

## 47. 生活習慣病の発症と生物時計システム制御

宮崎 充功

Key words: 概日リズム, 肥満, 生活習慣病, 時計遺伝子

\*北海道医療大学 新学部設置準備室  
(リハビリテーション科学部  
理学療法学科)

### 緒言

概日リズムとは約 24 時間周期で振動する生物学的サイクルであり, 睡眠・覚醒, 体温調節やホルモン分泌をはじめとする多くの生理機能は, 生物時計の発振する概日リズムに強い影響を受ける. 細胞内における概日リズム制御は, コアクロックと総称される時計遺伝子の転写・翻訳を介したフィードバックループによって行われる. 哺乳動物のコアクロックにおける正の制御ループは, bHLH-PAS 型の転写因子である *Bmal1* (*Brain and muscle arnt-like protein-1*) および *Clock* (*Circadian locomotor output control kaput*) によって構成される. BMAL1:CLOCK のヘテロ複合体は, *Period* (*Per1/2/3*) や *Cryptochrome* (*Cry1/2*) といった時計遺伝子の転写調節領域に存在するエンハンサー配列に結合して転写を促進する. これらの遺伝子の翻訳産物である PER および CRY タンパク質 (負の制御因子) は CLOCK:BMAL1 複合体による転写促進活性を抑制するため, 自らの遺伝子転写を負に制御するネガティブフィードバック機構が成立する. これら正負のフィードバックループが, 約 24 時間という時間をかけて 1 サイクルすることにより, 細胞内の概日リズム振動が生じると考えられている. 近年の遺伝子改変動物を用いた基礎的検討から, 概日リズム制御の破綻に伴い, エネルギー代謝異常をはじめとする様々な疾患様形質の発現が観察されている<sup>1)</sup>. またヒトを対象とした疫学的研究からも, 睡眠や食事のタイミングなどのライフスタイルと, 肥満や糖尿病を含む生活習慣病や悪性腫瘍, 循環器系疾患の発症など, 各種の慢性疾患発症と概日リズムの乱れが大きな関連性を持つ可能性が示唆されている<sup>2)</sup>. このようにヒトを含む哺乳動物において, 生物時計システムの制御不全と生活習慣病を含む疾患との関連性が徐々に明らかとなっている<sup>3,4)</sup>. しかしながら, 肥満や糖尿病といったメタボリックシンドロームの発症と時計遺伝子の制御がどのように関連しているのか, その詳細は明らかではない. それに加え, 全身のエネルギー代謝制御において非常に重要な役割を果たす各末梢組織 (骨格筋や脂肪, 肝臓など) の生物時計システムが, 生活習慣病の発症に伴いどのような変化を引き起こすのか, ほとんど検討されていない. そこで本研究では, 特に栄養状態の変化に伴う肥満症の発症に着目し, 高脂肪食摂取による肥満状態の誘発が全身の末梢組織における時計遺伝子発現制御にどのような影響をおよぼすのかを解析した.

### 方法

実験対象には C57BL/6J 系マウス (雄, 5 週齢) を採用し, 通常食 (RD: Regular diet, 粗脂肪含量 5%, 日本クレア) を与える対照群および高脂肪食 (HFD: High Fat Diet, 粗脂肪含量 32%, 日本クレア) を与える肥満群に任意に分類した. 1 週間の馴化飼育の後, 6 週齢から 12 週齢まで 6 週間の食餌介入を行った. 飼育期間中, 飼料および水は自由摂取とし, 12 時間毎の明暗サイクルを厳密にコントロールした. その後 4 時間毎の組織サンプリングを計 6 回経時的に行い, 骨格筋 (腓腹筋), 脂肪 (精巣上体白色脂肪) および肝臓を採取し, Realtime-PCR 法により各種の遺伝子発現解析を行った.

