

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2019

課題番号：17KK0198

研究課題名（和文）中枢 - 末梢組織連関の破綻が引き起す末梢時計障害の機序解明

研究課題名（英文）Mechanism of peripheral clock abnormalities caused by disturbance of central-peripheral tissue linkage

研究代表者

牛島 健太郎 (Ushijima, Kentaro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70448843

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,600,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：糖尿病マウスの脂肪組織において時計遺伝子の発現が低下する機序について、レプチンシグナルの側面から検討を行った。遺伝子の転写活性および遺伝子発現量を測定した結果、脂肪組織内の末梢時計障害について、視床下部由来レプチンシグナルの影響は小さいと考えられた。一方、上流時計遺伝子の1つであるBmal1を欠損すると、カルシウムシグナル入力による標的タンパク質のリン酸化が遷延すること、この影響は膵細胞に特異的であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢組織における体内時計の異常が、糖尿病などの代謝性疾患を引き起こすことを支持する知見が集積している。本研究の成果は、インスリン分泌によりエネルギー代謝調節に寄与する膵細胞において、体内時計による臓器特異的な細胞機能調節機構の存在を示唆するものである。本研究は体内時計異常が糖尿病を引き起す機序解明の一端を担うものであり、本研究の成果は、体内時計およびその調節システムを指標とした糖尿病治療薬の創薬シーズを探索する研究へ発展できると期待される。

研究成果の概要（英文）：I investigated a mechanism by which the expression of the clock gene is reduced in the adipose tissue of diabetic mice from the aspect of leptin signaling.

Experiments of measuring histone modification levels and mRNA expression level of the target clock genes suggested that the hypothalamic leptin signal only exerts a small effect on the impairment of the peripheral clock function in adipose tissue.

On the other hand, I have clarified that deletion of Bmal1, one of the upstream clock genes, prolonged phosphorylation of target proteins responding to intracellular calcium signal, and that this effect was specific to pancreatic cells.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 糖尿病 臓器連関

1. 研究開始当初の背景

生体の様々な生理機能には約 24 時間を 1 周期とする概日リズムが存在しており、“時計遺伝子”と呼ばれる遺伝子群により厳密に制御されている。生体リズムの異常、すなわち時計遺伝子の異常は癌や心血管疾患などの発症に密接に関連しているものと考えられている。時計遺伝子の 1 つである *Clock* の変異マウスがメタボリックシンドローム様症状を呈することが報告され (Turek et al., *Nature*, 1043, 2005)、それ以降、生活習慣病と体内時計の関連性について多くの研究が行われた。その中でも、時計遺伝子の 1 つである *Bmal1* による脂質代謝制御の分子機構が明らかになりつつある (Shimba et al., *Proc Natl Acad Sci*, 12071, 2005; Paschos et al., *Nature Med*, 1768, 2012)。一方、近年の疫学調査によると、交代勤務者では脂質代謝だけでなくインスリン感受性も悪化していることが明らかにされており (Esquirol et al., *Chronobiol Int*, 1258, 2012)、体内時計による糖代謝制御機構が存在するものと推察される。

我々はこれまでに糖尿病モデルマウス (*ob/ob* マウス) を用いて基礎研究を行い、時計遺伝子の発現異常は糖代謝異常の出現に先行することを明らかにした (*Chronobiol Int*, 2012)。続いて、*ob/ob* マウスの末梢臓器における時計遺伝子 *Dbp* 発現異常はエピゲノムレベルでの異常 (H3 ヒストンのアセチル化レベルの低下) に起因すること、このエピゲノム異常を是正することによりマウスのインスリン感受性が改善することを明らかにした (*Chronobiol Int*, 2019)。これらの成績は、時計遺伝子の発現異常は糖代謝異常の結果ではなく、原因であることを示唆するものである。

次の課題は、時計遺伝子 *Dbp* の発現量が糖尿病マウスの末梢組織で低下する機序を明らかにすることである。前述の研究で使用した *ob/ob* マウスは、変異型レプチンを分泌するマウスであり、細胞内レプチンシグナルが欠損している。この遺伝的変異に着目すると、レプチンシグナルの低下が末梢組織内の *Dbp* 発現低下を引き起こすものと予想される。しかし、脂肪細胞が分泌するレプチンの主な作用点は視床下部であり、末梢組織の全てにレプチン受容体は発現していない。したがって、糖尿病発症時に末梢組織内の *Dbp* 発現量が低下する機序を解明するためには、それぞれの末梢組織に限局したシステムの検討ではなく、中枢 (視床下部) - 末梢組織間の臓器連関に着目した検討が必要である。

