

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22693

研究課題名(和文)非視覚光応答による肥満代謝制御

研究課題名(英文)Regulation of energy metabolism by non-image forming photic responses

研究代表者

羽鳥 恵 (Hatori, Megumi)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：90590472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計は食事と光によって時刻調節される。まず食事と概日時計との関連を探り、概日時計発振の中核を担う遺伝子群のノックアウトマウスと新規低分子化合物群を用いて、褐色脂肪における時計因子の関係を見出した。次に、光が肥満に関与する可能性の検証に取り組んだ。哺乳類の網膜神経節細胞の2-3%は青色光感受性光受容体であるメラノプシンを発現している。桿体・錐体に次ぐ第三の光受容細胞として網膜において機能し、概日時計の光応答や瞳孔収縮などの視覚以外の光応答、すなわち非視覚応答を引き起こす。非視覚応答が概日時計を介して新規の生理現象に影響を与える可能性の検証に挑戦し、それを支持する新規データを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わたしたちの睡眠・覚醒やホルモン分泌など、様々な生理機能は一日を周期として変化し、日々繰り返されます。このリズムを制御しているのが体内に存在する生物時計である概日時計です。概日時計の周期は24時間ぴったりではないため、光を浴びることや食事を摂取することにより、時間のずれを毎日補正しています。今回、概日時計の発振に重要な機能を持つ時計タンパク質が脂肪細胞においても役割を持つことを明らかにしました。また、目に発現して青色光を感じる光受容タンパク質の機能解析を行いました。これらの研究を発展させることにより、生体機能の維持および健康の増進の一助となると期待されます。

研究成果の概要(英文)：In mammalian retinas, there are three photoreceptors: rods, cones and melanopsin-expressing retinal ganglion cells. Rods and cones are responsible for image forming vision. In contrast, melanopsin-expressing retinal ganglion cells contribute to non-image forming visions, such as circadian photoentrainment and pupil constriction. Melanopsin is a GPCR which can be activated by 460-480 nm light, and its light response properties are different from those of rods and cones. I am investigating how light affects the whole-body physiologies and the circadian clock system.

CRY1 and CRY2 are essential components of the mammalian circadian clock controlling daily physiological rhythms. By using knockout mice and isoform-selective compounds, we found a new role of CRY1 and CRY2 as enhancers of brown adipocyte differentiation, providing the basis of CRY-mediated regulation of energy expenditure.

研究分野：動物生理

キーワード：概日時計 目 メラノプシン 非視覚応答 光受容体 CRY 哺乳類

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、新型コロナウイルス感染症でも実感されたように感染症罹患時の脆弱性、心血管疾患、脳卒中、失明や糖尿病性腎不全といった重篤疾患を招き、死につながる。日本の中老年男性の2人に1人がメタボリックシンドロームまたは予備軍である。体力や時間、天候の問題、面倒くささから運動不足となる人が相当数存在し、簡便な肥満解消手法の開発が望まれている。食事の内容や量に肥満改善効果があることは古くから研究されている。ところが、摂食量を減らすカロリー制限の実施は困難を伴い、コンプライアンスに差が出る。そうした中で私は、食事の“量”ではなく食事の“時間”の調整が概日時計の機能を改善し、代謝能改善に極めて有効であろうと仮説を立てて実証し、「時間制限摂食」として報告した(引用文献①-③)。また、これまでに、概日時計遺伝子破壊マウスを用いた研究から、概日時計システムが乱れると肥満につながるという研究成果も多く報告されている(引用文献④)。

概日時計システムを乱す要因は食事だけではない。概日時計の周期は正確に24時間ぴったりではない。日々のずれを補正する外界からの環境因子が光と食事である。つまり、これらの入力因子の乱れは体内時計機構の攪乱につながる。哺乳類の概日時計に重要な役割を果たすのは、目の網膜に存在するメラノプシンという光受容タンパク質である(引用文献⑤)。

メラノプシン発現網膜神経節細胞(melanopsin-expressing retinal ganglion cell; mRGC)と呼ばれる光受容網膜神経節細胞はオプシン型Gタンパク質共役受容体であるメラノプシン(Opn4)を発現し、概日時計の光応答や瞳孔収縮などの視覚以外の光応答、すなわち非視覚応答を引き起こす。つまり、目には視細胞層を構成する桿体・錐体に加え、mRGCも光受容細胞として機能する。メラノプシン遺伝子をノックアウトすると非視覚応答は減弱するが消失せず、桿体・錐体の関与が考えられた。メラノプシンCre(Opn4Cre)マウスを用いてmRGCだけを成体から除去した。その結果、桿体・錐体が存在するにも関わらず非視覚応答が消失し、mRGCが非視覚応答の統合と伝達に必要な不可欠であることを発見した(引用文献⑥)。さらにOpn4Creマウスを使用し、非視覚応答を担う脳領域にとどまらず、視覚情報に寄与する外側膝状体や上丘に対するmRGCからの投射を認めた。併せて視覚野の神経発火応答を測定し、mRGCが視覚応答にも寄与することを見出した(引用文献⑦)。「メラノプシンとは何か」という基礎研究と併行し、目だけでなく全身に与える影響へと研究が展開している。遺伝子破壊マウスを用いた解析によりメラノプシンが活動時間や気分に関与する可能性が報告されている。スマートフォン等の普及に伴い、青色光が全身の健康状態に与える影響の理解は喫緊の課題である(引用文献⑧)。

