

肝臓における時計遺伝子の異常は

肝臓と筋肉におけるエネルギー代謝を障害しうる

(Liver-specific dysregulation of clock-controlled output  
signal impairs energy metabolism in liver and muscle.)

松村 卓郎

山口大学大学院 医学系研究科

応用医工学系専攻 病態制御内科学講座

令和 2 年 12 月

# 目次

1.要旨	3
2.背景	4
3.対象と方法	6
4.結果	9
5.考察	15
6.結語	17
7.謝辞	17
8.参考文献	17

## 1. 要旨

**目的と序論:** 体内時計の本態である時計遺伝子の発現異常が糖尿病を始めとした代謝性疾患の誘因になることが明らかになっているが、詳細なメカニズムは分かっていない。時計遺伝子であるアルブミン D 部位結合タンパク質 (DBP) は D-box を介して多くの遺伝子の転写を活性化し、E4 プロモーター結合タンパク質 4 (E4BP4) は D-box への競合的結合によって DBP 依存性の転写活性を抑制し、互いに拮抗的に作用する。概日時計の中核である視交叉上核とは別に、肝臓、腎臓、膵臓などの末梢組織にも概日時計が存在する。肝臓は、摂食状態と絶食状態の移行において代謝恒常性を司る主要な器官の一つである。肝臓の時計遺伝子は、摂食-絶食サイクルに連動して何らかの役割を担っている可能性が高いことから、我々は、近年重点的に研究を続けている DBP, E4BP4 にターゲットを絞り、肝臓と筋肉の代謝における役割を検討した。

**方法:** 肝臓における DBP ならびに E4BP4 の役割を検討するためにマウスアルブミン遺伝子プロモーター (MAP) 下で肝細胞特異的に E4BP4 を過剰発現するマウスを作製し、糖および脂質代謝について解析した。またアデノウイルスベクター (Ad) を用いた系でも肝細胞特異的 E4BP4 過剰発現マウスを作製し、糖代謝について解析した。

**結果:** MAP-E4BP4 マウスでは、インスリン負荷試験において著明なインスリン抵抗性の増大が認められた。またピルビン酸負荷試験における血糖値の上昇、糖新生系酵素である PCK1 の発現レベルの増加が認められることから、MAP-E4BP4 マウスは少なくとも肝インスリン抵抗性の増大を呈することがわかった。また Ad-E4BP4 マウスでも、同様にインスリン抵抗性の増大が認められた。興味深いことに MAP-E4BP4 マウスでは、インスリン投与後の腓腹筋におけるインスリン感受性の低下が認められ、非活動時間帯における呼吸商の増加と血中遊離脂肪酸の変動の減少も認められた。つまり肝臓における DBP シグナルにおける低下によって、非活動時間におけるエネルギー源としての脂質の利用が低下し、同時に筋肉におけるインスリン抵抗性が増大していることが示唆された。

**結論:** 肝臓の時計遺伝子 DBP, E4BP4 は、肝だけでなく、骨格筋におけるインスリン感受性も調節していると考えられた。この脂肪酸を介した肝臓と筋肉の臓器連関が示唆され、そのさらなる解明は、新たな代謝疾患の予防や治療法の開発につながっていく可能性がある。

## 2. 背景

概日時計はさまざまな組織の活動、生理機能、代謝を調整する重要な内因性の統合システムの1つである[1,2]. 概日時計の中核である視交叉上核とは別に、肝臓、腎臓、膵臓などの末梢組織にも概日時計が存在する。末梢組織の時計遺伝子は、視交叉上核への光刺激の入力により同期されるが、この調整機構とは別に、摂食などによって調整を受ける臓器毎に独立した時計遺伝子の調整機構が存在する。肝臓では、非摂食時間においてグリコーゲンの分解と糖新生を通じてグルコースを各臓器へ供給する。一方、肝臓での脂肪酸酸化は、非摂食時間に増加し、摂食時間では低下する。摂食時間と非摂食時間の肝臓の代謝のサイクルは、少なくとも部分的には時計遺伝子によって制御されていると考えられる(図1).

いくつかの時計遺伝子の遺伝子改変マウスは代謝機能障害を呈するが、これらの表現系のいくつかは、肝の時計遺伝子が破綻した際に引き起こされる[3]. 肝臓特異的 *Bmal1* 欠損マウスは、明期/非活動期に限定された低血糖を示す[4]. 一方、同マウスは、高脂肪食負荷下では、軽度のインスリン抵抗性を示すが[5], 摂食時間を制限すると体重増加や代謝異常をきたしにくくなる[6]. これらの相反する表現系は、コア時計遺伝子である *Bmal1* の肝での機能破綻が、必ずしもインスリン抵抗性を増大させることを示しているわけではない.