\*現所属: 北海道医療大学 リハビリテーション科学部 理学療法学科

## 結果

6週間の高脂肪食摂取に伴い、体重/脂肪重量の顕著な増加および全身性の耐糖能異常が認められ、明らかな肥満状態の誘発が確認された (Fig.1).

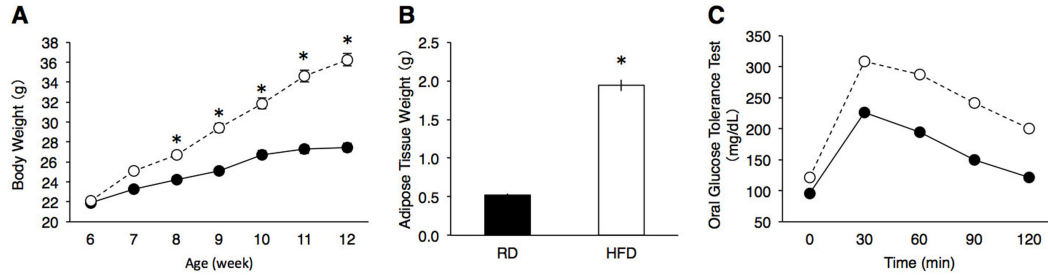


Fig. 1. Obesity and abnormal glucose metabolism were induced by high fat diet feeding.

A) Changes in body weight of mice fed either regular diet (RD) (black lines with filled marker) or high fat diet (HFD) (dotted lines with open marker) over 6 weeks. B) Increased weight of adipose tissue (epididymal fat) in HFD. C) Typical example of oral glucose tolerance test (2 mg/g of glucose). Values were expressed as mean  $\pm$  SEM. Asterisks denote statistically significant differences between RD and HFD for the specified time point (Student's t test; \* $p < 0.05$ ).

またマウスの末梢組織における時計遺伝子の発現パターンについて、通常食を与えたRD群のデータに注目した場合、骨格筋や肝臓、脂肪といった異なる組織においても、*Bmal1*や*Per2*といったコアクロック遺伝子の発現パターンはほぼ同期した位相を示しており、個体全体として1つの生物リズムを形成することが確認された。一方で高脂肪食を与えたHFD群（肥満群）においては、コアクロック遺伝子の発現パターンは24時間の概日リズム振動を示してはいるものの、特に肝臓および脂肪組織において、位相の前進（肝臓における*Bmal1*および*Per2*遺伝子発現）や振幅の平坦化（脂肪組織における*Per2*遺伝子発現）といった遺伝子発現制御の異常が観察された (Fig.2).

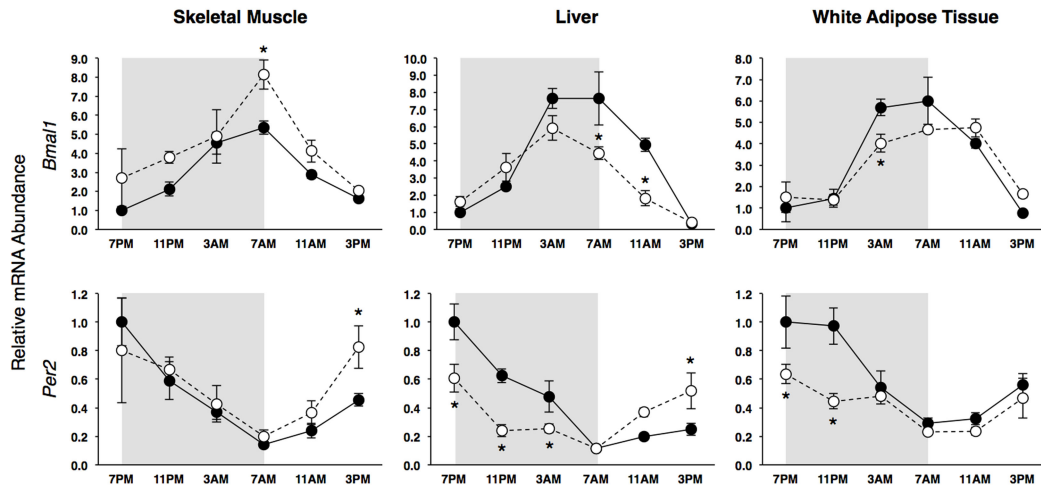


Fig. 2. High fat diet attenuates amplitude of clock gene expression.

