

2005年6月25日

人間科学研究科委員長 殿

栗山恒二氏 博士学位申請論文審査報告書

栗山恒二氏の学位申請論文を下記の審査委員会は、人間科学研究科の委嘱を受け審査をしてきましたが、2005年6月25日に審査をしましたので、ここにその結果をご報告します。

記

1. 申請者氏名 栗山恒二

2. 論文題名 マウス体内時計に対するグルコース代謝の影響

3. 本論文の主旨、概要、評価 別紙記載

4. 栗山恒二氏 博士学位申請論文審査委員会

主審査委員 早稲田大学教授 医学博士(順天堂大学) 山内 兄人

審査委員 早稲田大学教授 薬学博士(九州大) 柴田 重信

審査委員 早稲田大学教授 理学博士(東京大) 木村 一郎

審査委員 早稲田大学教授 医学博士(九州大) 小室 輝昌

以上

1. 本論文の主旨

概日リズムの中枢は、哺乳類においては視床下部の視交差上核 (SCN) に存在するが、大脳皮質など他の脳部位、肝臓など末梢組織にも *Per* などの時計遺伝子は発現している。SCN の時計は光により同調されるが、末梢組織の時計は周期性の摂食により同調されることが知られている。しかしながら後者の同調に摂食行動を含むいずれの因子が重要であるかは不明なままである。細胞を用いた研究では、エネルギー代謝に伴う NADP/NADPH 比の変化が時計遺伝子の転写制御に関わるという報告がある。そこで、第 1 章では摂食後の血中のグルコース上昇が給餌性同調の重要なファクターであるという仮説を立て、グルコース摂取後の、マウス肝臓の *Per1* および *Per2* の遺伝子発現を調べた。グルコースの経口投与は絶食マウスの肝臓における *Per2* 遺伝子発現を用量依存的に増大させたが、この作用は摂餌群より弱かった。一方、難消化性糖類であるマンノースや、セルロース (CMC) の投与では、*Per1* の上昇は引き起こされたが、*Per2* に変化は見られなかった。以上の結果、摂食による同調には *Per2* 遺伝子の一過性の発現増大が重要であることが示唆された。また、*Per2* 遺伝子の発現リズムを指標として、餌投与をグルコースで置き換えた場合、弱いながらも肝臓の時計遺伝子発現リズムを同調させることが可能であった。次に摂食に伴う体温上昇と類似した反応がグルコース摂取でも起こるか否かについて調べた。摂食に比較して作用は弱いものの、グルコースによるマウスの深部体温上昇が見られた。第 2 章ではグルコースの代謝異常が起こっている糖尿病に着目して実験を行なった。まず、ストレプトゾトシン投与によるインスリン依存型糖尿病状態では、マウス肝臓の *Per2* 遺伝子と遺伝子産物のリズム変動が減弱する事を見出した。インスリン投与により、遺伝子発現リズムの回復が認められたが、その効果は摂食行動が不活発な時刻より、活発な時刻の投与で強く現れた。このように本論文は、摂食による同調にグルコース代謝が重要であり、これの破綻である糖尿病状態では肝臓の体内時計リズムが乱れること、さらにインスリンによる治療効果に時刻依存性が見られることを明らかにした。

2. 本論文の概要

地球上の生物が普遍的に獲得した性質の一つに、概日リズムがある。これは、地球環境の 1 日周期のリズムに対応して作り出された、およそ 1 日 (約 24 時間) 周期の内因性リズムで、睡眠、代謝、内分泌、行動リズムなど様々な生体現象に関与している事が知られている。概日リズムの中枢は、哺乳類においては視床下部の視交差上核 (SCN) に存在するが、肝臓など末梢組織にも時計遺伝子は発現しているため、SCN を中枢時計と呼び、末梢臓器に発現している体内時計を末梢時計と呼ぶ。末梢時計の強力な同調因子として摂食が知られており、普段マウスの活動が活発ではない明期の一定時間にのみ餌を提示する制限給餌を行うと、マウスはしだいに餌の提示時刻を認識し、給餌前から活発な行動をとる。活動リ

ズムの位相の変化に合わせて、末梢組織の時計遺伝子群の発現も変化するが、その作用機構の詳細は不明なままである。本研究では、末梢組織における時計遺伝子発現制御機構について以下のような研究を行なった。

