

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590071

研究課題名(和文) 時計遺伝子 BMAL1 の機能欠損によるメタボリックシンドローム発症とそのメカニズム

研究課題名(英文) The mechanism by which Ablation of Bmal1 induces metabolic syndrome

研究代表者

榛葉 繁紀 (SHIMBA SHIGEKI)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20287668

研究成果の概要(和文)：肥満ならびにメタボリックシンドローム患者数急増の原因は多種多様であり、シフトワークもその一つとして考えられる。シフトワークによるメタボリックシンドローム発症のメカニズムは明らかではないが、体内時計の乱れがその一つとして疑われている。そこで本研究では、体内時計システムのマスターレギュレーターである BMAL1 の機能とメタボリックシンドロームとの関係を明らかにする目的で BMAL1 欠損(KO)マウスを作製し、その解析を行った。全身性 BMAL1 KO マウスは、低体重、脂質異常症、高コレステロール血症、空腹時血糖の上昇ならびに各組織への著しい脂質の蓄積を示した。また高脂肪食負荷により著しい体重増加を示した。さらに BMAL1 欠損は耐糖能の低下を生じ、その原因として膵ラ氏島の矮小化とそれに伴うインスリン分泌不全が示された。これらの結果は、臓器間クロストークに BMAL1 (すなわち体内時計システム) が関与する事を示すとともに、全身の体内時計システムの調和が乱れることによりメタボリックシンドロームが発症することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：A link between circadian rhythm and metabolism has long been discussed. Circadian rhythm is regulated by transcription factors, namely the brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) and CLOCK. In addition to control of circadian rhythm, we have previously shown that BMAL1 regulates adipogenesis. In metabolic syndrome patients, the function of BMAL1 is dysregulated in visceral adipose tissue. Furthermore, SNPs analysis has revealed that BMAL1 is associated with susceptibility to hypertension and type II diabetes. Furthermore, the significant roles of BMAL1 in pancreatic b cells proliferation and maturation were recently reported. These results suggest that BMAL1 regulates energy homeostasis. Therefore, in this study, we examined whether loss of BMAL1 function is capable of inducing metabolic syndrome. Ablation of the *Bmal1* gene in mice resulted in elevation of the respiratory quotient value, indicating that BMAL1 is involved in the utilization of fat as an energy source. Indeed, lack of *Bmal1* reduced the capacity of fat storage in adipose tissue, resulting in increase the levels of circulating fatty acids, including triglycerides, free fatty acids, and cholesterol. Elevation of the circulating fatty acids level induced the formation of ectopic fat in the liver and skeletal muscle in *Bmal1*^{-/-} mice. Therefore, we were led to conclude that BMAL1 is a crucial factor in the regulation of energy homeostasis, and disorders of the molecular clock system lead to development of the metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			

年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目 薬学・生物系薬学：

キーワード：メタボリックシンドローム、時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会の進展に伴い、“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、高血圧および高脂血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。したがって、その予備軍も含めた患者数を考慮すれば、メタボリックシンドロームの発症メカニズムを解明し、それに基づいた適切な予防法や治療のための新たな薬剤の開発は喫緊の社会的要請である。メタボリックシンドローム患者数の急増の原因は、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多種多様であるが、近年の疫学調査により長期シフトワーカーにおいてメタボリックシンドロームの罹患率の高さが明らかにされ、生体リズムのかく乱が代謝異常発症のリスクファクターの一つであることが示唆された。これらメタボリックシンドローム発症のリスクファクターが肥満症を誘発し、その結果として糖尿病をはじめとする代謝性疾患の発症につながることはよく知られている。メタボリックシンドロームの主因である肥満症は脂肪細胞の成熟化（数の増加ならびに肥大化）によって生ずると考えられる。脂肪細胞は従来、単に中性脂肪を蓄積する受け身の細胞として認識されてきたが、肥満遺伝子の産物であるレプチンの発見以来、脂肪細胞が内分泌器官として積極的にエネルギーホメオスタシスの維持に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。脂肪組織は成人において体重の約20%、肥満成人においては約40%にもものぼると推定され、重量から言えば脂肪組織は最大の内分泌臓器である。したがって肥満の成立および引き続き起こる様々な疾患の発症には脂肪細胞の成熟化およびそれに伴う脂肪細胞特異的な分泌タンパク質（アディポサイトカイン）の産生・分泌の理解が必要となる。これら脂肪細胞の機能はPPAR γ をはじめとする多くの転写因子のネットワークにより調節されている。このネットワークを構成する転写因子群は、脂肪細胞に特徴的な高い糖・脂質代謝活性を触媒する酵素遺伝子の発現制御を通じて脂肪

