



准教授
安尾しのぶ

2003年 名古屋大学大学院生命農学研究科
博士課程修了 博士（農学）
2005年 日本学術振興会海外特別研究員
2007年 ゲーテ大学医学部 博士研究員
2009年 九州大学大学院農学研究院 准教授

体内時計の攪乱評価モデルの確立と攪乱予防栄養素の探索

1. 背景・目的

生体には内因性の生物時計である概日時計（体内時計）が存在し、Per, Cry, Clock, Bmal1などの時計遺伝子により、地球の昼夜リズムに適した代謝、細胞周期、神経活動、ホルモン分泌などの日内リズムが制御されている。しかし、24時間型社会といわれる現代社会では、交替性勤務や深夜に及ぶまでのスマホ・パソコン使用等により、生活が不規則になりがちである。不規則な明暗周期により概日時計の機能が乱れると、下流経路にも悪影響が生じ、肥満や糖尿病、心血管障害、気分障害、がんなどの疾病に繋がることが解明されてきた。一方で、概日時計は食事のタイミングや摂取栄養により調節可能であり、規則的な食事時刻制限により、不規則な明暗周期の影響を緩和できることが実験動物や人で示されている。しかし、個体を用いた試験では、栄養の消化・吸収・代謝過程や、ホルモンおよび自律神経の生体環境が複雑に絡み合うことから、細胞の概日時計そのものに対する直接的な効果の解析が難しい。

概日時計は視交叉上核に存在する中枢時計と末梢臓器に存在する末梢時計から構成され、それぞれ細胞レベルで概日リズムが刻まれるため、培養細胞を用いた概日時計の評価が可能である。末梢時計細胞の代表として、線維芽細胞株であるNIH3T3やRat-1などを用いて時計遺伝子の発現を生物発光レポーターで検出する系が確立され、栄養素やホルモンの単回刺激による概日リズム位相シフト効果や周期調節効果などが報告されている。この系は概日時計の単純モデルとして有用であるが、定常状態の培養環境は多くの現代人の特徴である生活リズムの乱れを反映していない。この概日リズム評価細胞に生活リズムを反映するような生体シグナルの入力を加えれば、乱れたリズムを培養下で再現できると考えられる。

本研究では、*Bmal1* のプロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを組み込んだ NIH3T3 細胞 (*Bmal1-Luc*) を用いて、規則的あるいは不規則的な生体シグナルの組み合わせが細胞の概日時計やその下流経路にある細胞周期の遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。明暗周期および食事リズムの生体シグナルとして、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン (Dex) とインスリンをそれぞれ用いた。

2. 方法

2.1. *Bmal1-Luc* 細胞の生物発光リズム

マウス *Bmal1* 遺伝子のプロモーター (約 1kbp) の下流でホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するベクターを NIH3T3 細胞に導入し、*Bmal1-Luc* 細胞とした。NIH3T3 細胞はインスリン受容体が少ないため、インスリン刺激を行う実験では、CAG プロモーターの制御下でヒトインスリン受容体 (hIR) を発現するベクターを *Bmal1-Luc* 細胞に導入して用いた。Dex で 2 時間処理して細胞間リズムを同期化後、D-ルシフェリン存在下でルミノメーター (AB-2550, Kronos, ATTO) 内にて培養し、発光リズムを連続測定した。

2.2. 実験スケジュール (図 1)

【実験 1】Dex 刺激に対する細胞リズムの同調性を明らかにするため、15 分の Dex 刺激を 24 時間周期で 6 回与えた。また同様の刺激を 18、22、24、26、28 時間周期で 3 回ずつ与えた。対照群は 0.001%EtOH (vehicle) を同様に投与した。

【実験 2】Dex 刺激を 16、24、16 時間間隔で与え、不規則な Dex 刺激に対する細胞リズムの反応を解析した。刺激終了後から 6 時間ごとに細胞を採取し、時計遺伝子および細胞周期遺伝子の発現変化を解析した。

