

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790237

研究課題名（和文） FGF21による体内時計及び体温調節機構の解明

研究課題名（英文） Functional role of FGF21 in the circadian clock regulation

研究代表者

大石 勝隆（OISHI KATSUTAKA）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：50338688

研究成果の概要（和文）：

FGF21の体内時計制御における役割を検証する目的で、FGF21の欠損マウスを用いて、自由摂食下及び制限給餌下（夜行性のマウスに対して昼間の特定時間帯のみに給餌を行う）における、行動リズム及び時計遺伝子発現を調べた。行動周期及び制限給餌に対する予知行動や、時計遺伝子の発現リズムにはFGF21欠損の影響は認められなかった。一方、絶食後の再給餌によって、白色脂肪組織で*Fgf21*遺伝子の発現が誘導されることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

To evaluate the functional role of FGF21 in the circadian regulation of physiology and behaviour, we examined the temporal expression profiles of *Fgf21* and circadian clock genes in addition to behavioural activity rhythms under *ad libitum* feeding and time-imposed restricted feeding in mice. The free-running period of locomotor activity rhythm under ALF and the food anticipatory activity under RF remained intact in *Fgf21* knockout (KO) mice. Temporal expression profiles of circadian clock genes were essentially identical in peripheral tissues between WT and *Fgf21* KO mice. Re-feeding subsequent to transient fasting revealed that re-feeding but not fasting remarkably induces *Fgf21* expression in epididymal white adipose tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：生物時計

1. 研究開始当初の背景

我々は、体内時計（時計遺伝子）によって脂質代謝が制御されていることを世界に先駆けて発表し、その分子メカニズムについて研究を行ってきた。2005年には、脂肪酸代謝で中心的な役割を担っている核内受容体 PPAR α の日周発現が時計分子 CLOCK と BMAL1 によって直接的に転写制御されていることを見出した。フィブレートは、高脂血症（脂質異常症）治療薬として広く臨床で使用されている薬剤で、PPAR α のアゴニストであるが、2007年我々は、フィブレートの慢性投与が、マウスの体内時計に作用して、活動リズムを前進させる（早起きになる）ことを発見した。つまり、PPAR α の活性化に起因したエネルギー代謝の変化が、体内時計に対してフィードバックをかける可能性が考えられた。さらに、時計遺伝子 *Clock* の変異した睡眠障害（睡眠相後退症候群）モデルマウスの治療効果をも確認し、テレビや新聞などで広く報道された。また、フィブレートによる PPAR α の活性化は、体内時計の光応答性に影響している可能性も発表した。その後、フィブレートによる PPAR α の活性化が、マウスの体温を時刻依存的に低下させ、日内休眠（torpor）を誘導することを発見した。さらに脳波の測定から、デルタ波と呼ばれる深い睡眠を誘導することを発見した。

ちょうどその頃、アメリカ・テキサス大学のグループから、FGF21 の投与及び過剰発現マウスにおいて、絶食時に日内休眠が誘導されることが報告された（Inagaki et al., *Cell Metab*, 2007）。さらに同年、FGF21 の発現誘導には、PPAR α の活性化が重要な役割を担っていることが我々を含む複数のグループから同時に発表されていた。そこ

で我々は、フィブレート投与による日内休眠の誘導が、PPAR α の活性化によって発現誘導された FGF21 を介している可能性を考えた。我々の実験結果より、フィブレート投与による日内休眠が、活動期後半に時刻依存的に誘導されていることから、フィブレートを慢性投与したマウスにおいて、*Fgf21* の発現プロファイルを調べたところ、体温が低下する暗期後半において最も高い発現量を示すことが判明した。従って、フィブレート投与による時刻依存的な日内休眠の誘導には、FGF21 が関与している可能性が考えられた。

飢餓の状態においては、フィブレート投与と同様に PPAR α の活性化が誘導されることが知られている。2009年より我々は、飢餓状態を模倣することで知られているケトン体ダイエットの、体内時計及び体温調節に対する影響を検討していた。ケトン体ダイエットが、*Fgf21* の発現誘導とともに、体内時計の位相を顕著に前進させることを発見し、新聞等でも報道されるに至った。研究開始当時、我々は、ケトン体ダイエットの体温調節（日内休眠）に対する影響について検討を行っていた。

