

アディポネクチンによる体内時計制御機構の解明とその臨床的意義

1. 研究の目的

(1) 我が国ではシフトワーカー及び長時間労働者の数が急増しており、これらの労働者の健康問題がクローズアップされている。シフトワークによる肥満、糖尿病などの代謝性疾患の発症メカニズムについては不明な点が多いが、体内時計の変調の関与が示唆されている。体内時計の変調が代謝性疾患の発症に関連していることが明らかにされているが、体内時計の変調による代謝性疾患の発症メカニズムの詳細は不明な点が多い。近年、臓器連関を媒介する液性因子として、脂肪細胞から分泌される”アディポネクチン”が注目を集めている。アディポネクチンはその受容体を介して、糖・脂質代謝促進作用のみならず、抗がん作用などの様々な機能を示す生理活性物質である。申請者は、初代肝細胞を用いた検討より、アディポネクチン受容体作動薬が時計遺伝子の発現量及び振幅を低下させることを見出した。このことは、アディポネクチンシグナルの活性化は肝細胞の体内時計を直接的に制御することを示している。そこで本研究は、体内時計の変調に起因した生活習慣病の発症メカニズムを、代謝調節因子であるアディポネクチンによる体内時計システム制御の観点から明らかにする。

2. 研究の計画

(1) アディポネクチンによる時計遺伝子の発現制御機構(2020年度)

①肝臓の体内時計システムへのアディポネクチンの直接作用を明らかにするため、体内時計を同調させた初代肝細胞に組換えアディポネクチン処理して時計遺伝子の発現量を測定する。

②肝臓のアディポネクチンシグナルは、AdipoR1及びAdipoR2の受容体を介してシグナル伝達される。そこで、これら受容体をRNAi法により発現抑制した初代肝細胞を用いて肝臓の体内時計制御におけるアディポネクチン受容体の関与を明らかにする。

③アディポネクチンはその受容体の下流に存在するAMPキナーゼ(AMPK)及び核内受容体PPAR α の活性化を介してエネルギー代謝を調節している。そこで、AMPK阻害剤あるいはPPAR α アンタゴニストを用いてアディポネクチンによる体内時計制御機構を明らかにする。

(2) シフトワーカー及び長時間労働者におけるアディポネクチン濃度の変動(2020年度)

シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度を解析し、体内時計関連分子としての新たな臨床的意義を検証する。本研究の参加に同意した被験者より、採血(10 mL)及び質問紙による生活習慣を含めた社会心理的要因(シフトワーカーの有無、勤務体系、抑うつ症状、ピッツバーグ睡眠質問票、朝型夜型質問紙)について評価を行う。現在集められた採血の検体からDNAのSNP多型(CLOCK、BMAL1)及び血清におけるアディポネクチン濃度、IL-6、TNF α などのサイトカイン濃度を測定する。

(3) アディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析

新型コロナウイルスの蔓延のため、上記の臨床研究の着手が困難であったため、2022年度に予定していたアディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析を本年度に前倒して行った。予備的検討においてVery low density lipoprotein (VLDL)分泌能の時間依存性にアディポネクチンの関与が認められたことから、アディポネクチンは、体内時計システムの調節を介して肝臓のエネルギー代謝に時間依存性を与えていることが推察される。そこで本研究では、アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御及び時間依存的なエネルギー代謝制御についてアディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスを用いて検討する。本研究におけるControlマウスは、同腹より得られたAdn(+/+)マウスを用いる。

①Adn(-/-)及びControlマウスの肝臓における時計遺伝子の発現量を測定する(4時間毎)。

②アディポネクチンによるエネルギー基礎代謝(酸素消費量、二酸化炭素排出量、エネルギー消費量)について呼吸代謝装置を用いて解析する。

③Adn(-/-)マウスの随時血糖値及びインスリン値を測定する。また、時間依存的な糖新生能、耐糖能、インスリン感受性へのアディポネクチンの影響についても解析する。

④アディポネクチンによる時間依存的な血液生化学的パラメーター及び肝臓脂質含量を検討する。

3. 研究の成果

(1)アディポネクチンによる時計遺伝子の発現制御機構

アディポネクチンはその受容体の下流に存在するAMPキナーゼ(AMPK)及び核内受容体PPAR α の活性化を介してエネルギー代謝を調節している。そこで、AMPK阻害剤あるいはPPAR α アンタゴニストを用いてアディポネクチンシグナルによる時計遺伝子発現制御機構を検討した。アディポネクチンシグナルの活性化による時計遺伝子発現量の低下は、AMPK及びPPAR α のいずれかあるいは両方の阻害剤処理によって回復が見られた。