【実験 3】Dex とインスリン刺激を単独あるいは同時に 24 時間周期で 3 回ずつ与え、細胞リズムの反応性や遺伝子の発現変化を解析した。

【実験 4】Dex 刺激を 16、24、16 時間間隔で与えると同時に、インスリン刺激を 24 時間周期で 3 回与えた。逆のパターンも行った。刺激終了後における時計遺伝子および細胞周期遺伝子の発現変化を解析した。

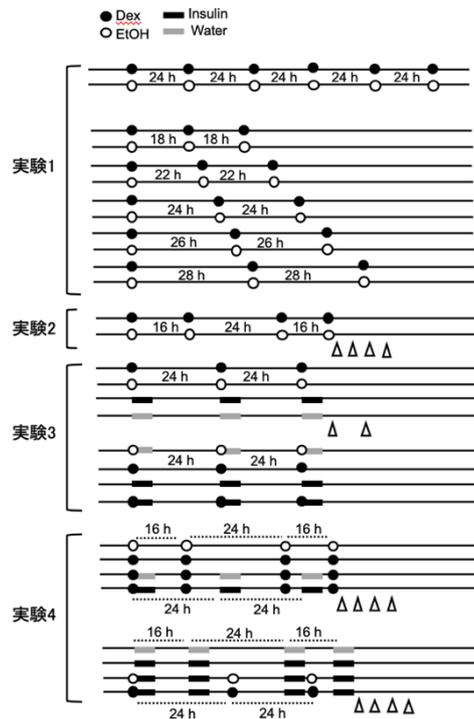


図 1 実験スケジュール

Dex 刺激 (15 分) とインスリン刺激 (3 時間) のスケジュールを示す。三角は細胞採取時刻を示す。

2.3. qPCR

細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、時計遺伝子 (Per1, Per2, Cry1, Cry2, Clock, Rev-erba) や概日時計の制御下にある細胞周期遺伝子 (c-Myc, p53) の発現を qPCR により解析した。ハウスキーピング遺伝子である HPRT1 の発現量により補正した。

3. 結果および考察

3.1. 周期的な Dex 刺激に対する細胞の概日リズムの同調 (実験 1)

Bmal1-Luc 発光リズムは 6 日間の Dex 刺激に同調したが、EtOH 投与細胞でも 4 日目から同様の同調が見られた。4 日目以降の同調は培養液の交換刺激によるものと考えられる [1]。そこで、Dex 刺激を 3 日間に短縮した結果、Dex の特異的なリズム調節効果を検出できた (図 2A)。18 から 28 時間の周期で Dex 刺激を 3 回ずつ与えたところ、22 および 24 時間周期への同調が見られ (図 2B)、24 時間周期では刺激終了後も同調が継続した (図 2C)。26 および 28 時間周期でも刺激周期に近い発光リズム周期が見られたが、これは単に内因性の周期を反映していると考えられる。

マウス生体の活動リズムの同調可能範囲は 22.8 から 26.5 時間周期である [2]。本実験結果から、細胞レベルでも概日時計の同調可能範囲は 24 時間に近い範囲に限定されることが示唆される。

3.2. 不規則な Dex 刺激が細胞の概日時計に及ぼす影響 (実験 2)

マウス生体では、同調不可能な明暗周期において概日時計の乱れが生じる。細胞において概日時計の乱れを再現するため、同調範囲以下の間隔を含む不規則な周期 (16、24、16 時間) で Dex 刺激を与えたところ、Bmal1-Luc の発光リズム周期が EtOH 投与に比べて 1 時間程度短くなり、振幅が増加した (図 3A, B)。刺激終了後の 24 時間における時計遺伝子や細胞周期遺伝子の発現は、不規則な Dex 刺激により著しく増加した (図 3C)。