細胞機能に関与しており、換言するならば脂肪細胞の特徴的な機能は代謝関連因子の遺伝子発現レベルにおいて調節をされている。

2. 研究の目的

脂肪細胞の機能維持における遺伝子発現制御は摂食条件、栄養条件などの環境因子さらには生体リズムなど複数の因子により影響を受ける。そこで我々はそれら細胞外因子の刺激を受容し、脂肪細胞機能を制御する転写因子を検索したところ、サーカディアンリズムのマスターレギュレーターである時計遺伝子 **Brain-Muscle Arnt Like Protein 1 (BMAL1)** の発現が脂肪細胞分化モデルである **3T3-L1** 細胞の脂肪細胞分化の進行に伴い増加することを見出した。株化脂肪細胞のみならずマウス個体においても **BMAL1** は成熟脂肪細胞画分に高く発現し、前駆脂肪細胞を含む **stromal-vascular** 画分にはほとんど検出されない。さらに **BMAL1** の発現増加は脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨細胞へと分化する間葉系幹細胞においても脂肪細胞分化時においてのみ特異的に観察された。これらの事実は脂肪細胞機能における **BMAL1** の重要性を予感させる。事実、我々は **BMAL1 KO** マウス胎児より調製した線維芽細胞は脂肪細胞への分化能を欠くことを明らかにし、さらにはそれら細胞にアデノウイルスを用いて **BMAL1** を強制発現させることにより分化能が回復することを示した。またこれら **BMAL1** の脂肪細胞分化への関与は **siRNA** を用いた **BMAL1** ノックダウン **3T3-L1** 細胞においても確認された。さらにそのメカニズムとして脂肪細胞内で脂質代謝を制御する転写因子である **SREBP-1** ならびにその標的遺伝子である脂質代謝系の酵素群の **BMAL1** による発現制御を明らかにした。

また前回の採択研究により作製した全身性 **BMAL1 KO** マウスは、**Fig.1-3** に示すように4週間の短期間高脂肪食負荷により、脂肪の体外への漏出、脂肪組織の肥大化抑制、脂肪肝の形成、高脂血症ならびにインスリン抵抗性を示し、メタボリックシンドロームを発症する。これら一連の我々の知見ならびに **BMAL1** のヘテロダイマーパートナーである **Clock** 遺伝子変異マウスがメタボリックシンドローム様の症状を示すことに加え、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。そこで本申請研究ではこれらの知見を基に **BMAL1** の機能不全、すなわち生体リズムのかく乱によるメタボリックシンドローム発症メカニズムを、脂肪細胞特異的 **BMAL1KO** マウスを用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

動物実験は日本大学薬学部実験動物倫理規定に基づき行った。血液生化学検査は常法に従い測定した。遺伝子発現量はリアルタイム PCR 法により測定した。

4. 研究成果

全身性 **BMAL1 KO** マウスは、行動ならびにエネルギー代謝の日内変動を消失しており、低体重、脂質異常症、高コレステロール血症、空腹時血糖の上昇ならびに各組織への著しい脂質の蓄積を示した。また高脂肪食負荷により著しい体重増加を示した。さらに **BMAL1** 欠損は耐糖能の低下を生じ、その原因として睥ラ氏島の矮小化とそれに伴うインスリン分泌不全が示された。