(2)シフトワーカー及び長時間労働者におけるアディポネクチン濃度の変動

日本大学医学部附属板橋病院の看護職員及び受診患者を被験者としてシフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度の解析を予定していた。しかしながら、新型コロナウイルスの蔓延により、感染指定病院である本院での臨床研究の実施が困難な状況下が続いたため、被験者からのサンプル採取が2020年12月まで時間を要した。合計97名(夜勤(当直)あり:52名、夜勤(当直)なし:45名)が募集し、本研究の参加に同意した。参加同意した後、午前中に病院の指定場所で採血(10mL)及び質問紙による生活習慣を含めた社会心理的要因(シフトワーカーの有無、勤務体系、抑うつ症状、ピッツバーグ睡眠質問票、朝型夜型質問紙)について評価を行った。[解析]現在集められた採血の検体からDNAのSNP多型(CLOCK、BMAL1)及び血清におけるアディポネクチン濃度、IL-6、TNF α などのサイトカイン濃度については解析中である。

(3)アディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析

①アディポネクチンによる肝臓の体内時計システム制御について、まずAdn(-/-)マウスの肝臓の時計遺伝子発現量の概日リズムの観点から解析を行った。その結果、Adn(-/-)マウスの肝臓における時計遺伝子発現量の概日リズムの変調が認められ、特にCircadian Time (CT)22におけるCry1及びCry2の発現量に著しい低下が示された。一方、Adn(-/-)マウスの骨格筋(腓腹筋)および精巣上体周囲の脂肪組織において時計遺伝子の発現量の概日リズムに違いは認められなかった。

②アディポネクチンによる脂質代謝の時間依存性を明らかにするために、Adn(-/-)マウスにおける血中脂質濃度を測定した。Adn(-/-)マウスにおいて血清トリグリセリド濃度、血清コレステロール濃度の増加及び概日リズムが認められたが、Controlマウスにおけるこれらの濃度は一日を通してほぼ一定の値を示した。そこで、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量を解析したところ、Adn(-/-)マウスにおいて脂質合成のマスターレギュレーターであるSrebp1c、その標的遺伝子であるFas発現量の増加及び概日リズムの異常が認められた。また、SREBP1タンパク質は小胞体からゴルジ体へ輸送され、そこでプロセッシングを受け、転写因子として作用するが、近年、SREBP1のプロセッシングを抑制する膜タンパク質として同定されたInsig2a遺伝子の発現量がAdn(-/-)マウスにおいて著しく減少していた。これらの結果から、アディポネクチンはSREBP活性を介したde novoの脂肪酸合成の時間依存的な制御を通じて、血清トリグリセリドの恒常性維持に関与していることが示された。また、Adn(-/-)マウスにおいてコレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA reductase、肝臓からのコレステロールの流出に関与するAbca1発現量の増加、そしてコレステロールの肝臓への取り込みに関与するSr-b1発現量の低下が見られた。

予備的検討で見られたAdn(-/-)マウスにおけるVLDL分泌能の日内変動の消失の分子メカニズムを明らかにする目的で、肝臓におけるVLDL分泌関連遺伝子の発現量を検討した。Controlマウスでは、ApoB100及びMtp発現量は、CT22に発現ピークを持つ概日リズムを示したが、Adn(-/-)マウスにおいてはこれらの概日リズムは消失していた。さらに、Adn(-/-)マウスにおいて、これら遺伝子の転写調節因子であるPPAR α 遺伝子の発現量においても、Adn(-/-)マウスでは概日リズムの消失が確認された。以上の結果より、アディポネクチンは時間依存的なPPAR α 遺伝子の発現制御を介してVLDL分泌を調節していることを明らかにした。

4. 研究の反省・考察

(1) アディポネクチンによる時計遺伝子の発現制御機構

①本研究により、アディポネクチンシグナルによる肝臓の体内時計システム制御には、AMPK活性および核内受容体PPAR α の関与が示唆された。

②肝臓のアディポネクチンシグナルは、AdipoR1及びAdipoR2の受容体を介してシグナル伝達される。そこで、これら受容体をRNAi法により発現抑制した初代肝細胞を用いて肝臓の体内時計制御におけるアディポネクチン受容体の関与を検討したが、初代肝細胞におけるAdipoR1及びAdipoR2の発現量を減少させる遺伝子導入法が本年度内で確立できなかったことが今後の課題である。

(2) シフトワーカー及び長時間労働者におけるアディポネクチン濃度の変動

昨年新型コロナウイルスの蔓延により、感染指定病院である日本大学医学部附属板橋病院での検体採取が困難な状況下にあったため、関連病院でのサンプル収集も試みたが、スタッフの感染があり、臨床サンプルの収集が予定通りに進まなかった。新型コロナウイルスの蔓延が完全には収束していないが、シフトワーカーの血液サンプルを採取し、現在、アディポネクチン濃度の解析を行うところまで進んでいる。本研究より得られるシフトワーカーや長時間労働者と血中アディポネクチン濃度との関係に関する臨床的な知見は、体内時計分子マーカーとしての新たな可能性を示すとともに、「働き方」が問われている我が国において、社会問題の解決の一助となるものである。

(3) アディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析

Adn(-/-)マウスの肝臓における体内時計システムの変調が認められたが、脂肪や筋肉では観察されなかったことから、アディポネクチンによる時計遺伝子発現制御は肝臓特異的であることが示された。アディポネクチンによる脂質代謝制御には時計遺伝子発現制御を介した新たなメカニズムが存在することを強く示唆している。今後、糖代謝への時間依存的な制御についての研究も進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし