

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：23302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07154

研究課題名(和文) 生物時計システムの制御を基盤とする新規天然薬物の開発

研究課題名(英文) Development of natural products based on regulation of biological clock system

研究代表者

平居 貴生 (Hirai, Takao)

石川県立看護大学・看護学部・教授

研究者番号：80389072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、漢方方剤常用生薬を中心とするエキスライブラリーを用いて、時計遺伝子の転写調節ネットワークを調節する天然物の同定を目指した。BMAL1プロモーター活性を指標にして ROR、Rev-erbに作用するアゴニストの探索を試みた結果、BMAL1 mRNA発現を減少させる生薬抽出エキスを見出した。また、高い活性を示した生薬の主要成分を解析した結果、脂肪前駆細胞の分化制御に関与する可能性が示唆された。また、時計遺伝子は代謝制御ホルモンFGF21の発現制御に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生体時計は基本的生命現象だけでなく、病態解明や治療の標的として注目されている。本研究結果より、時計遺伝子の転写調節ネットワークを標的とする天然薬物の探索は肥満改善薬の創出に向けて有用である可能性が示唆された。また、時計遺伝子の転写調節ネットワークに作用する天然薬物の探索だけでなく、褐色脂肪細胞における時計遺伝子の新たな機能を見出した本研究結果は、時間薬理学に基づいた生活習慣病・高齢化疾患に対する新たな治療や予防法の開発、治療理論の構築に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies indicated that circadian disruptions are associated with metabolic disorders. In this study, we aimed to identify natural products that modulate the transcriptional regulatory network of clock genes using crude herbal drugs frequently used for the preparation of Kampo prescriptions. First, we attempted to search for small molecules acting on ROR or Rev-erb based on the expression pattern of the BMAL1 promoter-driven luciferase gene. As a result, we found several crude drug extracts that decrease BMAL1 mRNA expression. In addition, analysis of the main active constituents of the extracts suggested that it may be involved in the regulation of cell differentiation in adipose progenitor. Furthermore, this study indicated that clock genes were involved in the expression of FGF21. Thus, these results may lead to the development of novel therapeutic agents based on chronopharmacology.

研究分野：分子薬理学

キーワード：時計遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年、生体時計は基本的生命現象だけでなく、病態解明や治療の標的として注目されている。すなわち、時計遺伝子の転写調節ネットワークの異常が、飽食に伴うメタボリック・シンドローム、老齢化と関連する骨粗鬆症、糖尿病、高血圧症といった生活習慣病などの様々な慢性疾患の病因、あるいは病態進行に関与する可能性が示唆されている。
- (2) このような背景から、生体時計によって制御される生体調節因子の同定や、生物時計システムに関連する遺伝子改変マウスを用いた解析が多数報告されるようになった。一方で、生物時計システムが生物機能に関与する可能性が多数報告されているが、生物時計システムを標的とした薬剤が明らかな薬理効果を確立するに至った研究報告は少ない。また、新規の化合物をヒトに適用可能な新薬にするには、莫大な費用と長い年月が必要で、成功例を見ても年々減少傾向である。

2. 研究の目的

- (1) 本研究の学術的背景を鑑み、漢方方剤常用生薬、薬用植物を中心とするエキスライブラリーから成分精査することによって、時計遺伝子の転写調節ネットワークを調節する天然薬物の同定を目指した。また、時間薬理的解析を加えることによって、時計遺伝子の転写調節ネットワークを標的とした天然薬物の開発とメタボリック・シンドローム、糖尿病、高血圧症などの生活習慣病・老齢化疾患に対する新たな治療方法論を提案することを目的とした。
- (2) 脂肪・筋関連細胞における時計遺伝子の機能、病態における時計遺伝子の関与に関しては十分に解明されたとは言えないのが現状である。したがって、細胞レベルおよび個体レベルの両面から間葉系幹細胞、脂肪前駆細胞、あるいは筋・骨関連細胞における生物時計システムの役割の解明することを本研究計画の目的とした。本研究では、これまでの解析によって蓄積された情報を足掛かりに、時計遺伝子 brain and muscle Arnt-like protein-1 (Bmal1)、Rev-erb、Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated/E4 Promoter-Binding Protein (Nfil3/E4BP4) の役割の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 生物時計システムに作用する天然化合物のスクリーニング
生物時計システムに作用する天然薬物のスクリーニングには適切な実験系を構築することが重要である。本研究では、漢方方剤常用生薬、薬用植物抽出エキスをを用いて時計遺伝子 Retioid related Orphan Receptor (ROR) あるいは Rev-erb に対する新規アゴニストの探索を実施した。すなわち、Bmal1 プロモーター活性を指標に、HEK293 細胞を用いて ROR、Rev-erb に対する天然物アゴニストの探索を試みた。
- (2) 時計遺伝子 Rev-erb、Nfil3/E4BP4 の細胞分化における役割の解明
本研究では、時計遺伝子の新規機能を明らかにする目的で、脂肪前駆細胞分化制御における Nfil3/E4BP4 の新規機能解析、筋関連細胞における BMAL1 の機能解析を実施した。具体的には、間葉細胞株 C3H10T1/2 細胞、初代培養褐色脂肪細胞、C2C12 筋芽細胞に対する細胞生物学的手法を用いた解析をおこなった(リアルタイム PCR を用いた細胞分化関連遺伝子の測定、ELISA を用いた機能タンパクの測定)。また、細胞レベルおよび個体レベルの両面から生物時計システムの役割の解明するために、Nfil3/E4BP4 ノックアウトマウスの解析を行った。
- (3) 生物時計システムに作用する薬物の薬理的解析
(1) で明らかとなった時計遺伝子 ROR、Rev-erb に作用する天然物の薬理作用を解析するために、間葉細胞株 C3H10T1/2 細胞、初代培養褐色脂肪細胞、C2C12 筋芽細胞におけるリアルタイム PCR を用いた細胞分化マーカーの測定、ELISA を用いた機能タンパクの測定などを実施した。

