

内分泌系を介した食による概日時計の位相調節機構

明 石 真

山口大学時間学研究所 教授

緒 言

多岐にわたる生体機能は概日リズムを示しており、このペースメーカーとして概日時計（約24時間周期の体内時計）が存在している。概日時計は身体のほぼ全ての細胞内に存在しており、自律的な時計遺伝子の発現リズムがその分子の本体である。環境に応答して生体が恒常性を維持するためには、概日時計は適切に位相調節を受けて一日の環境変化のリズムと同調しなければならない。しかしながら、現代生活の環境や習慣は、概日時計と環境リズムとのずれを頻発に起こしてしまう。このずれが修正されずに慢性的に持続することで、恒常性維持機構の破綻と多臓器負担の蓄積の原因となり、睡眠障害・精神疾患・糖尿病・循環器疾患・がん・生殖機能低下など極めて多岐にわたる疾患のリスクになることがわかってきている。このように、日常生活の中で起こる時差症候群が全世界的に蔓延してきていることが統計学的な研究で報告されている¹⁾。

概日時計の位相調節には光と摂食が強く関与する。これまで、多くの研究成果によって、光が概日時計を調節するメカニズムについては詳細が明らかにされてきた。光による位相調節の研究対象は、主には網膜から視交叉上核（視床下部に存在する概日時計中枢であり、全身の細胞の概日時計を同調させる役割を担う組織）までの神経情報伝達の解明であり、標的となる組織および分子が比較的絞りやすく研究が進みやすかった。しかしながら、摂食による位相調節機構については、関わる組織や分子が多岐にわたるため、メカニズムにおいて不明な点が多く残されている。

本研究では、摂食によって誘導される内分泌系分子（ペプチドホルモン）に着目する。生体内で活性を持つことが期待される分子を同定するために、摂食誘導性のペプチドホルモンを幅広く対象として、*ex vivo*の組織培養系によって、時計遺伝子発現リズム位相の調節作用を有する物質のスクリーニング探索を行う。この実験を多数の臓器を用いて行うことで、各ペプチドホルモンの

標的臓器を特定することが可能である。

本研究の概要

私たちの先行研究により、摂食による概日リズムの位相調節においてインスリンの関与が明らかになった²⁾。しかしながら、同時に、インスリンとは別の位相調節因子の存在も浮き彫りになってきた。そこで私たちは、他の内分泌系因子が関与している可能性に注目しており、本研究では概日時計位相調節に関わる内分泌物質群とその標的臓器の同定を行う。研究期間終了後もこの研究を継続して行い、これらの内分泌物質は、どのような細胞内情報伝達経路を経て時計遺伝子の発現調節を行うのか明らかにしていく。

時計遺伝子 *Period2* の遺伝子産物 PER2 と発光タンパク質であるルシフェラーゼが融合した分子を発現するマウスを使用する。まずは、肝臓などの摂食に対して時計遺伝子発現リズムの位相変化が大きい臓器を用いて実施する。臓器のスライス培養を行い、PER2 の発現リズムをルシフェラーゼの発光としてリアルタイムモニタリングする。この際、摂食に応答して血中で濃度上昇を示すことが知られている様々なペプチドホルモンを添加して、時計遺伝子発現リズムの位相変化を検出する。私たちの実験系では多検体スクリーニングが可能である。さらに、変化が検出された物質に対して、時刻依存的な効果の差異（専門的には位相応答性と呼ばれる）についても評価する。このような概日位相に特異的な応答性が検出されることで、より有望な候補とみなすことができる。

さらに、肝臓だけにとどまらず、候補物質の組織特異性を多臓器のスライス培養によって検証する。摂食による概日時計位相調節には組織による差異が明確に存在することが報告されていることから、先行研究の結果と今回のスライス培養実験の相関性を確認することで物質をさらに絞り込むことができる。

材料と方法

本試験では、ヒトやマウスにおいて、摂食直後に血液中において素早い濃度上昇が報告されている10種類のペプチドホルモンを用いることとした(本試験のデータは未発表であるため、ここではペプチドの実名は非公開とする)。この実験は、摂食による概日時計調節に関わる因子を見つけ出すための一次スクリーニングという位置づけであるため、これらのペプチドの培養組織への添加量は、生体内で検出される濃度の10倍以上に設定している。また、コントロールサンプルには、ペプチド