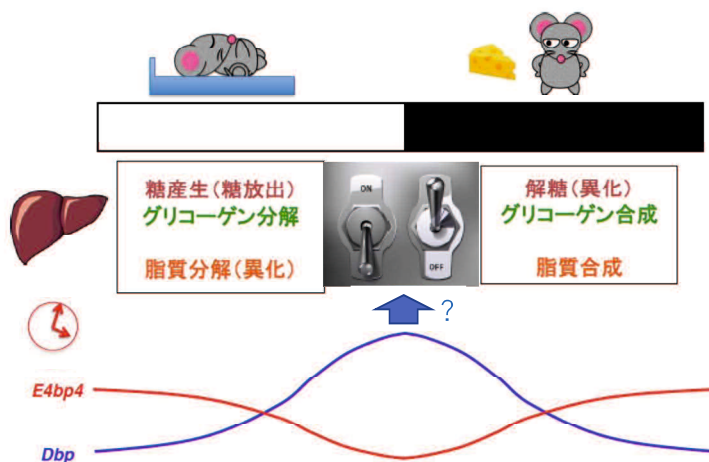


図1. 肝代謝の概日リズム  
肝臓の代謝は摂食時間（マウスでは暗期）と非摂食時間（マウスでは明期）で大きな違いがあるが、この移行に肝臓の時計遺伝子が関与している可能性がある

概日リズムは複数の時計遺伝子により調整されている。外界刺激によりコア時計遺伝子である BMAL1, CLOCK がヘテロ二量体を形成し、E-BOX へ結合すると、PER/CRY 複合体の発現が増幅され、*Bmal1*,

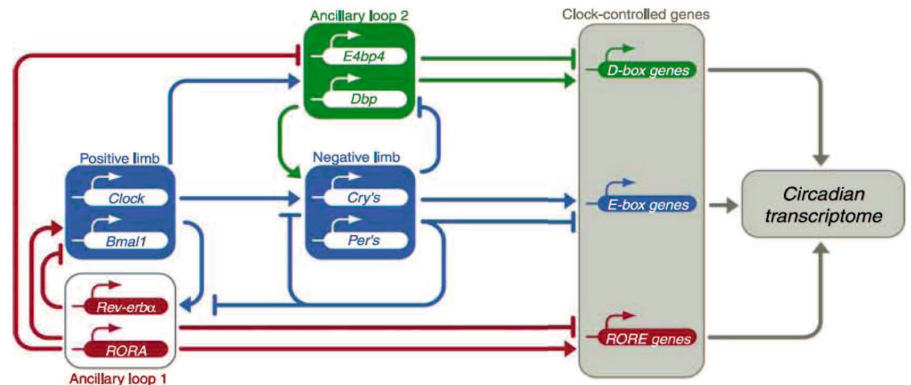


図2. 時計遺伝子の転写制御機構

*Clock* の転写を抑制する。このネガティブフィードバックが約 24 時間で起こることで概日リズムが形成される。この *Bmal1*, *Clock* を中心としたコアループとは別に、出力系の時計遺伝子として *Dbp*, *E4bp4* が存在する(図 2)。DBP は D-box を介して多くの遺伝子の転写を活性化し、E4BP4 は D-box への競合的結合によって DBP を起点とした転写活性化を抑制する[7]。最近、DBP と E4BP4 によって認識される 1,490 のゲノム領域が特定され、D-box を介した転写調節は概日時計の振動の入力と出力の両方で、重要な役割を果たすと考えられている[8]。我々は、胼 β 細胞に特異的に E4BP4 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、解析を行っているが、このマウスは、インスリン分泌の著明な低下を伴う耐糖能異常を示す。この結果は、E4BP4 の過剰発現による DBP シグナルの抑制が劇的な表現系の変化をもたらすことを示している[9]。本研究では、肝特異的に E4BP4 を過剰発現するマウスを解析することによって 肝臓での DBP, E4BP4 による代謝調節機構を検討した(図 3)。

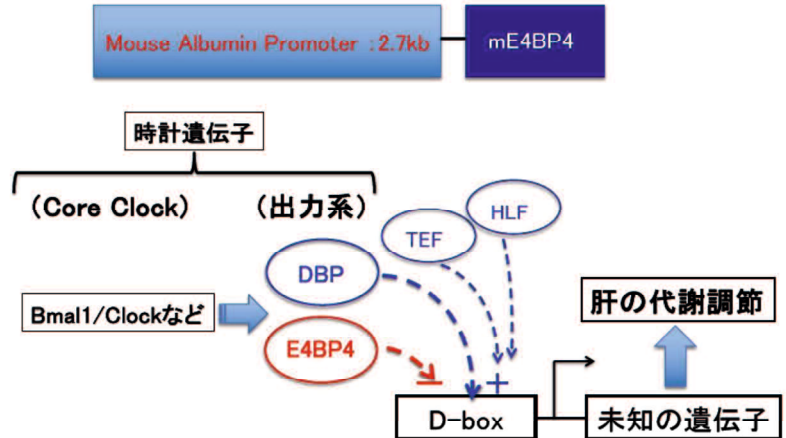


図3. 肝細胞特異的E4BP4過剰発現マウス  
 アルブミンプロモーター下でE4BP4を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、肝細胞特異的にD-boxを持つ遺伝子の発現が抑制されることが予想される

### 3. 対象と方法

#### 1. マウス

全てのマウスは各 12 時間の明/暗サイクルの下で、温度制御(22°C±1°C)された部屋で飼育した。点灯時刻を Zeitgeber time (ZT)0, 消灯時刻を ZT12 とした。サザンブロットを除くすべての実験は、年齢を一致させたオスの同腹仔を使用して実施した。マウスアルブミン遺伝子プロモーター(MAP)トランスジェニックベクター-pGemALB / SVpa [10]は、K. Kanki 博士と G. Shiota 博士から供与を受けた。MAP-E4BP4 トランスジェニックコンストラクトは、MAP の下流にマウス E4BP4(mE4BP4)-cDNA(1702bp; ATCC)を挿入することによって作製した。5.5kb の MAP-mE4BP4-SV40 イントロン polyA フラグメントは、プラスミドコンストラクトを適切な制限酵素で消化することによりベクターから単離した。精製された導入遺伝子 DNA は、UNITECH Company によって C57BL / 6 マウスの前核にマイクロインジェクションされた。得られた子孫は、PCR 分析およびサザンハイブリダイゼーションによって導入遺伝子の伝達とそのコピー数を確認した。3 つの異なるマウス系統を維持し、同腹仔を実験に使用した。全ての実験のプロトコールは山口大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けている。