4. 研究成果

- (1) 漢方方剤常用生薬抽出エキスライブラリーを用いて BMAL1 プロモーター駆動性のルシフェラーゼ遺伝子の発現パターンを指標にして Rev-erb に作用するアゴニストの探索を試みた。また、Rev-erb の合成アゴニスト SR9009 によって BMAL1 プロモーター活性は有意に減少することを確認した。さらに、BMAL1 プロモーター活性の低下が観察された生薬抽出エキスに関しては、リアルタイム PCR を用いて *BMAL1* 遺伝子発現の測定を実施した。その結果、*BMAL1* mRNA 発現を減少させる 2 つの生薬抽出エキスを見出した。*BMAL1* 遺伝子発現の低下が観察されたイカリソウについて解析した結果、icaritin は BMAL1 プロ

モーター活性を有意に減少させることが判明した。さらに、マウス鼠径部脂肪組織由来の脂肪前駆細胞に対する icaritin の細胞分化能への影響について解析した結果、icaritin による褐色脂肪細胞の分化マーカー *UCP1* の発現変動が観察された。

- (2) 時計遺伝子の転写調節ネットワークに作用することが明らかとなった生薬エキスとその主要成分について、褐色脂肪細胞における標的分子制御に関する解析を行った。時計遺伝子の発現調節には、核内受容体である Rev-erb が中心的な役割を果たすことが既によく知られている。T 細胞の分化決定に必須な転写因子である Nfil3/E4BP4 は核内受容体 Rev-erb の標的分子の一つである。また、代謝制御ホルモン FGF21 の遺伝子発現は Rev-erb によって制御される。事実、siRNA 法を用いて Rev-erb をノックダウンした C3H10T1/2 細胞から total RNA を回収し、定量的リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現へ影響について検討した結果、Rev-erb をノックダウンした C3H10T1/2 細胞では *Nfil3/E4BP4* mRNA と *Fgf21* mRNA の増加が観察された。さらに、明暗周期で 24 時間にわたってサンプリングし、マウス褐色脂肪組織における *Fgf21* mRNA 発現量を解析した。その結果、褐色脂肪組織における *Fgf21* 遺伝子の発現振動が観察された。また、褐色脂肪組織における *Fgf21* 遺伝子の発現振動は、高脂肪食摂取肥満モデルマウスにおいて消失することが判明した。
- (3) 脂肪組織は白色脂肪組織と褐色脂肪組織に大別される。近年、寒冷刺激によって誘導される熱産生を行う褐色脂肪細胞とは由来の異なる褐色脂肪様細胞「ベージュ脂肪細胞」が見出され、褐色脂肪細胞と同様、肥満・生活習慣病の治療標的として関心が高まっている。本研究において、icaritin が脂肪前駆細胞の分化調節メカニズムを制御する可能性が示唆されたことから、白色脂肪細胞の褐色化誘導機構の一端を明らかにするために、マウス鼠径部脂肪組織由来の脂肪前駆細胞を用いて解析をおこなった。これまでの解析において、Nfil3/E4BP4 ノックアウトマウスから調製した褐色脂肪様細胞では、Ucp-1、Ppargc1a、FGF21 発現の増加が観察されている。また、siRNA 法を用いて Nfil3/E4BP4 をノックダウンした C3H10T1/2 細胞では FGF21 の有意な増加が観察された。以上の結果から、時計遺伝子 Nfil3/E4BP4 は白色脂肪細胞の褐色化制御に関与する可能性が示唆された。一方、siRNA 法を用いて Nfil3 をノックダウンした C3H10T1/2 細胞では、対照細胞に比して、アディポネクチン遺伝子は有意に減少することがこれまでの解析で明らかになっている。以上の結果より、時計遺伝子 Nfil3/E4BP4 は、脂肪前駆細胞の細胞分化制御において重要な役割を果たす可能性が示唆された。
- (4) FGF21 は、肥満などの糖脂質代謝異常を改善する薬理作用を持つことが明らかにされている。また、本研究によって時計遺伝子による FGF21 遺伝子発現制御の可能性が示唆された。したがって、本研究では漢方方剤常用生薬抽出エキスと ELISA 法を用いた多検体スクリーニングによって、FGF21 産生能に影響を及ぼす生薬エキスの探索を行なった。FGF21 産生能に関して高い活性を示したオウレン、オウバク、レンギョウとその主要成分について解析した結果、FGF21 発現調節には時計遺伝子 Rev-erb、Nfil3/E4BP4 だけでなく複数の細胞内シグナル伝達システムが関与する可能性が示唆された。特に、オウレン、オウバク抽出物ならびにそれらの主要成分であるベルベリンは、褐色脂肪様細胞の FGF21 産生能を増強することが明らかとなった。また、ベルベリンによる FGF21 発現の増強には、時計遺伝子 BMAL1 が一部関与する可能性が示唆された。
- 肝臓・脂肪・骨格筋で産生・分泌された FGF21 は、脂肪細胞や骨格筋で糖取り込みの促進や脂肪細胞の分解に働き、糖・脂質代謝を改善させる。本研究では C2C12 筋芽細胞における時計遺伝子 BMAL1 の役割について検討した。その結果、siRNA 法を用いて BMAL1 をノックダウンした C2C12 細胞では FGF21 遺伝子発現の有意な低下が観察された。
