

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：25503

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19715

研究課題名(和文) 不規則な食事時間が生み出す膜タンパク質の発現リズム破綻と脂肪酸の異常蓄積

研究課題名(英文) Rhythmic disruption of membrane protein expression and fatty acid accumulation produced by abnormal feeding timing

研究代表者

鶴留 優也 (Tsurudome, Yuya)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：80846254

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)：本来休息すべき時間での摂食は、疫学上生活習慣病のリスクとされている。そのメカニズムは、短期的な制限摂食で評価されており、長期間の影響は解明されていない。本課題では長期間休息期に摂食を行ったマウスを作成し、長期間の制限摂食が及ぼす生体リズムや脂質バランスへの影響を解析した。本モデルマウスでは対象マウスと比較して肝臓への脂質の沈着が認められた。その原因はCD36の発現が高値を示すことであった。さらにCD36の発現上昇にはmiR-27aの発現リズムが消失することが関与していた。本課題は長期間の制限摂食が脂質沈着を引き起こすことを示しており、休息期の摂食が及ぼす健康被害に関する予防法構築に貢献できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの休息期摂食が及ぼす代謝能への影響は、短期的な制限摂食モデルマウスを用いており、臨床で見られる病態や状況とは大きく乖離する。本研究成果の学術的意義は、長期的な制限摂食モデルマウスを作成し、臨床を模したマウスで生活習慣病のメカニズムを解析できた点である。さらに、本モデルマウスでは血清中の脂質レベルは正常値にもかかわらず、肝臓における脂質蓄積量は高値を示した。これは血液検査だけでは解析できない脂肪肝の存在を示すものであり、休息期摂食による生活習慣病の発症に大きく関連することを明らかとした。このことは臨床上指摘されている点であり、分子メカニズムを明らかにした点が社会的意義のある成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Rest time feeding is epidemiologically regarded as a risk for lifestyle-related diseases. The mechanism has been evaluated in short-term restricted feeding; however the long-term effects of rest time feeding have not been elucidated. In this study, we analyzed the effects of long-term restricted feeding on biological rhythms and lipid balance in long-term rest time feeding model mouse. Lipid deposition in the liver was observed in the model mice compared to the target mice. This was caused by a higher expression of CD36 mRNA / protein. Furthermore, the loss of miR-27a expression rhythm was involved in the elevated CD36 expression. This study demonstrates that long-term restricted feeding causes lipid deposition, and can contribute to the development of preventive methods for the adverse health effects of rest-period feeding.

研究分野：時間生物学

キーワード：脂質トランスポーター 概日リズム 脂質異常症 miRNA 細胞膜発現

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に局在するトランスポーター、受容体およびチャネルなどの機能膜タンパク質の発現が正常時から逸脱すると、様々な疾患を引き起こすと考えられている。特に、栄養素トランスポーターの発現変化は、細胞中の栄養素バランスの変化につながる。また、多くの栄養素トランスポーターの発現や輸送活性は約 24 時間周期で変動する概日リズムを示し、効率的な栄養素の取り込みや老廃物の排泄を行っている。トランスポーターの発現変動は転写レベルだけでなく、膜への局在過程にも 24 時間周期の概日リズムが認められている。これらの制御機構の概日リズムが疾患や外部刺激によって変動すると、トランスポーターの発現リズム異常をきたし栄養バランスの異常を引き起こす。

食事のタイミングや栄養素の取り込みタイミングに関する学問として時間栄養学が挙げられるが、その観点からも不規則な食生活は生体リズムの破綻をきたす。栄養成分のうち、特に脂肪酸の異常取り込みは、脂質異常症や脂質沈着症に伴う臓器障害を引き起こす。脂肪酸およびそのトランスポーターの種類は多岐にわたり、遺伝子発現に概日リズムを示すトランスポーターであっても、その転写活性の調節を担う機構は「体内時計」だけではない。本研究では「不規則な食生活による脂質異常症の発症の機序」として、栄養成分のトランスポーターの膜局在の概日リズムに着目して、そのリズムの変容がエネルギー代謝の昼夜バランスの破綻につながることを検証することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前述のとおり、足場タンパク質の発現リズムに基づいた栄養素トランスポーターの発現リズムと脂質異常症との関連であり、これを明らかにすることである。しかしながら、トランスポーターには足場依存性の膜局在を示すものと足場非依存性に膜局在を示すものがある。そこで、脂肪酸の取り込みトランスポーターとして CD36（足場非依存）、FATP2（足場依存）の膜局在性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）長期休息期摂食モデルマウスの作製