第 1 章では、摂食による末梢時計の同調要因として、餌の主成分の炭水化物の分解産物であるグルコースに注目し、肝臓の体内時計遺伝子発現におよぼすグルコースの効果について調べた。24 時間の絶食を施したマウスを用いた研究で、グルコース投与は肝臓の *Per1* も *Per2* もいずれの遺伝子も、投与 1 時間および 2 時間後において用量依存的に発現上昇をもたらした。しかしながら、投与 4 時間後にはこのような作用は見られなかった。グルコースの対照化合物として、難消化性物質であるマンノースとカルボキシメチルセルロースを投与したが、いずれの化合物も *Per1* の発現上昇は引き起こしたが、*Per2* には影響しなかった。したがって、*Per2* 遺伝子発現が末梢時計の同調に重要であることが示唆された。さらにグルコースによる *Per2* 遺伝子発現効果の強弱を比較するために、餌のみを 1 時間与えるグループを用意したが、この群ではグルコース投与群と比較して、特に *Per2* 発現誘導において、より強い効果が認められた。グルコースによる *Per2* 遺伝子発現誘導機構については不明であるが、最近の細胞レベルでの研究によると、NADPH/NADP 比の変化により BMAL1:CLOCK のヘテロダイマー形成が促進され、*Per* 遺伝子の転写が促進されるとの報告がある。このことを今回の研究に当てはめると、絶食下のマウス肝臓でも、グルコース投与により上記と同様の機構が働いて *Per2* が転写促進された可能性が示唆された。

マウスに制限給餌を昼間行くと、末梢時計遺伝子の発現位相ピークが夜間から昼間に移動し、制限給餌を中止するとピーク位相は徐々に夜間に戻る。グルコースが末梢時計遺伝子の同調因子であるならば、餌の代わりにグルコースを連日投与することにより、時計遺伝子発現位相ピークを昼に維持出来る可能性が考えられた。実際、制限給餌により形成されたマウス肝臓の *Per2* 遺伝子発現リズムはグルコースの 3 日間の投与により維持することができた。このことより、給餌性の *Per* 遺伝子発現リズムの同調を引き起こす重要な化学的信号の 1 つにグルコース代謝が関わっている可能性が示唆された。

第 2 章では、末梢時計の同調に関わるグルコース代謝の異常性に着目して、ストレプトゾトシン (STZ) 投与により 1 型糖尿病モデルマウスを作成し、このマウス肝臓の体内時計遺伝子発現を調べた。この場合、前章の研究から *Per2* 遺伝子発現がグルコース代謝の影響を受けることが明らかとなっているので、*Per2* と *Per2* の遺伝子産物である PER2 の発現リズムに対する作用について調べた。STZ 処置によりマウス肝臓における *Per2* と PER2 発現リズムは減弱し、発現ピークが夜間の真中から夜間の初めに、約 6 時間位相前進することがわかった。一方、SCN における PER2 発現は影響を受けなかった。このことから、STZ 処置は中枢時計である SCN の時計発振には影響をおよぼさず、末梢時計の発振の振幅を減弱さ

せることが明らかとなった。次に一定時刻のインスリンの連日投与が、*Per2* と *PER2* の発現異常を回復させるか否かについて調べた。インスリン分泌は摂食と密接に絡んでいることが知られているので、インスリン投与は摂食行動が盛んな時刻か、もしくは逆に摂食行動が低い時刻に投与した。暗期直前の摂食行動が盛んになる直前のインスリン投与により、糖尿病の肝臓の *Per2* と *PER2* 発現リズムが改善された。一方、明期直前の摂食行動が終了する時刻のインスリン投与では改善されず、インスリンの投与効果に時刻依存性が見出された。また、血中の高グルコース状態も暗期直前に投与した群でより改善効果が見られた。以上、インスリンの連日投与が糖尿病の症状を減じただけでなく、末梢の体内時計機能を回復し、かつその効果に投与時刻の差が見られたという結果が得られた。

3 . 本論文の評価

本研究は、末梢時計の同調や発振にグルコース代謝がどのように関わっているかを明らかにする目的で行なわれた。末梢時計では餌が強力な同調要因であることは知られていたが、本研究により初めて、餌の代謝産物であるグルコースが同調因子の 1 つである可能性が示唆された。したがって、末梢時計の同調メカニズムの解明が進むものと期待される。一方、グルコース代謝の異常である糖尿病に着目し、 型糖尿病状態では特に末梢時計の発振振幅や位相に異常が起こることを世界に先駆けて明らかにしており、注目に値する。また、インスリンによる薬物治療において、その投与時刻の差が、治療効果に影響を及ぼすことを明らかにした。このような時間薬理学的な研究成果は糖尿病患者に対するインスリン治療時に臨床応用できる可能性を強く示唆するものである。

本論文は先に述べてきたように、生命科学分野の研究発展に貢献することから、博士（人間科学）の学位を授与する事に十分値すると判断される。

2005年6月25日

主審査委員 早稲田大学教授 医学博士（順天堂大学）山内 兄人 印

審査委員 早稲田大学教授 薬学博士（九州大） 柴田 重信

審査委員 早稲田大学教授 理学博士（東京大） 木村 一郎

審査委員 早稲田大学教授 医学博士（九州大） 小室 輝昌