免疫染色により検出した。またウエスタンブロッティングにより核画分中の NFAT を検出した。これらの解析から NFAT の核移行の程度を評価した。
- ④ 骨格筋における代謝調節に関わるカルシウム依存性シグナル伝達において、脱リン酸酵素であるカルシニューリンならびにリン酸化酵素である AMP キナーゼが中心的な役割を果たす。そこで両タンパク質量ならびに活性化体量をウエスタンブロッティングにより解析した。

4. 研究成果

通常食を用いて飼育した M-BMAL1 KO マウスの体重、摂餌量、精巢上体脂肪組織、自発的行動量及びその概日リズム、そして血液パラメーター（コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸およびアディポサイトカイン類）量は、BMAL1^{flx/flx} マウス（以下コントロールマウス）のそれらと差異を示さなかった。また骨格筋の電子顕微鏡写真を撮影し、Z 帯構造ならびにミトコンドリアを中心に細胞内の微細構造における変化を観察したが、明らかな違いは認められなかった。一方、M-BMAL1 KO マウスの骨格筋重量、呼吸商及びエネルギー消費量は、コントロールマウスのそれらと比較して著しく増加しており、エネルギー代謝が活性化していることが示された。そこで高脂肪食下で飼育した M-BMAL1 KO マウスを解析した。高脂肪食飼育下において M-BMAL1 KO マウスは、食事依存性の体重増加、血液パラメーターの悪化及び異所性脂肪の蓄積に対して抵抗性を示した。また通常食飼育下では変化を示さなかった耐糖能及びインスリン感受性に関しても肥満に伴うスコアの悪化に対して抵抗性を示した。以上の結果より、骨格筋において BMAL1 は、脂肪酸燃焼の制御を介してエネルギー代謝を調節していることが示された。

次いでエネルギー代謝に関する特徴を骨格筋における遺伝子発現の観点から解析した。高脂肪食条件下において、M-BMAL1 KO マウスでは脂肪酸取り込みに関わるトランスポーター類や β 酸化関連因子、そして血管新生関連因子の遺伝子発現が著しく増加していた。これらの遺伝子の中には、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α 、超長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ、短鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 および 2、脂肪酸輸送蛋白質 1 および 4、そして血管内皮成長因子受容体が含まれた。対照的にステアロイル補酵素デカルボキシラーゼ 1 をはじめとする脂肪酸合成に関与するの遺伝子発現は、M-BMAL1 KO マウスにおいて有意に減少していた。ミトコンドリア合成に関与する遺伝子の発現レベルに関して、コントロールマウスと MKO マウスの間に有意差は見られなかった。トレッドミル上での走行試験において M-BMAL1 KO マウスの走行距離及び持久力は有意にコントロールマウスそれに比較して優れていた。

以上の結果より BMAL1 は、骨格筋内における酸素受容量の調節することで脂肪酸燃焼を制御することが示された。

さらに BMAL1 による脂肪酸燃焼のメカニズムを明らかにする目的で M-BMAL1 KO マウス骨格筋を生化学的に解析した。その結果、ミオグロビン及びトロポニン I_{slow} の発現量増加が認められ、この事が前年度に明らかにした M-BMAL1 KO マウスにおける酸素受容量の増大の要因であると示唆された。次いで、これらの遺伝子発現を制御する転写因子 NFAT に関して解析を行ったところ、M-BMAL1 KO マウス骨格筋において NFAT の核移行の促進が見られた。そこで NFAT の核移行の調節因子である細胞内カルシウム量を測定したところ、M-BMAL1 KO マウス骨格筋において有意なカルシウム量の上昇が認められた。さらに BMAL1 はカルシウムチャネルのサブユニットである Cacna1s の発現量を別の転写制御因子である REV-ERB α を介して調節していることが示された。以上の結果より BMAL1 は、骨格筋内におけるカルシウム量の制御を通じて遅

筋活性を調節することが明らかとなった。

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 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wada T, Ichihashi Y, Suzuki E, Kosuge Y, Ishige K, Uchiyama T, Makishima M, Nakao R, Oishi K, Shimba S.	4. 巻 18
2. 論文標題 Deletion of Bmal1 Prevents Diet-Induced Ectopic Fat Accumulation by Controlling Oxidative Capacity in the Skeletal Muscle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19092813.	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 Kawai M, Kinoshita S, Yamazaki M, Yamamoto K, Rosen CJ, Shimba S, Ozono K, Michigami T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Intestinal clock system regulates skeletal homeostasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.121798.	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 Hirai S, Hayashi Y, Ito M, Amemiya T, Dezawa K, Arai Y, Ejima KI, Shimba S, Honda K.	4. 巻 60
2. 論文標題 Micro-CT observation of in vivo temporal change in mandibular condyle morphology in BMAL1 knockout mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Sci.	6. 最初と最後の頁 473-478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0390.	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 Sengiku A, Ueda M, Kono J, Sano T, Nishikawa N, Kunisue S, Tsujihana K, Liou LS, Kanematsu A, Shimba S, Doi M, Okamura H, Ogawa O, Negoro H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Circadian coordination of ATP release in the urothelium via connexin43 hemichannels.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20379-0.	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 Nakahata Y, Yasukawa S, Khaidizar FD, Shimba S, Matsui T, Bessho Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Bmal1-deficient mouse fibroblast cells do not provide premature cellular senescence in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chronobiol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2018.1430038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakao R, Shimba S, Oishi K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Ketogenic diet induces expression of the muscle circadian gene Slc25a25 via neural pathway that might be involved in muscle thermogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-017-03119-8	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 -

[学会発表] 計19件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 Deletion of Bmal1 prevents diet-induced ectopic fat accumulation by controlling oxidative capacity in the skeletal muscle
3. 学会等名 Keystone symposium: New Insights into the Biology of Exercise (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 Mice lacking Ah receptor in adipose tissue are resistant to high fat diet-induced adipose tissue inflammation and diabetes
3. 学会等名 Keystone symposium: Obesity and NAFLD-Mechanisms and Therapeutics- (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計の破綻による糖尿病発症とその分子メカニズム
3. 学会等名 第18回小樽糖尿病循環器カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による血糖調節とその加齢による変化
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榛葉繁紀
2. 発表標題 アンチ・ドーピング教育及び研究における大学の取組み
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による脂肪細胞機能の制御
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 マウスにおける光曝露は末梢組織における代謝を貯蔵方向に誘導する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による骨格筋のCaシグナル伝達
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1によるエネルギー代謝を中心とした骨格筋機能の制御
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榛葉繁紀 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計による臓器連関の制御とエネルギー代謝
3. 学会等名 第50回 近畿小児内分泌研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酢田萌、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 脂肪組織における体内時計システムの変調が前立腺に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 Circadian clock system regulates biliary lipid secretion
3. 学会等名 2018 MD0/JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による骨格筋エネルギー代謝の調節
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システム調節を司る低分子化合物による炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第61回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 アディポネクチンによる時間特異的代謝制御
3. 学会等名 第61回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システムを介した脂肪組織 精巣間クロストークによる血中テストステロン量の制御
3. 学会等名 第61回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 光刺激による肝臓及び脂肪組織における活性酸素産生
3. 学会等名 第61回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システムによる尿酸代謝制御とシフトワークによるその破綻
3. 学会等名 第61回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榛葉繁紀
2. 発表標題 肝臓 脳 脂肪組織間クロストークを介した 時計遺伝子BMAL1によるエネルギー代謝制御
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

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