以上をふまえ、各組織の代謝における **BMAL1** の役割を明らかにする目的で、肝臓特異的 **BMAL1 KO** (**L-BMAL1 KO**) マウスを作製し、その解析を行った。**L-BMAL1 KO** マウスはコントロールマウスと比較して、摂食量に有意な差は認められないにもかかわらず、高脂肪食負荷誘発性肥満に対して抵抗性を示した。また **L-BMAL1 KO** マウスの酸素消費量はコントロールマウスのそれに比較して有意に高く、エネルギー代謝（脂質の燃焼）の亢進が示された。次いでアディポネクチンならびにレプチンの血清中濃度ならびに脂肪組織における遺伝子発現量を測定したところ、いずれも **L-BMAL1 KO** マウスにおいて有意な増加が認められた。また脂肪組織における **PPAR γ 2** の発現増加が認められた。興味深い事に **L-BMAL1 KO** マウス脳において、高脂肪食負荷に伴うシグナル伝達関連因子の挙動が、コントロールマウスにおけるそれと比較して変化を示した。これらの結果より肝臓における **BMAL1** の欠損は脂肪組織にそのシグナルを中枢あるいは液性因子を介して伝達し、脂肪細胞の小型良性化ならびにアディポサイトカインの産生増加に起因するエネルギー代謝を亢進することで高脂肪食負荷誘発性肥満に対して抵抗性を獲得することが示唆された。

次いで骨格筋特異的 **BMAL1 KO** (**M-BMAL1 KO**)

マウスの代謝に関わる表現型を解析したところ、**M-BMAL1 KO** マウスは、コントロールマウスと比較して著しい遅筋（赤筋）量の増加が観られた。そこで、骨格筋における遺伝子発現量を検討したところ、**M-BMAL1 KO** マウスにおいて、遅筋型トロポニン、ミオグロビン、さらには筋分化制御に関わる **MyoD**、**Myf5** 等の転写因子群の発現量増加も認められた。また骨格筋量を負に制御する **Myostatin** の発現低下及びそのシグナル関連遺伝子の発現増加が観られた。これらの結果から **BMAL1** は骨格筋において筋量や筋繊維のタイプ決定に関与している事が示唆された。

M-BMAL1 KO マウスにおける遅筋量の増加は、骨格筋内における脂質代謝に影響を与える事が予想出来る。そこで **M-BMAL1 KO** マウスにおける骨格筋中並びに血清中のトリグリセリド (**TG**) 濃度を測定した。その結果、**M-BMAL1 KO** マウス骨格筋中 **TG** 含量はコントロールマウスにおけるそれとほぼ同程度であったが、血清 **TG** 濃度の有意な上昇が示された。

以上の結果から、**BMAL1** が骨格筋の分化及び筋繊維タイプの決定、そして脂質代謝の制御に関与している事が示された。

これらの結果は、各組織における特異的な機能さらにはそれらに基づいた臓器間クロストークに **BMAL1** (すなわち体内時計システム) が関与する事を示すとともに、全身の体内時計システムの調和が乱れることによりメタボリックシンドロームが発症することを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

① 榛葉繁紀 「概日リズムとメタボリックシンドローム」 *Medical Science Digest* 査読無 37: 18-21 (2011)

② 師尾昂子、榛葉繁紀、他 5 名 (5 番目)

「2 型糖尿病発症者の生活習慣に関する研究」 *薬局薬学* 査読有 2:30-43 (2010)

③ Watabe, Y., Nazuka, N., Tezuka, M., and Shimba, S. 「Aryl hydrocarbon receptor (AhR) functions as a potent coactivator of E2F1-dependent transcription activity」 *Biol. Pharm. Bull.* 査読有 33:389-397 (2010).

④ Hatanaka, M., Shimba, S., 他 6 名 (2 番目) 「Hypoxia-inducible Factor-3 α Functions as an Accelerator of 3T3-L1 Adipose Differentiation」 *Biol. Pharm. Bull.* 査読有 32:1166-1172. (2009).

⑤ 榛葉繁紀. 「メタボリックシンドロームとアンチエイジング」 *Drug Delivery System*

査読有 24: 127-132 (2009).

⑥ 榎葉繁紀「脂質代謝の日内リズム」Medical Bio. 査読無 11: 27-31(2009)

⑦ 榎葉繁紀「子どもの肥満と痩せ」こどもと保険 査読無 69: 2-3 (2009)

⑧ 榎葉繁紀「体内時計と肥満の関連性をみる」Vascular Medicine査読無 5:18-22 (2009)

⑨ Shimba, S., and Watabe, Y. 「Crosstalk between the AHR signaling pathway and circadian rhythm」Biochem. Pharm. 査読有 77: 560-565(2009)

⑩ Ishimura, A., Ishige, K., Taira, T., Shimba, S., 他 4 名 (4 番目)「Comparative study of hydrogen peroxide- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced cell death in HT22 cells」Neurochem. Int. 査読有 52: 776-785 (2008)

⑪ 榎葉繁紀「脂肪細胞における生体内時計遺伝子とメタボリックシンドローム」アディポサイエンス査読無 5: 139-144 (2008).