明暗周期（明期：7:00~19:00）環境下で、12 週間活動期に制限摂食を行ったマウス（AF マウス）と 12 週間休息期に制限摂食を行ったマウス（RF マウス）を準備した。過麻酔による安楽死後、肝臓と血漿を 7:00、13:00、19:00、1:00 採取した。肝臓から total RNA および総タンパク質、膜画分タンパク質を抽出し、下記の解析を実施した。血漿サンプルはそれぞれ脂質のプロファイルを作成するため、比色法を用いて脂質量を定量した。

（2）トランスポーターの発現リズム測定

時計遺伝子および脂質輸送トランスポーターの mRNA 発現量は Real-Time PCR 法で評価し、タンパク質の発現量はウエスタンブロット法にて評価した。

（3）発現制御機構の解析

対象遺伝子のプロモーター領域を含むレポーターベクターを作成し、細胞にトランスフェクションした。同時に HSF の発現ベクターを導入してレポーターの検出を、プレートリーダーを

用いて行った。また、応答配列の同定には、プロモーター領域のデリーションベクターを作成して、発光の低下を観察した。

(4) miRNA の機能阻害

miRNA の機能阻害剤を細胞にトランスフェクションし、細胞内におけるトランスポーターの発現を Real-time PCR 法もしくはウエスタンブロット法、脂質の沈着度合いを比色法によって解析した。

(5) 過食モデルマウスでの検討

休息期制限摂食モデルマウスだけでなく、摂食過多となっている ob/ob マウスにおいて、肝臓の形態的な変化や足場の発現レベルの評価を行った。また、細胞接着因子の発現レベルを評価し、細胞間隙の物質透過性を Evans Blue 投与実験によって解析した。

4. 研究成果

研究成果として、大きく下記の3項目に関して明らかとした。

(1) RF マウスでは肝臓の脂質取り込み異常が起こる

RF マウスにおいては、AF マウスよりも12週後には有意に体重が増加した。ところが、摂取カロリーには大きな変化は認められず、食生活によって体重増加が引き起こされていることが示された。RF マウスの血漿及び肝臓中の脂質のレベルを評価したところ、血漿中の脂質量は有意な変化が見られなかった。一方で、肝臓における脂質の蓄積が観察され、その蓄積量には日内変動は認められなかった。

この原因を探索するために肝臓に発現している栄養素のトランスポーターと、それを下支える足場タンパク質 MSP の発現を測定した。MSP の発現を測定すると、mRNA の発現リズムが消失していることが明らかとなった。そこで、足場依存性脂肪酸輸送トランスポーター (Fatp2) と足場非依存性脂肪酸輸送トランスポーター (CD36) の発現を解析した。また、脂肪酸取り込みトランスポーターCD36 の mRNA および膜における発現は、一日を通じて高い値を示した。一方で Fatp2 は mRNA の発現は発現リズムの反転のみ観察されたが、膜での発現は AF マウスよりも高値を示した。このことから、RF マウスでは足場タンパクの関連の有無によらず、肝臓内の脂肪酸取り込みトランスポーターの発現が高値を示すことで、脂肪酸の蓄積を誘発することを明らかとした。

(2) RF マウスにおける miRNA の発現変化は脂肪酸輸送トランスポーターの発現を下げる

本モデルマウスにおける時計遺伝子の発現量を測定したところ、時計遺伝子の発現周期が8~12時間ほどずれていた。特に肝臓内の PPAR γ の発現リズムは RNA、タンパク質いずれも発現リズムが消失し、いずれの時刻も高い値を示していた。PPAR γ の発現リズムが消失した原因は肝臓内のマイクロ RNA の発現変化が関与していることを明らかとした。miRNA-27 の発現は正常摂食条件では日内変動を示す一方で、不規則摂食マウスにおいてはその日内変動が消失していた。また、細胞に miRNA-27 をトランスフェクションすると PPAR γ の発現増加や脂質取り込みが過剰に起こることを見出した。この結果は、不規則な食生活に伴う脂質異常症について、遺伝子の日内変動に着目した新たな原因や新たなバイオマーカーを提示するものである。

(3) ob/ob マウスでは細胞接着の足場タンパク質の発現が低下する

また、摂食量が多い肥満モデルマウスである ob/ob マウスを用いて、肝臓における足場機能の評価を行った。その結果、細胞接着因子を支える足場タンパクの 1 種 ZO1 の発現が低下することを明らかとした。ob/ob マウスでは、肝臓の ZO1 発現リズムが消失し 1 日を通じて低値を示した。また、Evans Blue の投与を行うと細胞管家機内に Evans Blue の浸潤が対象マウスと比較して強く認められた。そのメカニズムとして ZO1 の転写制御を担う HSF の発現低下が引き起こっていることを明らかとした。この結果は、摂食量以上に伴う肥満状態の場合、細胞間隙の結合を支える足場機能が低下することを明らかとしたものであり、摂食の量やタイミングによって足場タンパク質の発現に関して機序が全く異なることを示している。