当時までの知見では、PPAR α の活性化とそれに引き続く FGF21 の発現誘導が、体内時計の位相前進や低体温（日内休眠）の誘導と同時並行で観察されていた。しかしながら、FGF21 のノックアウトマウスが開発されていなかったために、FGF21 の中枢作用が全く不明であった。2009年に入って、国内外それぞれから、FGF21 のノックアウトマウスに関する報告がなされ、以降 FGF21 の生理機能についての研究が進むものと期待されたが、当時、国内外2つのグループからの報告は結果が大きく異なっ

ている現状であった。FGF21 については、そのほとんどの研究が、抗糖尿病・抗肥満に関するものであり、中枢作用については、前述の Inagaki らの報告のみであった。FGF21 の体内時計との関連性については、申請時には全く報告されていなかった。

2. 研究の目的

当該研究の研究期間においては、申請者がこれまでに報告してきた、PPAR α のアゴニストやケトン体ダイエット負荷などによる、「体内時計の位相調節機構」及び「体温調節機構」への影響における、FGF21 の役割を解明することを第一の目的とした。それまで全く報告されていない FGF21 の中枢作用を調べるために、世界でほとんど報告されていない *Fgf21* 遺伝子のノックアウトマウスを対象として、我々がこれまで報告してきた諸条件を用いることによって、FGF21 の発現誘導と、体内時計あるいは体温調節機構との関連性を、個体レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ケトン体ダイエット負荷は、フィブラートの投与と同様に PPAR α を活性化することが知られている。そこで、ケトン体ダイエット負荷による体内時計の位相前進作用に PPAR α が関与している可能性を検証する目的で、PPAR α の欠損マウスを用いて、ケトン体ダイエット負荷の体内時計に対する影響について検討を行った。具体的には、PPAR α KO マウスに、ケトン体ダイエット (73.9% fat, 8.3% protein and 0.73% carbohydrates, w/w; modified AIN-93G; Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) を自由摂食により負荷し、飲水行動リズム及び末梢組織における時計遺伝子の発現

リズムを解析した。

哺乳類の体内時計制御における FGF21 の関与を明らかにする目的で、*Fgf21* 遺伝子の発現制御についての検討を行った。具体的には、従来 *Fgf21* 遺伝子の発現を誘導すると報告されている PPAR α のリガンドとともに、PPAR γ のリガンドに対する応答性を、培養肝細胞及びマウス個体を用いて検討した。

哺乳類の体内時計制御における FGF21 の関与を直接的に調べる目的で、*Fgf21* 遺伝子の欠損マウスを用いて、行動リズムに対する影響、及び、給餌性リズム形成に対する影響を検討した。具体的には、回転輪を用いた輪回し行動の日周リズムについて周期性を比較するとともに、末梢組織における時計遺伝子の発現リズムを調べた。また、夜行性のマウスに対して、強制的に昼間の数時間のみに餌を与えることにより、その予知行動の比較を行った。

4. 研究成果

ケトン体ダイエット負荷は、フィブラートの投与と同様に PPAR α を活性化することが知られている。そこで、ケトン体ダイエット負荷による体内時計の位相前進作用に PPAR α が関与している可能性を検証する目的で、PPAR α 欠損マウスを用いて、ケトン体ダイエット負荷の体内時計に対する影響について検討を行った。1 週間のケトン体ダイエット負荷は、フィブラートを投与した場合と同様、野生型マウスの肝臓において、PPAR α の典型的な転写ターゲット遺伝子である *Cyp4A10* や *FGF21* の mRNA 発現を顕著に誘導したが、PPAR α 欠損マウスにおいては、これらの発現誘導が顕著に抑制されていた。ケトン体ダイエット負荷の末梢時計に対する影響を検討するために、心臓と肝臓における時計遺伝子及び被時計制御

遺伝子の発現を調べたところ、PPAR α 欠損マウスにおいても野生型マウスと同様に、日周発現の位相前進が認められた。行動リズムを規定している脳内中枢時計に対する影響を検討するために、行動リズムの測定を行ったところ、PPAR α 欠損マウスにおいても野生型マウスと同様に、活動開始時刻の前進が認められた。これらの結果は、ケトンダイエット負荷に伴う中枢時計及び末梢時計の位相前進には、PPAR α が必須では無い可能性を示している。AMPKの活性化やカロリー制限が時計の位相前進に関わっているとの報告もあることから、ケトンダイエット負荷やフィブラートの投与による飢餓状態が体内時計の位相前進に関わっているものと考えられるが、その分子機構の解明が期待される。