#### 2.2. アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは、AdEasy Adeno Viral System(Agilent Technologies)を使用して作製した。E4BP4, DBP および LacZ を組み込んだアデノウイルスベクターを作製し、10<sup>8</sup> PFU/mouse を尾静脈より投与した。注射の 7 日後に解析を行った。

#### 2.3. RNA の抽出および定量的リアルタイム PCR

肝臓からのトータル RNA 抽出は RNeasyMini Kit(Qiagen)を使用して行った。cDNA は Superscript II 逆転写酵素(Life Technologies)を用いて合成し、Power SYBR Green PCR Master Mix(Life Technologies)を使用し、リアルタイム PCR を行った。(Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System (Life Technologies))。cDNA の定量は、 $\Delta$ Ct 法を使用して計算し、ハウスキーピング遺伝子 Gapdh の値で補正した。プライマーの配列は以下の通りである

mE4bp4 forward: 5' -GGAGCAGAACCACGATAACC-3'

mE4bp4 reverse: 5' -TTCCCCAGTCTTCTTTTCAGG-3'

mGapdh forward: 5' -AGTATGACTCCACTCACGGCAA-3'

mGapdh reverse: 5' -TCTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'

#### 2.4. インスリン負荷試験, ピルビン酸負荷試験

インスリン負荷試験は、自由摂食下の 13 週齢の雄のマウスを用いて、ZT1 にインスリン (0.75 単位/ kg) を腹腔内注射し、血糖値を測定した。ピルビン酸負荷試験は、16 時間絶食させた 12 週齢の雄マウスを用いて、ZT1 で実施した。生理食塩水に溶解したピルビン酸 (2g / kg 体重) を腹腔内注射し血糖を測定した。尾の血液は 0、30、60、90、および 120 分に採取し、血糖値は ANTSENCE II (Horiba Industry) を使用して測定した。

#### 2.5. トリグリセリドの測定

分離した 100~300 mg の肝臓や腓腹筋を 350  $\mu$ L のエタノール含有 KOH で、55°C で一晩、融解した。組織は、完全に融解するまでインキュベーション中に繰り返しボルテックスを行った。遠心分離後、上清を新しいマイクロチューブに移し、1M  $MgCl_2$  と混合した。サンプルを氷上で 10 分間インキュベートした後、1,200g で 5 分間遠心分離した。上清のトリグリセリド濃度をトリグリセリド酵素アッセイキット (和光) で測定した。

#### 2.6. インスリン投与下での糖取り込み量の測定

自由摂食下の 13 週齢の雄マウスに、ZT1 でインスリン (0.75 U/ kg) と 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) (200  $\mu$  mol/ kg) を含む生理食塩水を同時に腹腔内注射した。注射後 90 分後に肝臓と腓腹筋を採取した。2-DG レベルは、2-DG 代謝速度測定キットを用いて測定した (CosmoBio)。

#### 2.7. ウェスタンブロット

肝細胞のタンパク質は Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) を使用して抽出した。肝臓および腓腹筋 (GM) の総タンパク質は、GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用い、プロトコールに従ってホモジナイズした後、Cell Lysis Buffer (CST) を使用して抽出した。タンパク質濃度は、BCA タンパク質アッセイキットを使用して測定した。2~20  $\mu$ g の核タンパク質サンプルまたは 15  $\mu$ g の全細胞タンパク質サンプルを SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare) に転写し、メンブレンを一次抗体とともにインキュベートした。抗 E4BP4 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 DBP (MBL)、抗 LaminB (Santa Cruz Biotechnology)、抗 PCN (Proteintech)、抗 Akt (CST)、抗 Phospho-AKT (Ser473) (CST)、抗 Pck1 (Santa Cruz Biotechnology)、抗  $\alpha$ -チューブリン (CST) を 1 次抗体として使用した。

]

## 2.8. RNA シーケンシングによる全トランスクリプトーム解析

自由摂食下で 8 週齢の雄のマウスのトランスクリプトームを解析した。RNeasy Mini キット (Qiagen) を使用して ZT4 および 8 で単離した肝臓、ZT0 および 12 で単離した腓腹筋から RNA を抽出し、オリゴ dT ビーズ (New England Biolabs) で mRNA を精製した。イルミナシーケンシング用の相補 DNA (cDNA) ライブラリーは、NEBNext Ultra II RNA ライブラリー調製キット (New England Biolabs) および NEBNextplex オリゴを使用して生成した。RNA を NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer で 94°C, 15 分間インキュベートし、NEBNext Random Primers で断片化し、NEBNext Strand Synthesis EnzymeMix で逆転写した。ライゲーション後、ライブラリーフラグメントを濃縮し、PCR によってインデックス配列を挿入した。確認されたライブラリーは、75bp ペアエンドサイクルシーケンスキット (Illumina) を備えた Illumina Next-seqDNA シーケンサーでのクラスタリングおよびシーケンスに対して等しい分子量で混合した。RNA-seq データは NCBI GEO (アクセッション番号 GSE150835) データベースに登録した。