- (5) 本研究結果より、時計遺伝子の転写調節ネットワークが代謝制御ホルモン FGF21 の発現制御に関与する可能性が示唆されたことから、代謝性疾患の治療・予防薬の創出に向けた重要な知見が得られたと考えられる。骨格筋から分泌されるマイトカインの一つである irisin は、白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞化する作用を有することが明らかとなっている。また、icariin は C2C12 細胞における irisin/FNDC5 発現に関与することが報告されている(1)。今後は Rev-erb による FGF21 の制御機構における Nfil3/E4BP4 の関与の可能性と icaritin の薬理作用についての詳細な解析が必要である。

<引用文献>

Chen SQ, Ding LN, Zeng NX, Liu HM, Zheng SH, Xu JW, Li RM. Icaritin induces irisin/FNDC5 expression in C2C12 cells via the AMPK pathway. *Biomed Pharmacother.* 115, 2019,108930. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108930.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirai T, Mitani Y, Kurumisawa K, Nomura K, Wang W, Nakashima KI, Inoue M	4. 巻 164
2. 論文標題 Berberine stimulates fibroblast growth factor 21 by modulating the molecular clock component brain and muscle Arnt-like 1 in brown adipose tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 165-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2019.04.017.	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 -

1. 著者名 Hirai T, Takagi M, Nakashima KI, Inoue M	4. 巻 139(6)
2. 論文標題 Evaluation of Naturally Occurring Compounds Regulating Brown/Beige Adipocyte Differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 861-866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00173-3.	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 Kiyama Genki, Nakashima Ken-ichi, Shimada Kazumasa, Muroho Naoko, Kakihana Wataru, Imai Hideki, Inoue Makoto, Hirai Takao	4. 巻 142
2. 論文標題 Transmembrane G protein-coupled receptor 5 signaling stimulates fibroblast growth factor 21 expression concomitant with up-regulation of the transcription factor nuclear receptor Nr4a1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112078 ~ 112078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.112078	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中貴大, 荒井哲也, 平居貴生, 井上誠
2. 発表標題 老齢マウスを用いた加味四物湯のサルコペニア改善メカニズムの解析
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 来山元規, 平居貴生, 嶋田一優, 中島健一, 井上 誠
2. 発表標題 レンギョウによる代謝調節因子FGF21の発現促進作用に関する研究
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平居貴生, 中島健一, 井上 誠
2. 発表標題 Fibroblast growth factor 21を制御する天然物の概日時計制御系への影響
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Hirai, Hinako Hashimoto, Naoko Murono, Wataru Kakihana, Hideki Imai
2. 発表標題 G protein-coupled bile acid receptor TGR5 signaling regulates fibroblast growth factor 21
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	中島 健一 (Nakashima Ken-ichi) (70635135)	愛知学院大学・薬学部・講師 (33902)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------