哺乳類の体内時計制御における FGF21 の関与を明らかにする目的で、*Fgf21* 遺伝子の発現制御及び欠損マウスを用いた体内時計機能の解析を行った。

肝臓は、FGF21 の主要な産生臓器として考えられており、*Fgf21* 遺伝子の発現は、核内受容体である PPAR α によってポジティブに転写調節されていることが知られているが、ヒト及びマウス由来の培養肝細胞を用いた解析により、PPAR γ の特異的リガンドであるロシグリタゾンやピオグリタゾンによってもその発現が顕著に誘導されることが判明した。マウス個体を用いた検討からも、PPAR α のリガンドであるベザフィブラートのみならず、ピオグリタゾンによる発現誘導が確認された。脂肪肝においては、PPAR γ の発現量が増大することが知られており、PPAR α とともに PPAR γ が FGF21 の発現制御に関与しているものと思われる。

Fgf21 遺伝子欠損マウスを用いて、行

動リズムに対する影響を検討したが、恒暗条件下における活動周期には特に影響が認められなかった。給餌性のリズム形成機構における FGF21 の関与を調べる目的で、本来の休息期である明期の特定時間帯に給餌を行ったところ、給餌に対する予知行動にも特に影響は認められなかった。末梢組織に存在する末梢時計に対する FGF21 の関与を明らかにする目的で、自由摂餌下及び制限給餌下における時計遺伝子の発現を、肝臓及び白色脂肪組織において検討した。肝臓での時計遺伝子発現には大きな影響が認められなかったものの、脂肪組織における *Per1* 及び *Per2* 遺伝子の日周発現は、自由摂餌下、野生型マウスと *Fgf21* 遺伝子の欠損マウスで大きく異なっており、*Per1*、*Per2* ともに、発現位相の前進及び振幅の増大が認められた。受容体の発現分布などから、脂肪組織が FGF21 の標的組織である可能性が指摘されており、脂肪組織での時計遺伝子発現に FGF21 が何らかの役割を担っている可能性が考えられる。

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5件)

- ① Qishi K, Koyanagi S, Ohkura N, Circadian mRNA expression of coagulation and fibrinolytic factors is organ-dependently disrupted in aged mice, *Exp Gerontol*, 査読有、46、2011、994-999、DOI : 10.1016/j.exger.2011.09.003
- ② Qishi K, Konishi M, Murata Y, Itoh N, Time-imposed daily restricted feeding induces rhythmic expression of *Fgf21* in white adipose tissue of mice, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、412、2011、396-400、DOI : 10.1016/j.bbrc.2011.07.125
- ③ Qishi K, Tomita T, Itoh N, Ohkura N, PPAR γ activation induces acute PAI-1 gene expression in the liver but not

in adipose tissues of diabetic model mice、Thromb Res、査読有、128、2011、e81-e85、

DOI : 10.1016/j.thromres.2011.06.020

- ④ Oishi K, Tomita T, Thiazolidinediones are potent inducers of fibroblast growth factor 21 expression in the liver、Biol Pharm Bull、査読有、34、2011、1120-1121、
DOI : 10.1248/bpb.34.1120
- ⑤ Oishi K, Uchida D, Ohkura N, Horie S, PPAR α deficiency augments a ketogenic diet-induced circadian PAI-1 expression possibly through PPAR γ activation in the liver、Biochem Biophys Res Commun、査読有、401、2011、313-318、
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.060

〔学会発表〕(計6件)

- ① 大石勝隆、食を介した生体リズムの制御、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学 (京都)
- ② 宮崎歴、伊藤奈々子、大山純加、大石勝隆、ストレス性睡眠障害モデルマウスの開発とその解析、第 18 回日本時間生物学会学術大会、2011 年 11 月 24 日、名古屋大学 (愛知)
- ③ 大山純加、伊藤奈々子、宮崎歴、大石勝隆、ストレス性睡眠障害モデルマウスにおける耐糖能異常、第 18 回日本時間生物学会学術大会、2011 年 11 月 24 日、名古屋大学 (愛知)
- ④ 堀江修一、平石さゆり、梶村佳世、平岡真実、大石勝隆、マウス食餌中の脂肪酸組成の差異が血管内皮細胞の抗血栓性機能に及ぼす機能、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都国際会議場 (京都)
- ⑤ 宮崎歴、伊藤奈々子、大蔵直樹、大石勝隆、慢性ストレス性睡眠障害モデルマウスの開発と評価、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川)
- ⑥ 大石勝隆、食を介した生体リズムの制御と睡眠の改善を目指して、第 17 回日本時間生物学会学術大会、2010 年 11 月 20 日、早稲田大学・国際会議場・井深大記念ホール (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 勝隆 (OISHI KATSUTAKA)
独立行政法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門・研究グループ長
研究者番号：50338688