2. 研究の目的

哺乳類の網膜神経節細胞の2~3%は青色光受容体メラノプシンを発現することで、桿体・錐体に加え第三の光受容細胞として機能し、概日時計の光応答など視覚以外の光反応を担う。光による概日時計の攪乱は多様な疾患を引き起こすことから、メラノプシンの分子機能と制御機構の理解が必須である。本研究は桿体・錐体とは全く異なる特徴をもつメラノプシン細胞に注目して光情報伝達や生体での新規機能の発見を目的とし、分子・細胞・個体レベルで統合的に解析する。一方、概日時計の本体である発振系は、約24時間周期で発現の増減を繰り返す時計遺伝子・タンパク質群で構成されている。時計タンパク質群のなかでもCRYPTOCHROME(CRY)は肝臓の糖新生の概日リズムを調節することが報告されている(引用文献⑨⑩)など、肥満との関連が強く示唆されていた。そこで本研究ではCRYタンパク質群の脂肪組織における役割を解明することを目的とする。

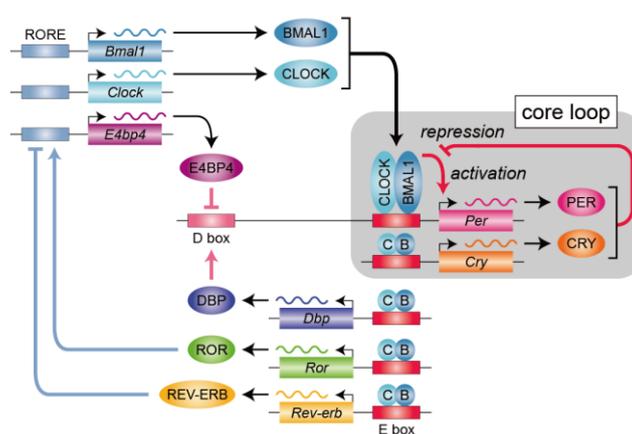


図1 哺乳類の概日時計の発振系

3. 研究の方法

時計タンパク質CRYの役割を明らかにするため、Cry1遺伝子破壊マウス、Cry2遺伝子破壊マウス、およびCry1;Cry2ダブル遺伝子破壊マウスと野生型マウスを用いた。CRYを活性化す

るために、CRY1 と CRY2 にアイソフォーム特異的に作用する新規化合物を用いた。マウスの肩甲骨部位から褐色脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理や遠心等をして stromal vascular fraction を分離し、分化誘導を行った。定量的な逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により遺伝子群の発現量を、ヘマトキシリン・エオジン染色により組織形態を解析した。

これらの研究と併行し、Opn4Cre マウスや阻害剤 Opsinamides (引用文献⑩) を用いて、メラノプシンの新規機能発見に取り組んだ。

4. 研究成果

概日時計の発振を担う時計遺伝子群が肥満にどのような影響を与えるのか、を併行して研究した。哺乳類には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の2種類の脂肪細胞が存在し、機能は逆である。体内の余分なエネルギーを蓄積する白色脂肪細胞に対し、褐色脂肪細胞は熱を産生しエネルギーを消費する。言い換えると、褐色脂肪細胞を活性化してエネルギー消費を上げることによって体重減少を引き起こすことができるかもしれない。そのために褐色脂肪細胞に注目した。概日時計発振の中核を担う *Cry1* および *Cry2* 遺伝子を共にノックアウトした時計破壊マウスを解析したところ、褐色脂肪組織において脂肪滴サイズの低下を見出した。さらに、PPAR γ リガンドであるロシグリタゾンによって脂肪分化が起こりにくいことを見出した。この結果に一致して、*Ucp1* などの褐色脂肪マーカー遺伝子群の誘導も、*Cry1/2* ダブル遺伝子破壊マウスでは抑制されていた。