## 2.9 間接熱量測定

間接熱量測定法 (MK-5000RQ、室町機械) を用いて、O<sub>2</sub> 消費量と CO<sub>2</sub> 生成量を測定した [12]。

## 2.10. 血漿遊離脂肪酸測定

自由摂食下で、12 週齢の雄のマウスの尾の血液を 4 時間ごとに収集し、1,200g で 20 分間遠心して血清を分離した。血漿トリグリセリドレベルは、トリグリセリドアッセイキット (FUJIFILM Wako) によって測定した。血漿遊離脂肪酸レベルは、遊離脂肪酸アッセイキット (FUJIFILM Wako) によって測定した。

## 2.11. 電子顕微鏡

8~9 週齢の自由摂食下の雄マウスを使用した。ZT6 および ZT18 において、0.2%ピクリン酸を含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した 2%グルタルアルデヒド (vol./vol.) および 4%パラホルムアルデヒド (vol./vol.) で心臓内灌流を行った。肝臓切片 (厚さ 1 mm) を 1 % OsO<sub>4</sub> (wt / vol.) で後固定した。

## 2.12. 統計分析

有意差検定は t 検定を用いて行った。データは平均 ± SEM として提示され、P < 0.05 となった場合に有意差ありと判断した。



## 4. 結果

### 4.1. 肝臓における E4BP4 の過剰発現は、肝糖新生を亢進させる

肝臓における DBP の役割を調べるために、肝細胞特異性の高いマウスアルブミン遺伝子プロモーター (MAP) 下に E4BP4 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。

MAP-E4BP4 トランスジェニックマウスとしての 3 系統 (TG-C, TG-B, TG-A) を樹立した。サザンプロットによってそれぞれ 100,

10, 3 のトランスジーンのコピー数を持つことを確認した (図 4. A)。ZT12 で分

離した肝組織の RT-PCR により、*E4bp4* mRNA レベルが野生型 (WT) の同腹仔と比較して TG-C, B, A でそれぞれ 4.1, 2.9, 2.5 倍増加していた (図 4. B)。

E4BP4 の核タンパク質レベルも mRNA 発現レベルに相関して増加していた (図 4. C)。ZT1 において、腹腔内インスリン負荷試験 (IP-ITT) を施行したところ、TG-C, TG-B で、著明なインスリン抵抗性の増大が認められた。インスリン抵抗性の程度は、*E4bp4* 遺伝子のコ

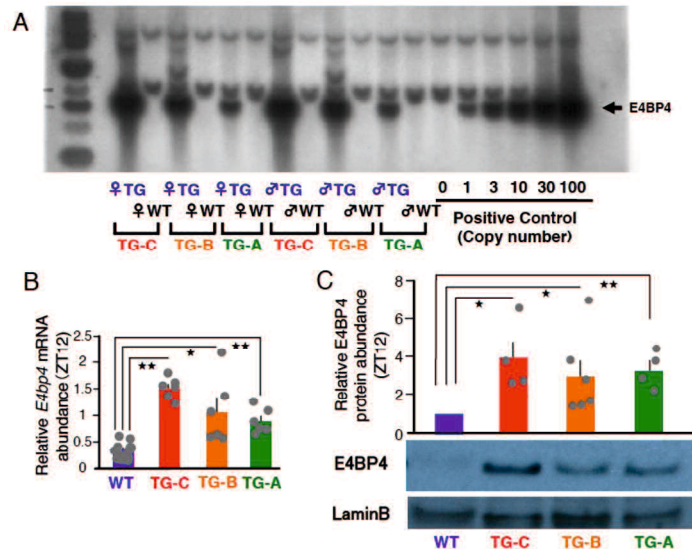


図4. 肝臓におけるトランスジェニックマウスのE4BP4の発現。

(A) WTマウスおよびMAP-E4BP4トランスジェニックマウス (TG-C, TG-B, TG-A) のサザンプロット解析。

(B) ZT12で単離した肝臓の*E4bp4* mRNA発現。ZT0でのWTの値を1として相対量で表した。WT : n = 16; TG-C : n = 6; TG-B : n = 6; TG-A : n = 6。

★p < 0.05, ★★p < 0.01。

(C) ZT12で単離した肝臓のE4BP4タンパクの発現。

WT : n = 16, TG-C, TG-B, TG-Aはそれぞれ, n = 4-6。★p < 0.05, ★★p < 0.01。

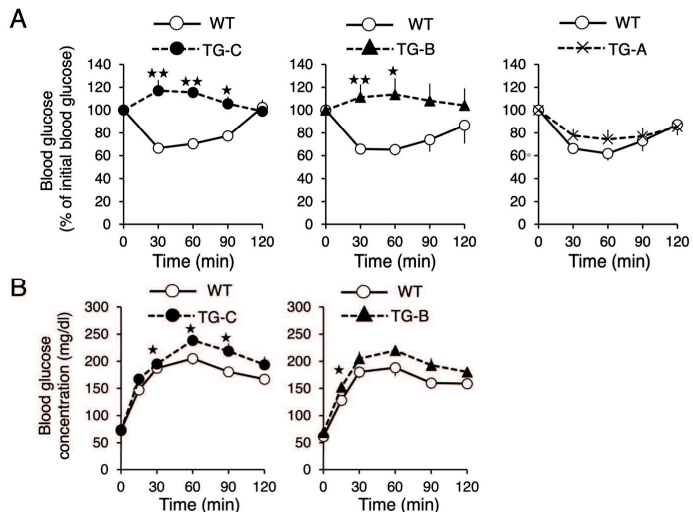


図5. 肝臓でのE4BP4の過剰発現によるインスリン感受性の変化

(A) ZT1でのIP-ITT。WTマウスおよびMAP-E4BP4トランスジェニックマウスに0.75U / kgのインスリンを腹腔内投与した。示された時間に尾静脈から血液サンプルを採取した。TG-CのWT同腹仔 (n = 3), TG-C (n = 4), TG-BのWT同腹仔 (n = 6), TG-B (n = 6), TG-AのWT同腹仔 (n = 11), TG-A (n = 11), ★p < 0.05, ★★p < 0.01。