を溶解した際に使用した溶媒を添加している。

培養用の臓器を採取するマウスとして、時計遺伝子 *Period2* の遺伝子座にホタル *Luciferase* 遺伝子を導入したノックインマウスを使用した³⁾。このマウスでは、PER2タンパク質とホタルLUCタンパク質が融合して発現しており、発光レベルとしてPER2の発現量を検出することができる。ペプチドの効果を検証する組織として、スライス組織サンプルの作成の容易さと再現性の高さに基づいて、まずは肝臓・腎臓・膵臓・肺・顎下腺を使用して行うこととした。一部のペプチドについては、

表1 本研究に使用した摂食応答性のペプチドホルモンと、効果を検証した臓器名を示している。時計タンパク質PER2の発現レベルが上昇中の位相(図中「上昇」と下降中の位相(図中「下降」)の2位相で添加を実施した。各ペプチドホルモンの効果を、位相前進(PA)または位相後退(PD)で示している。位相変化の強度は+の数で表している。

摂食応答性ペプチド		培養臓器名と添加位相									
		肝臓		腎臓		膵臓		肺		顎下腺	
		下降	上昇	下降	上昇	下降	上昇	下降	上昇	下降	上昇
1	ペプチドA	PD+	—	—	PD+	PA+	PD+	PD+	—	—	—
2	ペプチドB	—	—	—	—	ND	ND	—	—	—	—
3	ペプチドC	ND	ND	—	—	—	ND	—	—	—	PD+
4	ペプチドD	—	—	PD+	—	—	—	—	PA+	—	PD+
5	ペプチドE	—	PD+	—	—	ND	ND	—	—	PA+	PA+
6	ペプチドF	PD+++	PA+++	—	—	ND	ND	—	—	—	—
7	ペプチドG	PA+	ND	—	—	—	—	—	—	PD+	—
8	ペプチドH	ND	ND	—	—	—	PA+	—	—	—	—
9	ペプチドI	—	ND	PD+	—	ND	ND	—	—	—	PD+
10	ペプチドJ	ND	—	—	PA+	—	PA+	—	—	—	PD+

PA: Phase advance, PD: Phase delay, ND: 現時点では判断できず, —: 未実施.

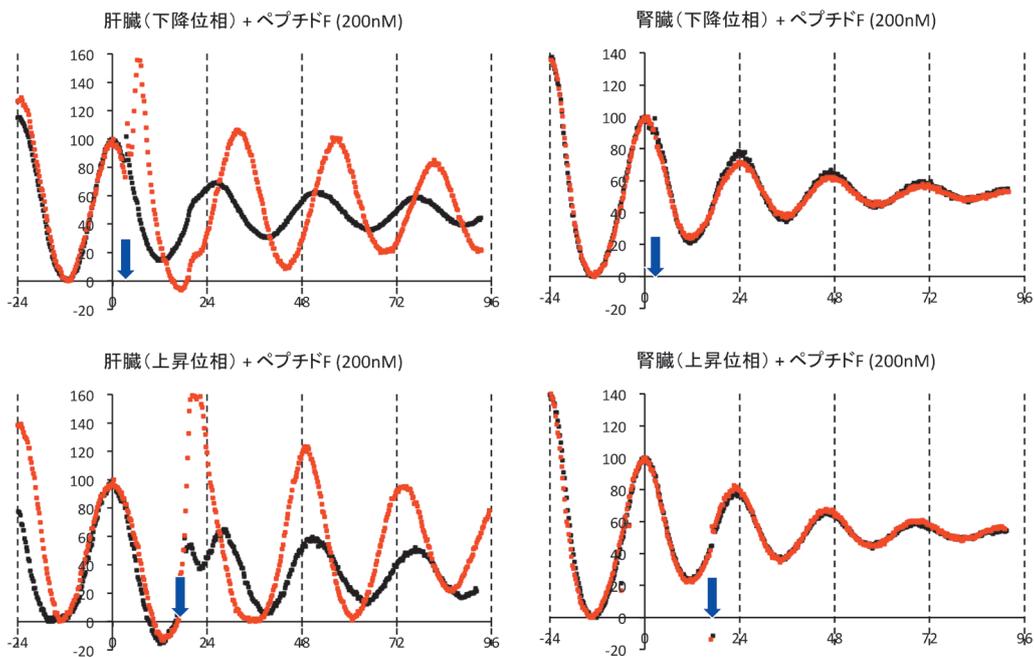


図1 肝臓および腎臓に対するペプチドホルモンFの効果を示している。添加前のPER2の発現量(発光レベル)のピークを発現量「100」および時間「0」と定義している。青矢印において、溶媒(黒いグラフ)またはペプチドF(赤いグラフ)を継続投与している。