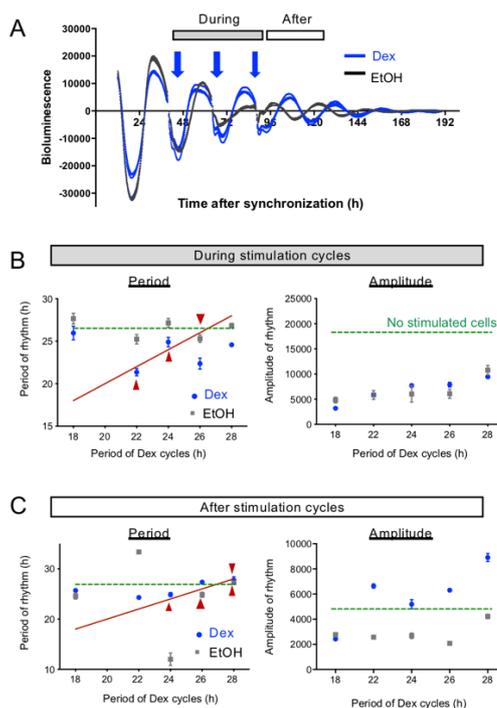


図 2 周期的な Dex 刺激が細胞の概日時計に及ぼす影響 (実験 1)
A: 24 時間周期で Dex 刺激を行った細胞の Bmal1-Luc 発光リズム。矢印は刺激時刻を示す。B, C: Dex 刺激周期と発光リズムの周期および振幅との関連。赤三角は刺激周期と発光リズム周期に有意差がないことを示す (one-sample t -test, $p > 0.05$)。緑点線は無刺激の細胞における周期と振幅を示す。

EtOH 群では多くの遺伝子発現が 6 時間後にピークを示したが、Dex 群では遺伝子ごとにピークの時間が異なっていた (図 3C)。以上の結果から、不規則な周期の Dex 刺激が遺伝子発現リズム間の脱同調と細胞周期遺伝子の発現増幅を誘導したと考えられる。

マウス生体においても、2 日おきに明暗周期を 8 時間前進させる 10 日間の処理により、肝臓の時計遺伝子や c-Myc と p53 の発現増加が見られる [3]。最近、U2OS 細胞でも同様に、2 日おきに Dex 刺激周期を前進させる 10 日間の処理で G1/S 移行に関わる遺伝子などの発現増加が報告された [4]。しかし、本研究の実験 1 で示したように、4 日間以上の処理は培養液交換の影響が重なるため、Dex 特異的な時差ぼけモデルとは言えない。本研究では、3 日間の不規則な Dex 刺激により、培養液交換の影響とは異なる特異的な概日時計と細胞周期の乱れを誘導できることを示した。