(B) ZT1でのピルビン負荷試験。ZT9から15時間の絶食後に1g / kgのピルビン酸ナトリウムの腹腔内投与を施行した。示された時間に尾静脈から血液サンプルを採取し、血糖値を測定した (n = 8-9)。★p < 0.05。

ピー数と概ね相関していた(図 5. A). ピルビン酸負荷試験でも TG-C と TG-B で有意な高血糖が認められ, TG-C と TG-B では少なからず肝のインスリン抵抗性が增大していることがわかった(図 5. B). さらにアデノウイルス(Ad)ベクターを用いて, 肝臓で E4BP4, LacZ を一時的に過剰発現するマウス(Ad-E4BP4, Ad-LacZ)を作製した. ウエスタンブロッティングによって, Ad-E4BP4 マウスから単離された肝臓において核での E4BP4 タンパク発現が増加していることを確認した(data not shown). IP-ITT では, Ad-E4BP4 マウスは, Ad-LacZ マウス(コントロール)よりも高血糖を呈した. ピルビン酸負荷試験でも, Ad-LacZ と比較して Ad-E4BP4 で高血糖が認められた(図 6. A). 次に Ad ベクターを用いて, TG-C および TG-B の肝臓に DBP を過剰発現させた. ウエスタンブロッティングにより, Ad ベクター注射の 1 週間後に Ad-DBP マウスから単離した肝臓の核において DBP タンパクの発現が増加していることを確認した(data not shown). Ad-DBP を形質導入した TG-C および TG-B マウスは, Ad-LacZ を形質導入した TG-C および TG-B と比較して有意に低い血糖値を示した. このことから DBP の肝での過剰発現により MAP-E4BP4 マウスのインスリン抵抗性は, 部分的に改善されたことが示唆された(図 6. B).

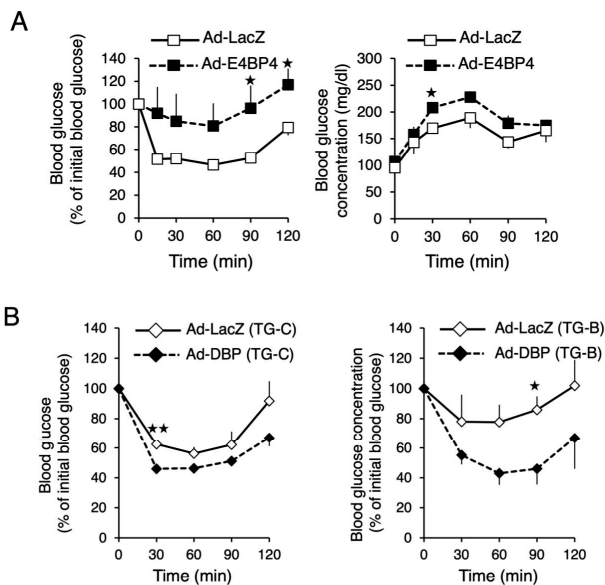


図6. アデノウイルス (Ad) ベクターによってE4BP4を肝で過剰発現させたときのインスリン感受性の変化

(A) Adベクターを用いて, 肝にE4BP4またはLacZ (コントロール) を過剰発現させたマウスのIP-ITT. マウスの尾静脈からE4BP4またはLacZを発現するAdベクターを投与した. IP-ITTはAd投与7日後に施行した(n = 各6)

★p < 0.05.

(B) Adベクターを用いてDBPまたはLacZを肝に過剰発現させたTG-C(左)およびTG-B (右) マウスのIP-ITT. マウスの尾静脈からDBPまたはLacZを発現するAdベクターを投与した. IP-ITTはAd投与7日後に施行した(n = 3)

★p < 0.05, ★★p < 0.01.

#### 4.2. 肝臓における E4BP4 の過剰発現は、肝臓と筋肉のインスリン抵抗性を増大させた

肝臓および筋肉におけるインスリンによるグルコース取り込み促進を解析するために、インスリンを含む 2-デオキシ-D-グルコース(2-DG) 溶液を WT および TG-C に腹腔内注射した。インスリン投与 90 分後の 2-DG 含有量は、WT と TG-C の肝臓で有意差は認められなかった。同条件下の WT と比較して、TG-C から単離された腓腹筋における 2-DG 含有量の有意な低下(約 10%)が観察された(図 7. A)。インスリン投与後のリン酸化 AKT(p-AKT)のレベルは、インスリンシグナルのマーカーとして汎用されていることから、それを指標として肝臓と筋肉のインスリン感受性をインスリン注射前(0 分)と 15 分後の肝臓と腓腹筋の p-AKT 対 AKT 比で評価した。0 分では、WT と比較して、p-AKT/ AKT 比は TG-C の肝臓で有意に減少していたが(約 35%)、腓腹筋では有意差は認められなかった。しかし、インスリン注射 15 分後では、TG-C の腓腹筋において p-AKT/ AKT は有意に低下していたが(約 35%)、肝臓では有意差は認められなかった(図 7. B)。インスリン注射前は、PCK1 (PEPCK) のタンパク発現レベルは TG-C の肝臓で増加していたが(約 60%)、インスリン注射 15 分後には、有意差は認められなかった(図 7. C)。基礎条件(インスリン非投与下)では、TG-C は、肝臓における p-AKT の低下と PCK1 タンパク発現レベルの上昇し、ピルビン酸負荷試験での糖新生の増加と矛盾しない。一方、インスリン投与後、TG-C の肝臓では

