

令和元年6月24日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15600

研究課題名（和文）摂食刺激による概日時計位相調節機構の解明

研究課題名（英文）Investigation on mechanisms of feeding-induced circadian phase adjustment

研究代表者

松村 律子 (Matsumura, Ritsuko)

山口大学・時間学研究所・助教（特命）

研究者番号：20728216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：臓器などに存在する末梢の概日時計（約24時間周期の体内時計）の位相が、摂食によって調節されることがわかっている。本研究では、摂食によって誘導される内分泌物質に着目し、摂食による概日時計位相調節に関与する物質の同定を行った。摂食直後に血中濃度が上昇すると報告されている10種類のペプチドホルモンを選び、そのうちの2種が、*ex vivo*組織培養法において各々特定の臓器および組織に対する位相調節作用を持つことを明らかにした。また、これらが作用しやすいタイミング（位相応答性）が存在することもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々のこれまでの研究で、インスリンが特定の臓器や組織の概日時計の位相調節に関与することを明らかにしている。インスリン以外の他の内分泌系が関与している可能性に注目した本研究の成果は、概日時計における摂食刺激の作用機序の全体像を捉える端緒となり、概日時計に関する学術的な発展に大きく貢献し得る。概日時計と食事の関係は、食育・予防医学・健康科学などの幅広い分野で応用されている。メカニズムの理解が進むことによって、光環境などによる概日時計と生活（社会活動）との不調和に起因する体調不良や発病に対し、食による概日時計位相調節機能の強化といった応用に発展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）： Feeding induces phase resetting of peripheral circadian clock. In this study, we focused on feeding-regulated endocrine substances and aimed to identify the substances involved in the feeding-induced circadian phase adjustment. Two peptide hormones out of 10 we selected that are known to increase in blood concentration immediately after feeding had tissue-specific phase shift effects in *ex vivo* tissue culture method. The two peptides also showed circadian phase responsivity.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 摂食 位相調節 ペプチドホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体における多くの行動や生理機能は、概日リズム(約1日周期の日内変動)を呈する。概日リズムのペースメーカーとして機能するのが、「概日時計(約24時間周期の体内時計)」である。概日時計は「時計遺伝子」と呼ばれる遺伝子群により構成されている。時計遺伝子は、転写促進されて時計タンパクが増えると、それがシグナルとなって自身の転写を抑制する(ネガティブフィードバック)。これが、約1日の周期で繰り返されることでリズムを刻んでいる(文献1)。生体機能の概日リズムの発振源は、この時計遺伝子発現の増減である。

概日時計は、位相調節(時計で言うところの時刻合わせ)が適切に行われることで、昼夜の環境リズムと同調する。これによって身体の恒常性が維持される。しかしながら、現代人を取り巻く生活環境や生活習慣は、概日時計と環境リズムとの「ずれ」を頻繁に発生させている。主な原因は、24時間型といわれる不規則な生活リズムや夜間光の氾濫である。ずれが慢性的に持続することは、長期の時差ぼけを患っている状態に似ている。このことは、恒常性維持機構の破綻と多臓器負担の蓄積の原因となって睡眠障害・精神疾患・糖尿病・循環器疾患・がんなどの多岐に渡る現代疾患リスクになる(文献2)。

概日時計の位相調節には光と摂食が強く関与する。多くの研究成果によって、光が概日時計を調節するメカニズムについては詳細が明らかにされてきた。光による位相調節の研究対象は、主には網膜から視交叉上核(視床下部に存在する概日時計中枢であり、全身の細胞の概日時計を同調させる役割を担う組織)までの神経情報伝達の解明であり、標的となる組織および分子が比較的絞りやすく研究が進みやすかった。しかしながら、摂食による位相調節機構については、関わる組織や分子が多岐にわたるために、不明な点が多く残されたままであった。

2. 研究の目的

これまでの多くの研究成果によって、光が概日時計の位相を調節するメカニズムについては詳細が明らかにされてきた。一方で、摂食による位相調節機構については、検討が進んでいない。本研究はメカニズム解明の端緒として、摂食による概日時計の位相調節に関わる物質の同定を目的とした。

3. 研究の方法

摂食という刺激が全身の広範な組織や細胞に入力情報が伝達されるには、液性因子であると都合が良いと想定される。そこで、摂食直後に血漿中の濃度上昇が起こるペプチドホルモンに注目した。ヒトやマウスにおいて、摂食により素早く血中濃度が上昇することが報告されている10種類のペプチドホルモンを選び、供試した。下記の要領でスクリーニングを行い、遺伝子改変マウスを作成して個体レベルでの検証を行うこととした。

(1) 候補ペプチドホルモンのスクリーニング

ex vivo 組織培養系を用いて、概日時計の位相(時計遺伝子発現リズムの位相)を変化させるものを探索する。具体的な方法は以下の通りである。マウスから摘出した臓器を素早く薄切する。使用するマウスの系統は、時計遺伝子 *Period2* の遺伝子座にホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入したノックインマウスとした(文献3)。このマウスでは、PER2 タンパク質とホタルルシフェラーゼタンパク質が融合して発現しており、発光レベルとして PER2 の発現量を検出することができる。検証する組織は、肝臓・腎臓・膵臓・肺・顎下腺・骨格筋・胃・小腸・大腸・脂肪組織とした。スライス組織はメンブレンに乗せて培養した。培養液にはルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを 0.1 mM の濃度で加えておく。微弱発光測定器により、スライス組織の発光値を1分間積算し、15分間隔でデータを集積する。発光量は、時計遺伝子 *Period2* の発現を反映しており、約24時間周期の波形となる(図1)。測定の途中で培養液へペプチドを添加し、発光リズムの位相変化を検証する。ペプチドの添加は、添加するタイミングによって変化量や方向性が異なる可能性(位相応答性)を考慮した。すなわち、発光値の波形に基づいた、概日リズムの上昇位相および下降位相の2つのタイミングで添加した。*ex vivo* 組織培養法では、細胞への到達性や培養液の組成など考慮すべき多くの要素があり、作用するペプチドの濃度は一般的に生体内での血中濃度より高くなると想定される。よって、添加するペプチドホルモンの濃度は生体内での血中濃度より大幅に高く設定した。

発光リズムの位相に変化が見られたペプチドホルモンについては、同様の方法で濃度依存性の検証を行った。スクリーニング時の濃度を1として、1/10000までの10分の1希釈系列の濃度を設定した。

(2) マウス個体での *in vivo* 機能検証

選抜されたペプチドホルモンの受容体をノックアウトしたマウスを用いて、個体レベルで位相調節作用を検討することとした。ノックアウトマウスは、近年確立された GONAD 法と呼ばれる手法を用いて作成を試みた。GONAD 法の特徴は、胚操作が不要であり、短期間でゲノム編集マウスを得られることである。これらのノックアウトマウスについて、通常と摂餌のタイミングをずらした時の概日リズムの応答性を調べる。野生型マウスでは素早い応答を示して位相が変化するのに対し、位相変化が遅いなどの違いがみられるはずである。概日リズムの位相は、内在の時計遺伝子の発現量から調べる。具体的には、24時間の間に数時間おきに採取した臓器から、時計遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定する。位相の違いは、発現量のピーク時刻のずれとして認知できる。

4. 研究成果

(1) 摂食刺激による概日時計位相調節に関わる候補ペプチドホルモンの選定

ex vivo 組織培養系を用いたスクリーニングによって、供試した 10 種類のペプチドホルモン（データは未発表であるため、ここではペプチドの実名は非公開としペプチド A-J とする）のうち、摂食刺激による概日時計位相調節に関わるペプチドホルモンの候補として、ペプチド B と C を選抜できた。また、これらの 2 種のペプチドホルモンの位相調節作用には、組織特異性および位相応答性があることも明らかとなった。ペプチド B は、大動脈において、下降位相投与で位相を遅延させる効果を、ペプチド C は、膵臓において、下降位相投与で位相を前進させる効果を持つことがわかった（図 1）。これらの効果には濃度依存性があり、スクリーニング時の 1/100 程度まで濃度を下げても位相の変化が観察された。*ex vivo* 組織培養系においては、作用するペプチドの濃度は一般的に生体内での血中濃度より高くなることを併せて考えると、選抜したペプチドは生体内でも作用していると判断した。

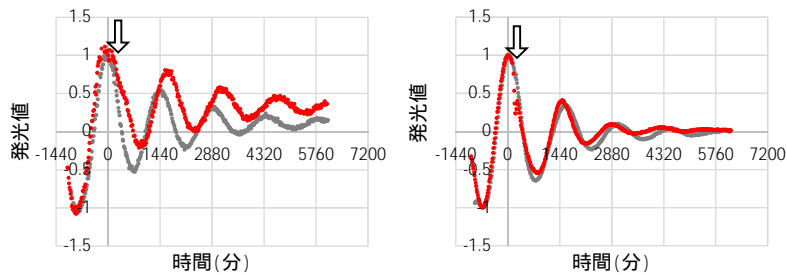


図 1. ペプチド B (左) および C (右) の位相調節作用。矢印のタイミングでペプチドを添加した。コントロール (-) の波形に対し、ペプチド添加 (-) では位相がずれている。発光値は第一ピークの振幅を 1 として補正してある。

(2) 個体レベルでの *in vivo* 機能検証

選抜した候補ペプチドホルモンの生体内での作用を検証するため、当該ペプチドの受容体をノックアウトした遺伝子改変マウスを用いることとした。しかしながら、ノックアウトマウスの作成に時間を要し、研究の進捗がやや遅れた。よって、ここまでの進捗状況を報告する。

ペプチド B のノックアウトマウス作成

ペプチド B については、特異的に受容体をノックアウトすることが困難であることが判明したため、B 遺伝子をノックアウトすることとした。作成のために、近年開発された GONAD (Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) 法と呼ばれる手法を導入した。GONAD 法は、生体の卵管内の受精卵に、エレクトロポレーション法によりゲノム編集ツール CRISPR/Cas9 用のタンパク質およびガイド RNA を直接導入する方法である。そのため、生まれくる仔マウスは既にゲノム編集されており、短期間で遺伝子改変マウスを得ることができる。この手法では、受精卵へ確実に試薬を導入することが成功の鍵となることから、蛍光試薬ローダミンを用いての予備実験を行った。受精卵へのローダミン導入操作を行った後、卵管から受精卵を取り出し蛍光顕微鏡で観察すると、受精卵が赤く蛍光を発しており、導入の成功を確認できた（図 2）。ターゲット遺伝子を破壊するためのガイド RNA や Cas9 タンパク質の準備ができており、間もなくこれらを用いて実施する予定である。

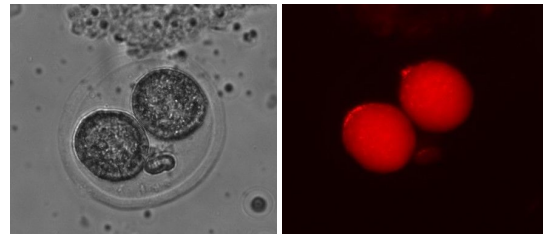


図 2. 蛍光試薬ローダミンを用いて GONAD 法を施術したマウス受精卵。施術翌日に卵管から取り出す頃には 2 細胞になっている。左：明視野画像，右：蛍光画像

ペプチド C の受容体阻害実験

ペプチド C については、関与する受容体が 2 種類存在する。*ex vivo* 組織培養法において、アンタゴニストを用いた阻害実験を行ったところ、想定に反して両方が位相調節に関与していることが示唆された。両受容体をノックアウトすることは、考慮すべき要素が増え、検証が複雑になることが想定されることから、ペプチド C についても、C 遺伝子をノックアウトすることとした。このマウスについては、購入による入手を検討している。

以上のように、マウス個体レベルでの機能検証を行う準備が整いつつある。今後継続し、個体での検証結果までを論文にまとめて公表したい。私たちの研究室では、摂食による概日時計の位相調節メカニズムとして、摂食時の血糖上昇に反応してすい臓より分泌されるインスリンが、特定の臓器や組織の概日時計の位相調節に関与することを明らかにした。インスリン以外の他の内分泌系が関与している可能性に注目した今回の研究によって、概日時計における摂食刺激の作用機序の全体像を捉えることができれば、概日時計に関する学術的な発展に大きく貢献し得る。

- (文献1) Kume K, Zylka MJ, Sriram S *et al.* *Cell*. 1999;98:193-205
(文献2) Baron KG, Reid KJ. *Int Rev Psychiatry*. 2014;26:139-154
(文献3) Yoo SH, Yamazaki S *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(15):5339-46

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Role of the clock gene *Period3* in the human cell-autonomous circadian clock.

Matsumura R, Akashi M

Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 24(2) 162-171 2019年2月
査読有

2. Normal peripheral circadian phase in the old-old with abnormal circadian behavior.

Yamaguchi A, Tatsumoto M, Matsumura R, Endo T, Hirata K, Tokuda I, Akashi M

Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 23(10) 849-859 2018年8月
査読有

3. Involvement of the luteinizing hormone surge in the regulation of ovary and oviduct clock gene expression in mice.

Kobayashi M, Watanabe K, Matsumura R, Anayama N, Miyamoto A, Miyazaki H, Miyazaki K, Shimizu T, Akashi M

Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 23(8) 649-657 2018年6月
査読有

4. Potential role of the pancreatic hormone insulin in resetting human peripheral clocks.

Kajimoto J, Matsumura R, Node K, Akashi M

Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 23(5) 393-399 2018年5月
査読有

〔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)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

明石 真 (AKASHI, makoto)

山口大学時間学研究所・教授

岡光 理恵 (OKAMITSU, rie)

山口大学時間学研究所・技術補佐員

澤井 裕香 (SAWAI, yuka)

山口大学大学院・博士前期課程

梶原 滉平 (KAJIHARA, kohei)

山口大学大学院・博士前期課程

隅野 純子 (SUMINO, jyunko)

山口大学時間学研究所・技術補佐員