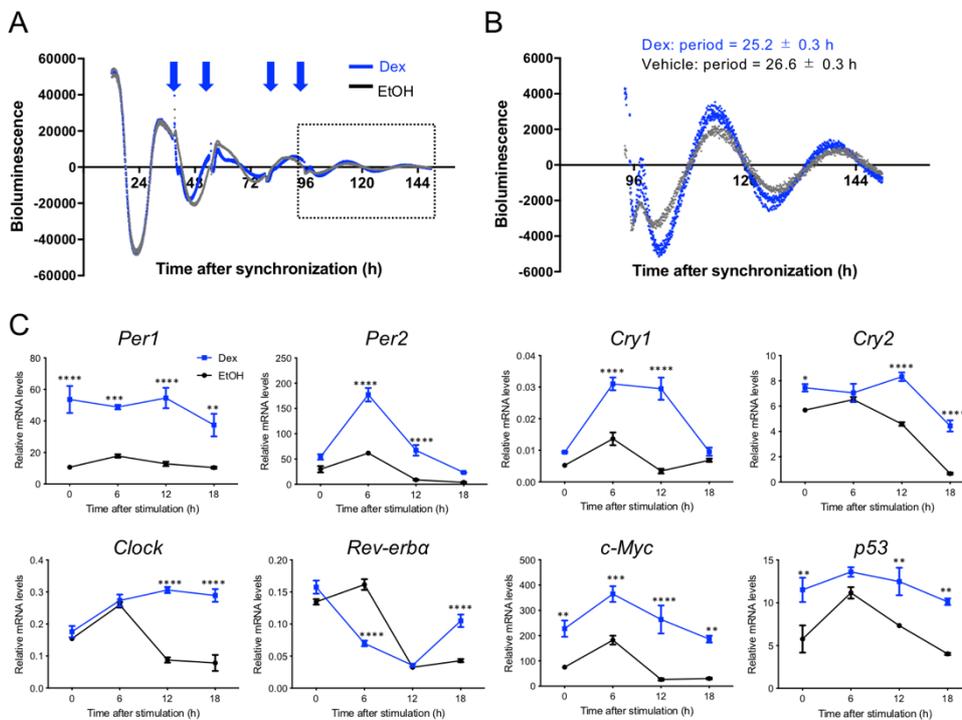


図 3 不規則な Dex 刺激が細胞の概日時計に及ぼす影響 (実験 2)

A, B: 不規則な周期 (16, 24, 16 h) で Dex 刺激を行った細胞の Bmal1-Luc 発光リズム。A の四角で囲った部分の拡大を B に示す。C: 最後の刺激以降における時計遺伝子や細胞周期遺伝子の発現変化 (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Bonferroni test)。

3.3. 規則的な Dex 刺激とインスリン刺激の相互作用 (実験 3)

明暗周期と食事リズムの相互作用を細胞レベルで解析するため、hIR を強制発現させた Bmal1-Luc 細胞を用いて、それぞれの生体シグナルである Dex とインスリンを単独あるいは同時に 24 時間周期で 3 回ずつ与えた。Dex 単独刺激とインスリン単独刺激はとも

に Bmal1-Luc 発光リズムを増幅させたが、インスリンのほうがより顕著な増幅を誘導した (図 4A, B)。Dex 単独刺激は Per1, Per2, c-Myc の発現にほとんど影響を及ぼさなかったが、インスリン単独刺激は Per1 の発現を増幅させ、c-Myc の発現にはほとんど影響しなかった (図 4C)。Dex とインスリンを同時投与したところ、単独投与に比べて、最も顕著な振幅の増加が見られた (図 4D, E)。以上の結果から、規則的な食事リズムは細胞周期を乱すことなく概日時計の振幅を高めること、またその効果は規則的な明暗周期と組み合わせるとより強くなることが示唆される。

NIH3T3 細胞集団で見られる概日リズムの振幅は、細胞集団のリズム同調の強さを表している [1]。概日時計の乱れの背後には、時計遺伝子の機能低下などの概日時計振動そのものの弱体化と、細胞リズムの位相が乱れて全体としてリズムが消失する脱同調とがある。本研究の結果から、食事リズムと明暗周期の協調は細胞集団のリズム同調を効果的に強めることが示唆される。