WT と同等に AKT のリン酸化が認められた。これらの結果から、インスリン負荷試験で認められる全身性のインスリン抵抗性増大は、主にインスリン刺激後の TG-C の筋肉の AKT リン酸化とグルコース取り込み能の低下によることが示唆された。

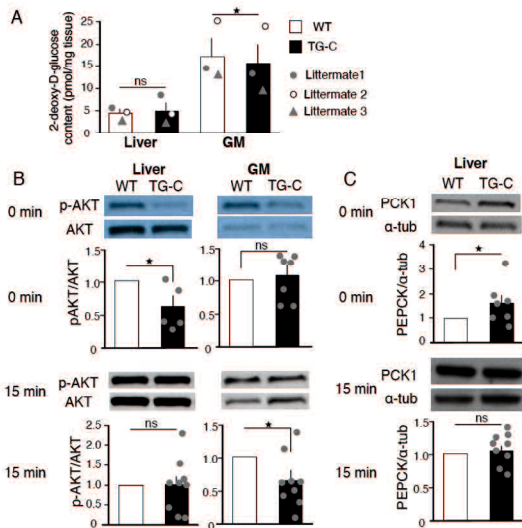


図7. TG-Cマウスの肝臓 (Liver) と腓腹筋 (GM) における糖取り込みとインスリン感受性

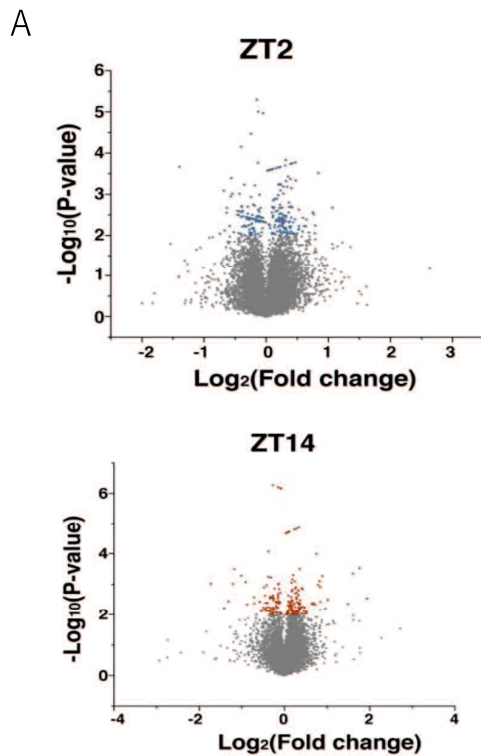
(A) ZT1でインスリンを投与(0.75 U / kg)し、90分後の肝臓および腓腹筋におけるグルコース取り込み(2-デオキシ-D-グルコースを使用)を計測した。(n = 3), ★p < 0.05.

(B) ZT1におけるインスリン投与(0.75U / kg)前(上)および投与15分後(下)の肝臓および腓腹筋のp-AKTとAKTのウエスタンブロット(肝臓: n = 各5-9, 腓腹筋: n = 各7-9), ★p < 0.05.

(C) ZT1におけるインスリン投与(0.75U / kg)前(上)および投与15分後(下)のPCK1およびα-チューブリン (α-tub) のウエスタンブロット(n = 7-9), ★p < 0.05.

### 4.3. 肝臓における E4BP4 の過剰発現は、肝臓での脂肪の利用を阻害する

TG-C マウスの肝臓における遺伝子発現プロファイルを解析するために、ZT2 および 14 で単離された肝臓を用いてトランスクリプトーム解析を行った(図 8. A). WT マウスと TG-C マウスの肝臓では、ZT2 および 14 の解析を合わせると、有意に発現レベルの違いがある遺伝子 (DEGs) が 254 個 (ZT2 で 106、ZT14 で 134、両方の時間で 14)あった。遺伝子オントロジー(GO)分析は、DEGs の機能を評価するために実施した。GO 分析は、特定の GO に DEGs が有意に多く観測できるか検定する解析であり、ここではより小さな p 値をもつ ZT2 および 14 での上位 20 の生物学的プロセスを示す。そのプロセスには、遺伝子発現の概日調節と脂質代謝の調節が含まれていた(図 8. B)。この結果から脂質代謝が TG-C マウスの肝臓で変化していることが示唆された。