他の組織（骨格筋・胃・小腸・大腸・脂肪組織）なども対象にスクリーニングを継続している（ここではデータは省略）。

マウスをイソフルランで麻酔後に頸椎脱臼によって安楽死させ、摘出した臓器を素早く組織スライス作成用のチョッパーによって薄切した。スライス組織はミリセル上に乗せて培養することで、培養液中において浮遊することを防いでいる。また、培養液にはフェノールレッドが含まれていないDMEMを使用しており、Luciferaseの基質であるLuciferinを0.1 mMの濃度で培地に加えている。発光はLM2400（浜松ホトニクス社）を使用しており、15分間隔で1分間の積算値としてPMTによるフォトンカウンティングを行っている。また、35度および5% CO₂の条件下で継続培養するために、LM2400はCO₂インキュベーターの中に設置している。

ペプチドの添加は、位相応答性による作用の違いが起る可能性を考慮して、2つの位相について行っている。すなわち、PER2::LUCの発光リズムの波形に基づいて、PER2発現量の上昇位相および下降位相において添加している。

結果と考察

Period2::Luciferase マウスを用いて作成した組織培養サンプルにおいて、発光レベルの明瞭な概日変動を検出することが確認できた。摘出した臓器スライスに対して位相同調刺激を与えずに培養した場合は、サンプルごとの位相の差異が発生してしまう。そのため、ペプチド添加による影響の有無を検証することが困難となり、またおそらくは細胞間の位相の同調が不十分であるために比較的振幅が小さくなる傾向も見られた。そのため、Dexamethasone (DEX: 合成副腎皮質ホルモン) による刺激を与えることで、細胞間の時計遺伝子発現リズムの位相同調を行ってから、1周期以上の健全な発現リズムを観察した後に、ペプチドの添加を行うことにした。

10種類のペプチド（ここでは具体名を伏せてAからJで表している）の各組織への効果を表1にまとめている。“PA”は位相前進、“PD”は位相後退、“—”は効果なし、また“ND”は現時点では判別できないことを示している。位相変化の強度は“+”の数で表しているが、現時点では明確な客観的基準による強度分類とはなっていない。10種類のペプチドのうち9種類において、いずれかの培養組織において、少なくとも微弱な位相調節作用が検出されている。しかしながら、本実験において使用し

ているペプチドの濃度は、生体内において検出される濃度よりも少なくとも10倍以上高いものであり、本実験において検出された微弱な位相作用効果が生体内において生理的な意味を持つか疑問である。一方、強力な作用が検出されたのは、ペプチドFのみである。肝臓におけるPER2の発現リズムの下降位相において強力な位相後退作用を示すとともに、上昇位相においては位相前進作用を示すことがわかった（図1）。すなわち、位相応答性が明確に存在することが示唆された。これは、摂食時において、肝臓の時計遺伝子の発現リズムの変化に位相応答性が検出されていることと関連のある結果である。ところで、これらのペプチドFの結果は、私たちがすでに論文発表しているインスリンによる効果とほぼ同様であると言える。したがって、このペプチドFこそ、インスリンの効果を補償する物質だと考えられる。

ところが、大変残念なことに、このペプチドFの肝臓の時計遺伝子発現リズムに対する位相調節効果に関する論文が、2015年の3月に海外の研究グループより報告されてしまった⁴⁾。この論文内で示されている結果は、私たちが得たデータの結果とほぼ同様であり、私たちのスクリーニング系が期待通り機能していたことを示唆している。今後の研究の方針として、今回発見したペプチドFと、私たちがすでに報告したインスリンが、どのように相互作用しているのか明らかにしたいと考えている。また、今後もスクリーニングを続けることで、ペプチド群の他の臓器への効果も検証して行きたい。

謝 辞

本実験の実施に多大な貢献をしてくれた時間学研究所の佐藤美穂特命助教に深く感謝したい。また、岡光技術補佐員を中心とする、研究室内のメンバーに対しても技術的なサポートについて感謝したい。本研究への公益財団法人三島海雲記念財団の助成に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) T. Roenneberg, et al.: *Curr. Biol.*, **10**, 939-943, 2012.
- 2) M. Sato, et al.: *Cell Rep.*, **8**(2), 393-401, 2014.
- 3) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. S. H. Yoo, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**(15), 5339-5346, 2004.
- 4) Oxyntomodulin regulates resetting of the liver circadian clock by food. D. Landgraf, et al.: *Elife*, **4**: e06253, 2015.