これまでの研究では、時計遺伝子の反転に伴い、栄養素の代謝異常を引き起こすことが論じられていた。長期休息期制限摂食マウスでは臨床で認められるような脂肪肝様の症状を呈することを明らかとし、生体リズム異常を調査するバイオマーカーの候補を提示した。さらに、生体リズム異常ではなく、肥満に伴う生体リズム異常では全く異なる機序によって肝臓への障害が引き起こることを示した。本研究の解析結果は、摂食タイミング異常や摂食量異常に伴う肝障害・脂肪肝の予防法構築に貢献できる。また、摂食タイミング異常は足場タンパク質の発現を大きく変化させることを明らかとしたことから、足場タンパク質の発現変化由来で引き起こる疾患の理解と治療法の構築につながる。

5. 主な発表論文

〈原著論文〉

1. Tsurudome Y, Akamine T, Horiguchi M, Wada Y, Fujimura A, Ushijima K. Potential mechanism of hepatic lipid accumulation during a long-term rest phase restricted feeding in mice. *Chronobiol. Int.* 39(8):1132-1143 (2022).
2. Tsurudome Y, Morita N, Horiguchi M, Ushijima K. Decreased ZO1 expression causes loss of time-dependent tight junction function in the liver of *ob/ob* mice. *Mol. Biol. Rep.* 49(12):11881-11890 (2022).

〈シンポジウム〉

1. 鶴留優也. 細胞膜タンパク質の発現リズムが形成する肝脂肪酸取り込みリズム. 第 16 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 教育シンポジウム (2022)

〈学会発表〉

1. 鶴留優也, 堀口道子, 藤村昭夫, 牛島健太郎. 不適切な食事タイミングが引き起こす肝臓脂質異常症の解析. 日本薬学会第 141 年会 (2021)
2. 鶴留優也, 森田菜央, 堀口道子, 牛島健太郎. 糖尿病モデルマウスの肝臓におけるタイトジャンクション機能変容のメカニズム解析. 日本薬学会第 142 年会 (2022)
3. 牛島健太郎, 鶴留優也, 和田由喜世, 堀口道子, 藤村昭夫. 不適切な食事タイミングが引き起こす肝臓内脂質蓄積に、マイクロ RNA 発現異常が関与する. 日本薬学会第 142 年会 (2022)

4. 鶴留優也, 堀口道子, 牛島健太郎. 高血糖時における肝細胞の細胞接着機能不全の要因解明.
第 43 回日本臨床薬理学会学術総会 (2022)

〈図書・産業財産権〉

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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 0件）

1. 著者名 Yuya Tsurudome, Takahiro Akamine, Michiko Horiguchi, Yukiyo Wada, Akio Fujimura, Kentaro Ushijima	4. 巻 -
2. 論文標題 Potential mechanism of hepatic lipid accumulation during a long-term rest phase restricted feeding in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chronobiology International	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） 10.1080/07420528.2022.2077746	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 鶴留優也	4. 巻 36
2. 論文標題 足場タンパク質が形成するトランスポーターの細胞膜局在の日内変動	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug metabolism and pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 n136-2
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 Tsurudome Yuya, Morita Nao, Horiguchi Michiko, Ushijima Kentaro	4. 巻 49
2. 論文標題 Decreased ZO1 expression causes loss of time-dependent tight junction function in the liver of ob/ob mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 11881 ~ 11890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-07940-x	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴留 優也、森田 菜央、堀口 道子、牛島 健太郎
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスの肝臓におけるタイトジャンクション機能変容のメカニズム解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 牛島 健太郎、鶴留 優也、和田 由喜世、堀口 道子、藤村 昭夫
2. 発表標題 不適切な食事タイミングが引き起こす肝臓内脂質蓄積に、マイクロ RNA発現異常が関与する
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鶴留 優也、堀口 道子、藤村 昭夫、牛島 健太郎
2. 発表標題 不適切な食事タイミングが引き起こす肝臓脂質異常症の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴留 優也、堀口 道子、牛島 健太郎
2. 発表標題 高血糖時における肝細胞の細胞接着機能不全の要因解明
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴留 優也
2. 発表標題 細胞膜タンパク質の発現リズムが形成する肝脂肪酸取り込みリズム
3. 学会等名 第16回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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