[学会発表] (計 19 件)

① 榎葉繁紀「体内時計システムによる代謝調節」(平成 22 年度 生理学研究所 研究会 平成 23 年 2 月 18 日 岡崎)

② 榎葉繁紀「生物時計による代謝調節とメタボリックシンドローム」(第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同大会 平成 22 年 12 月 10 日 神戸)

③ 榎葉繁紀「代謝制御における組織特異的な BMAL1 の役割」(第 17 回日本時間生物学会 平成 22 年 11 月 22 日 東京)

④ 榎葉繁紀「体内時計異常によるメタボリックシンドローム」(フォーラム 2010 衛生環境トキシコロジー 平成 22 年 9 月 7 日 東京)

⑤ 榎葉繁紀「体内時計による代謝調節とメタボリックシンドローム」(第 57 回日本食品科学工学学会 平成 22 年 9 月 2 日 東京)

⑥ 榎葉繁紀「体内時計調節因子 Brain and Muscle Arnt like protein 1 (BMAL1)による代謝調節とメタボリックシンドローム」(第 15 回アディポサイエンス研究会 平成 22 年 8 月 22 日 大阪)

⑦ 榎葉繁紀「BMAL1, a master component of circadian rhythm, regulates energy metabolism」(日本農芸化学会大会 2010 年度大会 平成 22 年 3 月 30 日 東京)

⑧ 榎葉繁紀「時計遺伝子を基盤としたメタボリックシンドローム予防ならびに治療戦略」(日本薬学会第 130 年会要旨集誌上において 平成 22 年 3 月 28 日)

⑨ 榎葉繁紀「BMAL1 ノックアウトマウス析

から見えてきたもの-代謝制御を中心に-(第 4 回 NutrRhythm 研究会 平成 21 年 12 月 16 日 東京)

⑩ 榎葉繁紀「時計遺伝子を介した代謝制御に関する臓器間クロストーク」(第 32 回日本分子生物学会年会 平成 21 年 12 月 12 日 横浜)

⑪ 榎葉繁紀「Regulation of energy metabolism by Ah receptor」(21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease 平成 21 年 10 月 26 日 東京)

⑫ 榎葉繁紀「体内時計とメタボリックシンドローム」(第 6 回東北糖尿病トータルケア研究会 平成 21 年 10 月 16 日 仙台)

⑬ 榎葉繁紀「時計遺伝子を基盤としたメタボリックシンドローム予防ならびに治療戦略」(第 53 回日本薬学会関東支部大会 平成 21 年 10 月 3 日 埼玉)

⑭ 榎葉繁紀「時計遺伝子 Bmal1 とメタボリックシンドローム」(Pharmaco-Hematology シンポジウム 平成 21 年 6 月 20 日 東京)

⑮ 榎葉繁紀「Ah レセプター(AhR)による肝エネルギー代謝調節機構」(日本内分泌学会学術大会 平成 21 年 4 月 25 日 群馬)

⑯ 榎葉繁紀「代謝研究の面白さーダイオキシンから体内時計までー」(静岡県立大学環境科学研究所月例セミナー 平成 20 年 10 月 21 日 静岡)

⑰ 榎葉繁紀「Tissue specific roles of BMAL1 in lipid metabolism」(フォーラム 2008 衛生環境トキシコロジー 平成 20 年 10 月 17 日 熊本)

⑱ 榎葉繁紀「Tissue specific roles of BMAL1 in lipid metabolism」(Society of Research of Biological Rhythm 11th Biennial Meeting (平成 20 年 5 月 19 日 Sandestin 米国))

⑲ 榎葉繁紀「時計遺伝子による脂肪細胞機能の調節」(第 62 回日本栄養・食糧学会 平成 20 年 5 月 4 日 坂戸)

[図書] (計 2 件)

① 榎葉繁紀(監修)体内時計ダイエット(マガジンハウス)(2010)95 ページ.

② 榎葉繁紀 他(分担)時間栄養学 香川靖雄編(女子栄養大学出版社)(2009) p137-153.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/eisei.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎葉 繁紀 (SHIMBA SHIGEKI)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20287668