次に、遺伝子が機能しない状態とは逆に過剰に働かせた状態を作り出すことを目的とし、CRY に作用する新規低分子化合物群を用いて CRY の機能を後天的に活性化し、褐色脂肪細胞の遺伝子発現に与える影響を解析した。野生型マウス由来の脂肪細胞に使用したところ、ロシグリタゾン存在下でこれらの CRY 活性化薬剤が褐色脂肪分化能を促進すること、この効果は *Cry1/2* ダブル遺伝子破壊マウス由来細胞では見られないことから、確かにこの新規化合物は CRY に作用しており、さらに、CRY を活性化すると褐色脂肪への分化が促進されること、つまり褐色脂肪が増えることを見出した (引用文献⑫)。

一方、非視覚応答が概日時計を介して新規の生理現象に影響を与える可能性の検証に挑戦し、それを支持する新規データも得た。

<引用文献>

- ① Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JA, Ellisman MH, Panda S. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 15(6):848-60 (2012).
- ② Hatori M, Panda S. Response of peripheral rhythms to the timing of food intake. *Methods Enzymol.* 552:145-61 (2015).
- ③ 羽鳥 恵 時間制限摂食と肥満症治療 実験医学 増刊号『個人差の理解へ向かう肥満症研究』39:214-218 (2021)
- ④ Bass, J. & Lazar, M. A. Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* 354, 994-999 (2016).
- ⑤ Hatori M, Panda S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med.* 16(10):435-46 (2010)
- ⑥ Hatori M, Le H, Vollmers C, Keding SR, Tanaka N, Buch T, Waisman A, Schmedt C, Jegla T, Panda S. Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS One* 3(6):e2451 (2008)
- ⑦ Brown TM, Gias C, Hatori M, Keding SR, Semo M, Coffey PJ, Gigg J, Piggins HD, Panda S, Lucas RJ. Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system. *PLoS Biol.* 8(12):e1000558 (2010)
- ⑧ Hatori M, Gronfier C, Van Gelder RN, Bernstein PS, Carreras J, Panda S, Marks F, Sliney D, Hunt CE, Hirota T, Furukawa T, Tsubota K. Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies. *NPJ Aging Mech Dis.* 3:9 (2017)
- ⑨ Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med.* 16(10):1152-6 (2010)
- ⑩ Hatori M, Panda S. CRY links the circadian clock and CREB-mediated gluconeogenesis. *Cell Res.* 20(12):1285-8 (2010)
- ⑪ Jones KA, Hatori M, Mure LS, Bramley JR, Artymyshyn R, Hong SP, Marzabadi M, Zhong H, Sprouse J, Zhu Q, Hartwick AT, Sollars PJ, Pickard GE, Panda S. Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction. *Nat Chem Biol.*

9(10):630-5 (2013)

- ⑫ Miller S, Son YL, Aikawa Y, Makino E, Nagai Y, Srivastava A, Oshima T, Sugiyama A, Hara A, Abe K, Hirata K, Oishi S, Hagihara S, Sato A, Tama F, Itami K, Kay SA, Hatori M, Hirota T. Isoform-selective regulation of mammalian cryptochromes. *Nat Chem Biol.* 16(6):676-685 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miller Simon, Son You Lee, Aikawa Yoshiki, Makino Eri, Nagai Yoshiko, Srivastava Ashutosh, Oshima Tsuyoshi, Sugiyama Akiko, Hara Aya, Abe Kazuhiro, Hirata Kunio, Oishi Shinya, Hagihara Shinya, Sato Ayato, Tama Florence, Itami Kenichiro, Kay Steve A., Hatori Megumi, Hirota Tsuyoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Isoform-selective regulation of mammalian cryptochromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 676 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-020-0505-1	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 羽鳥 恵	4. 巻 39
2. 論文標題 時間制限摂食と肥満症治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 214 ~ 218
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 無
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 Kim Keun-Young, Rios Luis C., Le Hiep, Perez Alex J., Phan S?bastien, Bushong Eric A., Deerinck Thomas J., Liu Yu Hsin, Ellisman Maya A., Lev-Ram Varda, Ju Suyeon, Panda Sneha A., Yoon Sanghee, Hirayama Masatoshi, Mure Ludovic S., Hatori Megumi, Ellisman Mark H., Panda Satchidananda	4. 巻 29
2. 論文標題 Synaptic Specializations of Melanopsin-Retinal Ganglion Cells in Multiple Brain Regions Revealed by Genetic Label for Light and Electron Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 628 ~ 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.006	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 羽鳥 恵	4. 巻 37
2. 論文標題 第三の光受容細胞	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1455-1458
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 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽鳥 恵
2. 発表標題 Regulation of the energy metabolism by controlling the circadian clock
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 堀江 重郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 152
3. 書名 医学のあゆみBOOKS アンチエイジング診療 23のエッセンス	

1. 著者名 坪田 一男	4. 発行年 2019年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 192
3. 書名 診療で役立つ！ 近視進行予防のサイエンス	

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

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
---------	---------