Relative expression of the core circadian clock genes *Bmal1* and *Per2* in the skeletal muscle, liver and white adipose tissue were analyzed by real-time PCR. Tissues were harvested every 4 hour from mice fed either regular diet (RD) (black lines with filled marker) or high fat diet (HFD) (dotted lines with open marker) for 6 weeks. Values were expressed as relative abundance (mean  $\pm$  SEM) after normalization to *Gapdh*. Asterisks denote statistically significant differences between RD and HFD for the specified time point (Student's t test; \*p < 0.05).

さらに、コアクロックによって制御されるその他の時計制御遺伝子群 (*Rev-erb* および *Dbp*) の発現変化においても、特に肝臓および脂肪組織における発現制御異常が認められた (Fig.3). 一方、骨格筋においては、RD 群と HFD 群の間に全く変化は認められなかった。

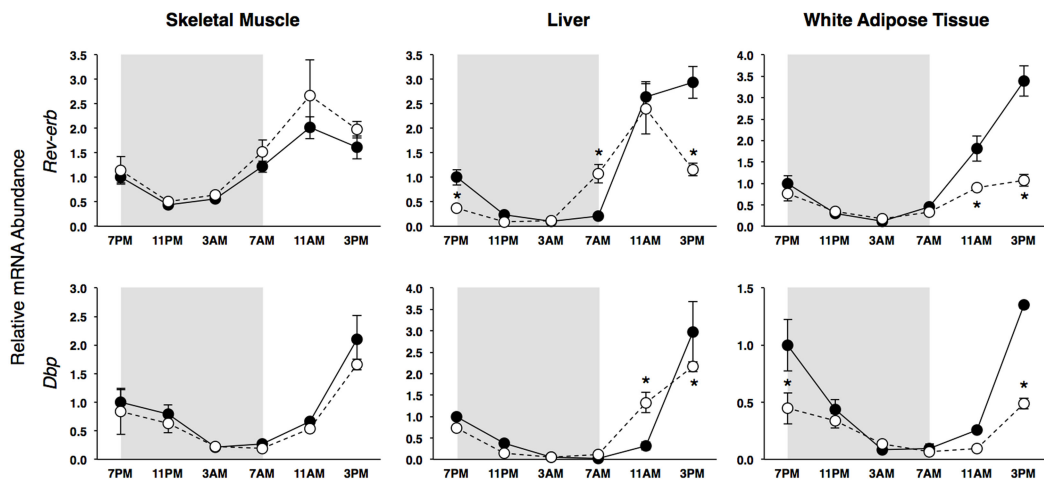


Fig. 3. High fat diet alters amplitude and expression pattern of clock-controlled gene.

Relative expression of the clock-controlled genes *Rev-erb* and *Dbp* in the skeletal muscle, liver and white adipose tissue were analyzed by real-time PCR. Tissues were harvested every 4 hour from mice fed either regular diet (RD) (black lines with filled marker) or high fat diet (HFD) (dotted lines with open marker) for 6 weeks. Values were expressed as relative abundance (mean  $\pm$  SEM) after normalization to *Gapdh*. Asterisks denote statistically significant differences between RD and HFD for the specified time point (Student's t test; \*p < 0.05).