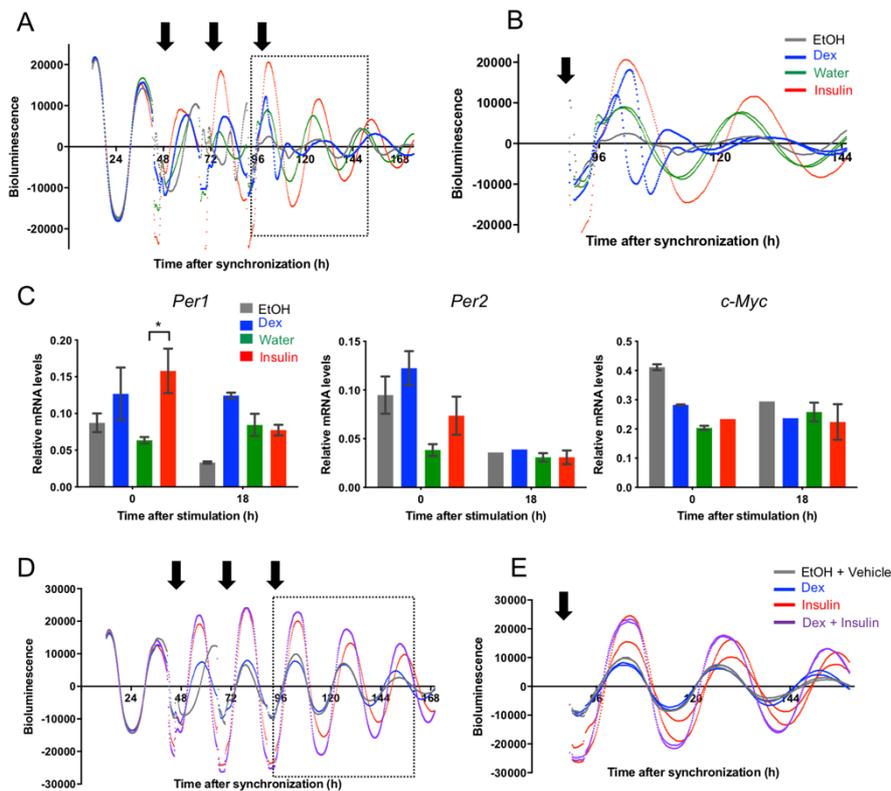


図 4 規則的な Dex とインスリンの単独あるいは同時刺激が細胞の概日時計に及ぼす影響 (実験 3)

A, B: 規則的に Dex とインスリンの単独刺激を行った細胞の Bmal1-Luc 発光リズム。A の四角で囲った部分の拡大を B に示す。矢印は刺激時刻を示す。C: 最後の刺激から 0 および 18 時間目における時計遺伝子や細胞周期遺伝子の発現変化。D, E: 規則的に Dex とインスリンの単独あるいは同時刺激を行った細胞の Bmal1-Luc 発光リズム。D の四角で囲った部分の拡大を E に示す。矢印は刺激時刻を示す。

3.4. 規則的あるいは不規則的な Dex 刺激とインスリン刺激の相互作用 (実験 4)

不規則な Dex 刺激が概日時計に及ぼす影響を栄養学的に改善できるかを検証するため、規則的なインスリン刺激を組み合わせた処理を行った。規則的なインスリン刺激は Bmal1-Luc 発光リズムの振幅を高め、位相を大きく後退させた (図 5A)。逆のパターンとして、不規則なインスリン刺激と規則的な Dex 刺激を組み合わせたところ、規則的な Dex 刺激は発光リズムの位相を大きく変化させた (図 5B)。以上より、二つの刺激因子が別のタイミングで与えられた場合には、規則的な刺激因子の位相調節効果が強く現れることが示唆される。

不規則な Dex 刺激により誘導された *Per1* の発現増加や *Rev-erba* の発現低下は、規則的なインスリン刺激により解除されたが、*Per2* や *c-Myc* の発現変化は解除されなかった (図 5C)。また、不規則な Dex 刺激により *Per1/Per2* と *Rev-erba* のピーク時刻にずれが生じたが、規則的なインスリン刺激により一致した (図 5C)。以上の結果から、規則的なインスリン刺激により、不規則な Dex 刺激の影響を部分的に緩和できることが示唆される。すなわち、不規則な明暗周期における規則的な食事の重要性が示唆される。

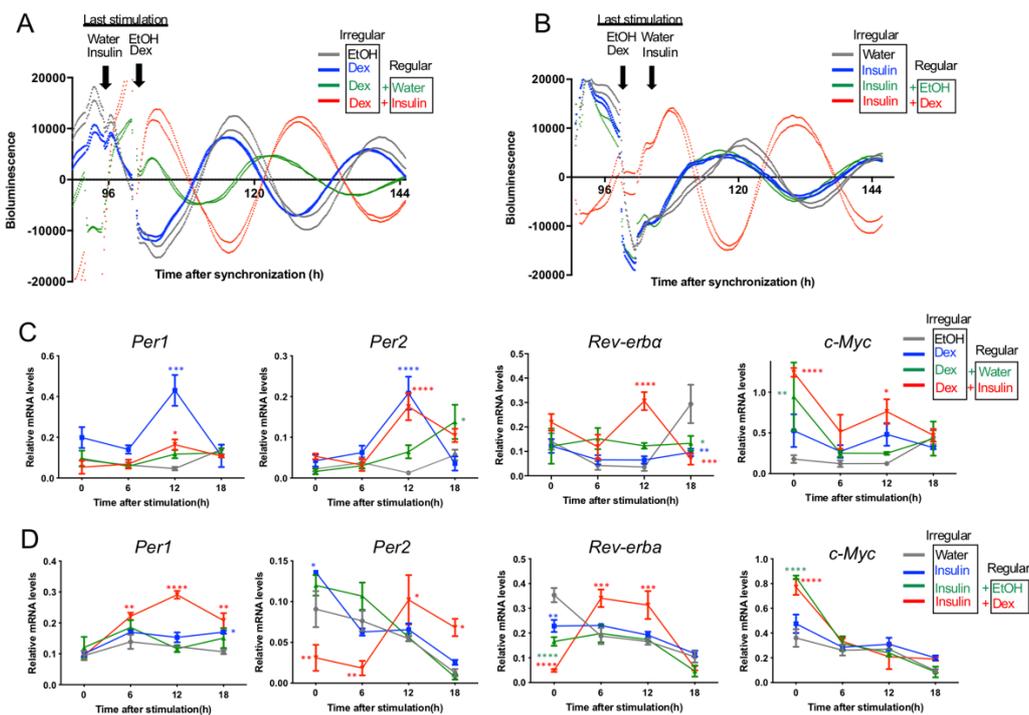


図 5 規則的・不規則的な Dex とインスリン刺激の組み合わせが細胞の概日時計に及ぼす影響 (実験 4)

A, C: 不規則的な Dex 刺激と規則的なインスリン刺激が Bmal1-Luc 発光リズム (A) および時計遺伝子や細胞周期遺伝子の発現 (C) に及ぼす影響。B, D: 不規則的なインスリン刺激と規則的な Dex 刺激が Bmal1-Luc 発光リズム (B) および時計遺伝子や細胞周期遺伝子の発現 (D) に及ぼす影響。(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Dunnett test)。

一方で、不規則なインスリン刺激は時計遺伝子や c-Myc 発現にほとんど影響を及ぼさなかった (図 5D)。規則的な Dex 刺激を加えることにより、時計遺伝子の発現リズムの増幅と c-Myc 発現の時刻依存的な増加が見られた (図 5D)。これらの影響は、規則的な Dex 刺激を単独で与えた影響とは異なっており (図 4C)、むしろ不規則な Dex 刺激を単独で与えた際の影響 (図 3C) と部分的に類似している。以上の結果から、不規則なインスリン刺激そのものは細胞の概日時計に影響しないが、Dex 刺激の時刻パターンをミスリードさせる可能性が示唆される。不規則な食事リズムのもとでは、規則正しい明暗周期であっても、細胞の概日時計が乱れやすいのかもしれない。

4. まとめ

本研究では、3 日間の不規則な Dex 処理により、細胞の概日時計や細胞周期の乱れを示す *in vitro* 時差ばけモデルを誘導した。本モデルを用いて、規則的な食事リズムが細胞の概日時計の乱れを部分的に改善できる可能性や、不規則な食事リズムが明暗周期の影響を歪曲させる可能性を示した。本モデルを活用すれば、様々なホルモンや代謝物などの環境因子が概日時計に及ぼす複合的な影響を細胞レベルで解明できるとともに、細胞の時差ばけを改善するための因子のスクリーニングが可能となる。

5. 謝辞

本研究の実施において、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。Bmal1-Luc 細胞を譲渡いただきました農研機構の大池秀明博士、hIR 発現ベクターを譲渡いただきました徳島大学の湯浅智之准教授に感謝いたします。

6. 引用文献

1. Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol*, 2004;14:2289-95.
2. Daan S, Pittendrigh CS. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J Comp Physiol*, 1976; 106:253-66.
3. Iwamoto A, Kawai M, Furuse M, Yasuo S. Effects of chronic jet lag on the central and peripheral circadian clocks in CBA/N mice. *Chronobiol Int*, 2014;31:189-98.
4. Lee Y, Lahens NF, Zhang S, Bedont J, Field JM, Sehgal A. G1/S cell cycle regulators mediate effects of circadian dysregulation on tumor growth and provide targets for timed anticancer treatment. *PLoS Biol* 2019;17:e3000228.