2. 研究の目的

末梢組織における *Dbp* の発現低下の機序をレプチンシグナルの側面から解明するためには、視床下部からの下向性シグナルに着目した検討が不可欠である。そこで本研究では、「視床下部に入力されるレプチンシグナルの欠損や低下が、末梢組織にある時計調節機能を障害する」を作業仮説として検討を行う。具体的には、視床下部におけるレプチンシグナルを欠損させたマウスを作製し、脂肪組織をはじめ末梢時計への影響 (各時計遺伝子 mRNA 発現量およびヒストン修飾レベル) を網羅的かつ定量的に評価する。

また、時計遺伝子 *Dbp* 発現の概日リズムは、その上位コア時計遺伝子による転写調節のフィードバックループの支配下にある。そのコア時計遺伝子の中で転写活性化を担う遺伝子の 1 つが *Bmal1* である。本研究では、この *Bmal1* にも着目し、*Dbp* を含めた下流遺伝子の発現調節および細胞内シグナル伝達に及ぼす *Bmal1* の影響について、遺伝子改変マウスから調製した培養細胞株を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雄性 B6 マウスの視床下部第 3 脳室内に、レプチン受容体に対する siRNA を *in vivo* リポフェクション法を用いて投与してレプチンシグナルを消失させた。投与一週間後に、末梢臓器 (脂肪組織、肝臓、膵臓および骨格筋) を採取し、における時計遺伝子群の発現量およびヒストン修飾を解析した。総 RNA は、Trizol を用いたフェノール/クロロホルム法により抽出した。逆転写して cDNA を得たのち、SYBR Green を用いた real-time PCR 法により各時計遺伝子 mRNA 発現量を定量した。また、採取した組織をクロマチンで固定したのち、超音波破碎法によりクロマチン断片を調製した。この断片化サンプルを用いて、ヒストン H3 およびヒストン H4 の修飾レベルを、Multiplex Assay Kit を用いて網羅的に解析した。

(2) *Bmal1* ノックアウトマウスおよび対照マウスの膵臓からそれぞれ pseudo islet を作製し、20%FBS を含む DMEM 培地で細胞を継代培養した。細胞を 6-well プレートに播種した 24 時間後に、培地を FBS 不含 DMEM 培地中に交換して、forskolin で細胞を 2 時間刺激した。刺激開始前、30 分および 120 分後に細胞を回収して核タンパク質を抽出し、電気泳動および western blot 法により目的タンパク質の発現量を定量した。

4. 研究成果

我々の研究グループが *ob/ob* マウスを用いて行った先行研究において、*Dbp* 遺伝子周囲のヒストン低アセチル化および mRNA 発現量低下は、末梢臓器のうち内臓脂肪組織で顕著であり、肝臓および骨格筋におけるヒストン修飾異常は小さいものであった。

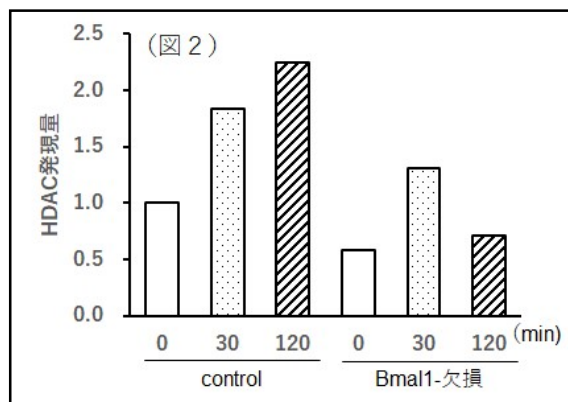
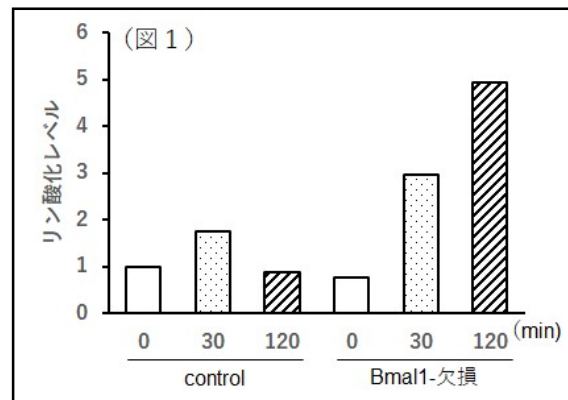
そこでまず、マウスの精巣上体脂肪組織に着目して検討を開始した。視床下部内レプチン受容体低発現マウスおよび対照マウスを用いて、脂肪組織内の時計遺伝子 mRNA 発現量を測定した。その結果、前述の *Dbp* をはじめ、体内時計のコア・フィードバックループを形成する時計遺伝子群 (*Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, および *Cry1*) の mRNA 発現レベルには、レプチン受容体低発現マウスと対照マウスの間で著明な差を認めなかった。さらに、ヒストン H3 およびヒストン H4 の修飾レベルについても、両マウスの間で明らかな違いが認められなかった。以上の結果より、糖尿病における脂肪組織内の末梢時計障害について、視床下部由来レプチンシグナルの影響は小さいと考えられた。

他の代謝関連臓器である肝臓、骨格筋および膵臓における解析を今後継続して、末梢組織内の時計機能に及ぼす視床下部由来レプチンシグナルの影響を明らかにしていく。

一方、基課題で注目している *Dbp* 遺伝子の転写活性を調節する上流時計遺伝子の 1 つである *Bmal1* を欠損したマウスにおいて、興味深い知見が得られた。培養細胞を *forskolin* で刺激すると、核内転写因子に一過性のリン酸化—脱リン酸化が観察される。*Bmal1* ノックアウトマウスから調製した培養膵β細胞では、この転写因子のリン酸化が対照細胞よりも遷延することが明らかとなった (図1)。タンパク質 phosphatase 阻害薬を併用した検討の結果から、*Bmal1* 欠損膵β細胞では、タンパク質脱リン酸化酵素活性が低下していることが示唆された。

共同研究者が所有している RNA-シーケンスの結果を解析したところ、膵β細胞ではヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の 1 種の発現が低下していることが判明した。対照のβ細胞では、*forskolin* 刺激後にこの HDAC タンパク質の核内移行が亢進していた一方、*Bmal1* 欠損膵β細胞ではこの HDAC タンパク質の核内移行が減じていることが明らかになった (図2)。さらに、*Bmal1* 欠損マウス由来の細胞で認めたこれら細胞機能の変化は、クロマチン構造変化が起因であることを示唆する所見を得ており、両者の関連について今後も検討を継続する予定である。

以上の通り、時計遺伝子 *Bmal1* を介した膵ラ氏島機能制御の臓器連関および *Bmal1* 欠損による細胞内シグナル伝達経路異常に関する知見を得た。糖尿病やエネルギー代謝異常を引き起こすと考えられる時計遺伝子であるが、レプチンシグナルに注目した検討からその発現異常の起源の解明には至らなかった。今後も引き続き、主要時計遺伝子である *Bmal1* および *Dbp* の発現異常を来たすメカニズムの解明に取り組む必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki C, Ushijima K, Ando H, Kitamura H, Horiguchi M, Akita T, Yamashita C, Fujimura A.	4. 巻 36
2. 論文標題 Induction of Dbp by a histone deacetylase inhibitor is involved in amelioration of insulin sensitivity via adipocyte differentiation in ob/ob mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiol Int	6. 最初と最後の頁 955-968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07420528.2019.1602841	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 -

1. 著者名 Ushijima K, Suzuki C, Kitamura H, Shimada K, Kawata H, Tanaka A, Horie H, Hosoya Y, Imai Y, Yamashita C, Fujimura A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of clock gene Dbp in omental and mesenteric adipose tissue in type 2 diabetic patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care	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） なし	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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	バス ジョセフ (Bass Joseph)	ノースウェスタン大学・Division of Endocrinology, Metabolism and Molecular Medicine・Chief	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ワイデマン ベンジャミン (Weidemann Benjamin)	ノースウェスタン大学・Division of Endocrinology, Metabolism, and Molecular Medicine・MSTP Graduate Student	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	セダナイス ジョナサン (Cedernaes Jonathan)	ノースウェスタン大学・Division of Endocrinology, Metabolism, and Molecular Medicine・Postdoctoral Fellow	