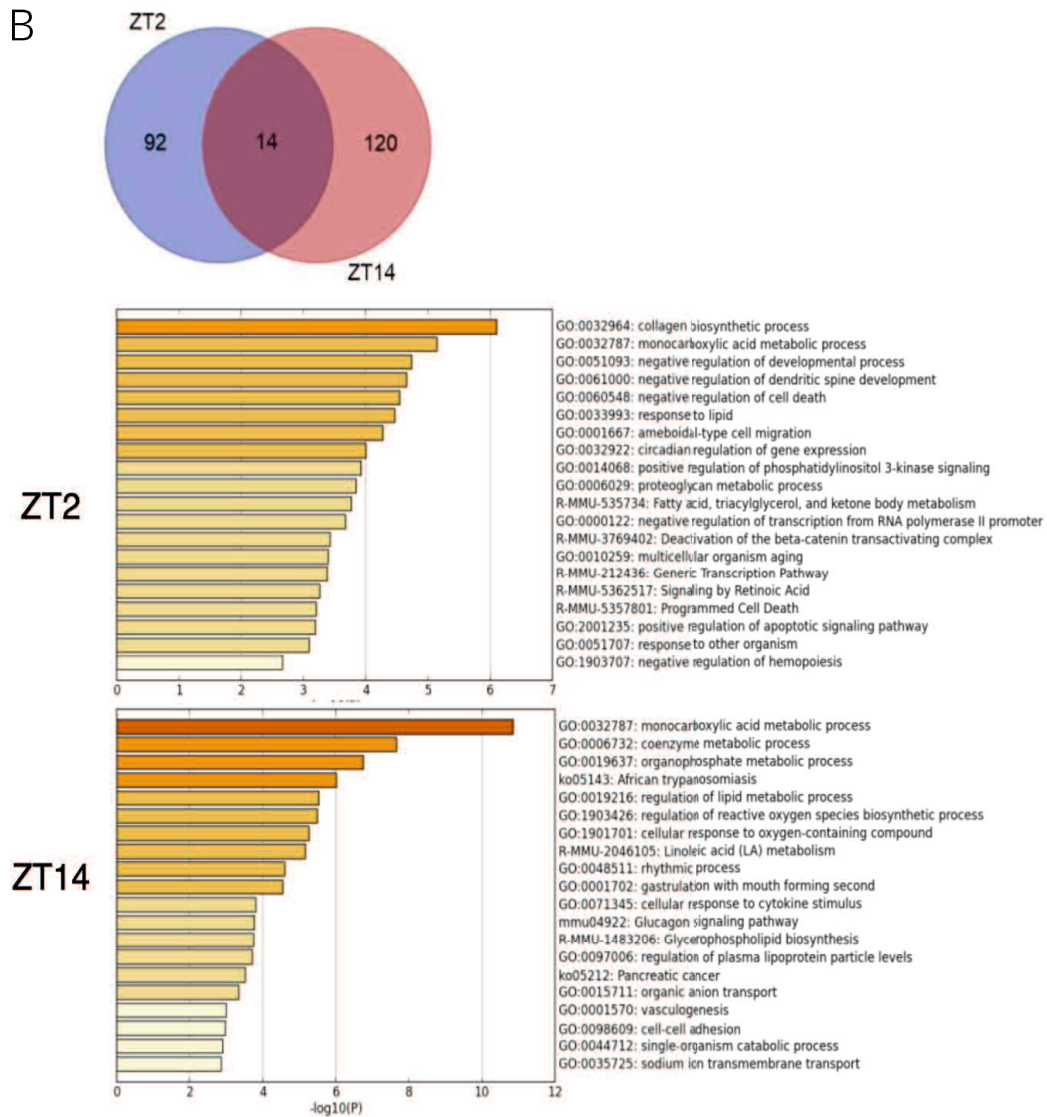


図8. TG-Cマウスの全トランスクリプトーム分析

(A) RNA-seqによるWTマウス, TG-Cマウスの肝臓の全トランスクリプトーム分析. ZT2とZT14で有意な発現変動を示す遺伝子( $p < 0.01$ )は, それぞれ青い点と赤い点で示す( $n = 3$ ).

(B) WTマウス, TG-Cマウスの肝臓のトランスクリプトームの比較で有意な発現変動を示す106(ZT2)および134(ZT14)の機能遺伝子の遺伝子オントロジー解析( $p < 0.01$ ), ( $n = 3$ ).

図.9A は代謝ケージを用いた呼吸商(RQ)の結果を示している. WT マウスの RQ は, 暗期で高値, 明期で低値となるが, TG-C マウスではその差が小さくなり, WT マウスに比べ明期で有意に高値となった(図. 9A). 次に,遊離脂肪酸(FFA)の血漿中の濃度の概日リズムを検討した. WT マウスでは, FFA は ZT4 付近の非活動中期でピークとなり, ZT16 付近の活動中期にボトムになるため, ZT4 から ZT16 にかけて急激な減少が認められる. TG-C マウスでは, WT マウスと比較して, その減少の幅は小さく ZT8 と 20 の間の FFA 値の曲線下面積(AUC)を算出すると, TG-C マウスで有意に大きくなっていった(約 30%) (図. 9B). これらの結果から, 明期/非活動時間でのエネルギー源としての脂質利用が TG-C マウスで有意に減少していることが示唆された. 高レベルの血中 FFA は, 骨格筋のインスリン抵抗性につながる事が報告されている[14,15]. つまり脂質の過剰供給は, 骨格筋への脂質の蓄積と, それに続くインスリン抵抗性を誘発する可能性がある. ZT0 において, TG-C マウスの腓腹筋で TG 含有量は有意に増加しており(約 60%) (図. 9C) ,血中 FFA の増加と筋肉内 TG の増加が TG-C マウスの筋肉のインスリン抵抗性の増大と関連している可能性があると考えられた.