また、特に脂肪における組織特異的概日リズム遺伝子とされる *PGC1 $\alpha$*  および *Leptin* の遺伝子発現変化を検討したところ、いずれの遺伝子発現に関しても明確な概日リズム変動は観察されなかったが、HFD 群における *PGC1 $\alpha$*  遺伝子の発現減少および *Leptin* 遺伝子発現の恒常的上昇が認められた (Fig4)。

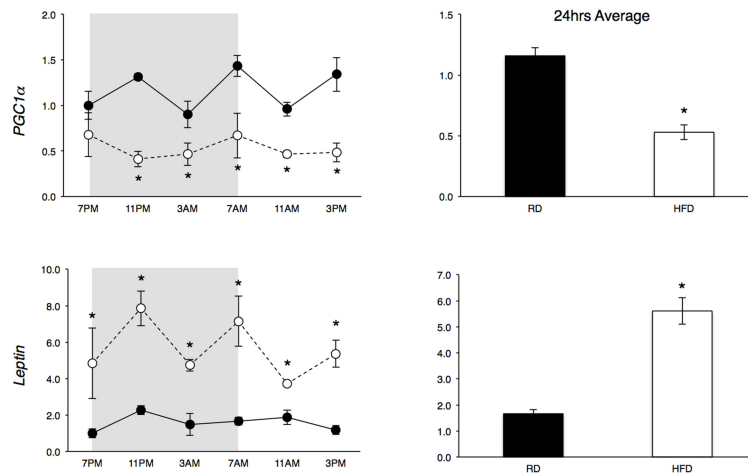


Fig. 4. Relative gene expression of the *PGC1 $\alpha$*  and *Leptin* in the white adipose tissue.

Relative expression of the *PGC1 $\alpha$*  and *Leptin* in the white adipose tissue were analyzed by real-time PCR. Tissues were harvested every 4 hour from mice fed either regular diet (RD) (black lines with filled marker) or high fat diet (HFD) (dotted lines with open marker) for 6 weeks. Average values over 24 hour were also shown in each group. Values were expressed as relative abundance (mean  $\pm$  SEM) after normalization to *Gapdh*. Asterisks denote statistically significant differences between RD and HFD for the specified time point (Student's t test; \*p < 0.05).

## 考 察

- ・6週間の高脂肪食摂取によって、体重・脂肪重量増加，耐糖能異常など，肥満症が惹起された。
- ・肥満症発症に伴い，全身の末梢組織におけるコアクロック遺伝子 (*Bmal1* および *Per2*) および Clock-Controlled 遺伝子 (*Rev-erb* および *Dbp*) の発現制御異常 (遺伝子発現パターンのズレおよび平坦化) が観察された。
- ・時計遺伝子の発現異常に伴い，組織特異的概日リズム遺伝子 (ex. *PGC1 $\alpha$* , *Leptin*) の制御異常が引き起こされる可能性が示唆された。

以上の結果から，高脂肪食摂取に伴う肥満状態の誘発に伴い，全身の末梢組織のうち特に肝臓や脂肪における概日リズムの制御異常が誘導され，その結果全身のエネルギー代謝調節能の破綻が惹起される可能性が示唆された。現在，肥満状態を改善／抑制するための運動療法介入を行った際の概日リズム調節機構の関与について，さらに検討を進めているところである。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は，筑波大学体育系の武政 徹である。最後に，本研究の遂行に対して多大なるご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Ko, C. H. & Takahashi, J. S. : Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, Review Issue No 2 : R271-277, 2006.
- 2) Rajaratnam, S. M. & Arendt, J. : Health in a 24-h society. *Lancet*, **358** : 999-1005, 2001.

- 3) Miyazaki, M., Schroder, E., Edelman, S. E., Hughes, M. E., Kornacker, K., Balke, C. W. & Esser, K. A. : Age-associated disruption of molecular clock expression in skeletal muscle of the spontaneously hypertensive rat. *PLoS ONE*, **6** : e27168, 2011.
- 4) Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Bragança, J., Bihoreau, M. T., Levy, J. C., Farrall, M. & Gauguier, D. : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104** : 14412-14417, 2007.