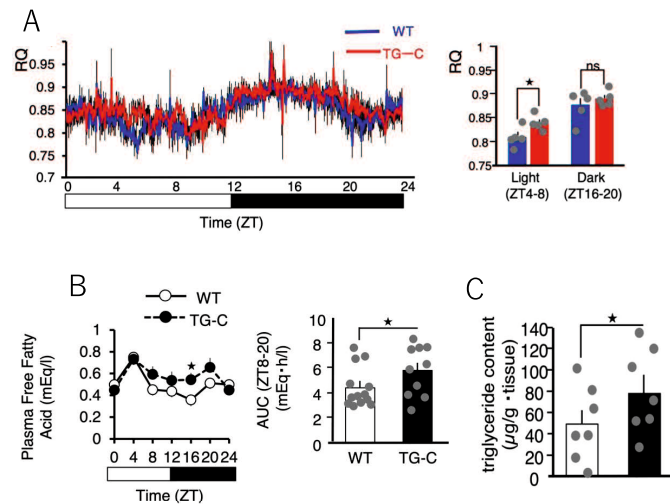


図9. TG-Cの肝臓では, 明期に脂肪酸酸化が減少する.  
 (A) WTマウスとTG-Cマウスの代謝ケージによる呼吸商(RQ)の変動ならびに明期(ZT4-8)および暗期(ZT16-20)の平均RQ(n = 5), ★p < 0.05.  
 (B) WTマウスおよびTG-Cマウスの血中FFA濃度の日内変動(左)およびZT8-20における濃度曲線下面積(AUC)(WT : n = 13; TG-C : n = 10), ★p < 0.05.  
 (C) ZT0でのWTマウスならびにTG-Cマウスの腓腹筋のトリグリセリド含有量(n = 7), ★p < 0.05.

#### 4.4. E4BP4 の肝臓の過剰発現は、肝臓のミトコンドリアダイナミクスを障害する

ミトコンドリアダイナミクスは、概日調節因子 BMAL1 の転写標的であることが示されている。肝臓特異的 *Bmal1* 欠損マウスの肝臓のミトコンドリアは、ZT6(非活動時間)と 18(活動時間)で、肥大化したまま変化が認められず、ミ

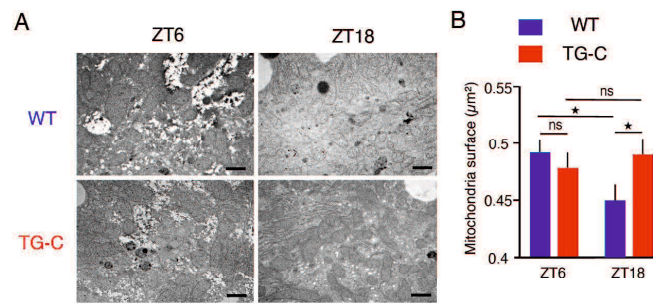


図10. TG-Cマウスの肝臓のミトコンドリアダイナミクス  
(A) ZT6およびZT18でのWTマウスおよびTG-Cマウスの肝臓切片の電子顕微鏡(EM)画像. (n = 3), ★p < 0.05, scale bar : 1  $\mu\text{m}$ .  
(B) ZT6およびZT18でのEM画像から算出したミトコンドリア表面積 (n = 400-600), ★p < 0.05.

トコンドリアダイナミクスが障害されていることが報告されている [5]. 本研究において、WT マウスの肝臓では、ミトコンドリアの表面積は ZT6 と比較して ZT18 で減少したが(約 8.5%), TG-C マウスの肝臓では、ミトコンドリアの表面積は ZT6 と 18 で変化が認められなかった(図. 10). この結果は、TG-C マウスの肝臓でミトコンドリアのダイナミクスが破綻していることを示唆しており、メカニズムの解析には至っていないが、グルコースから脂肪酸へのエネルギーの切り替えの障害に関連している可能性がある。

## 5. 考察

我々は以前、マウスインスリンプロモーター下で E4BP4 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスでは、インスリン分泌が著しく損なわれた顕著な耐糖能異常を示した。また、*Clock* 変異体および  $\beta$  細胞特異的 *Bmal1* 欠損マウスよりも明確な表現型を示した[16, 17]. 同様に、MAP-E4BP4 トランスジェニックマウスは、高脂肪食下でのみ軽度のインスリン抵抗性を示した肝臓特異的 *Bmal1* KO マウスと比較してより重度のインスリン抵抗性を示した[5]. インスリン抵抗性の増大とは反対に、Lamia KA et al は、L-BMAL1 欠損マウスが、絶食期に限定した低血糖を呈することを報告している[4]. DBP はその発現が BMAL1 に依存している遺伝子の 1 つである。実際に L-Bmal1 欠損マウスの肝臓において DBP の発現はほぼ完全に消失している[5]. MAP-E4BP4 トランスジェニックマウスは L-Bmal1 欠損マウスと同様の表現型を示すことを予想しており、同マウスのインスリン抵抗性の増大は、想定していた表現型といえる。PAR bZip のメンバーである DBP, HLF (hepatic leukemia factor), TEF (thyrotroph embryonic factor)は、互いに機能を補完し合うと考えられており、トリプルノックアウトマウスのみで劇的な表現型が観察されるとされている[18].

L-*Bmal1* 欠損マウスの肝臓では、HLF と TEF が DBP の機能喪失を補完する可能性があり、これが、L-*Bmal1* 欠損マウスが肝臓特異的 E4BP4 過剰発現マウスと比較して、インスリン抵抗性がごく軽度である理由の 1 つと考えられる。ピルビン酸負荷試験(図. 5B)の結果および *Pck1*(PEPCK)の発現増加(図. 7C)から TG-C マウスの肝臓では糖新生が増強されていることは明らかであった。一般に、PCK1 は、絶食時や非活動時間に活性化される[19]。今回の研究では、グルカゴンや糖質コルチコイドの血漿中濃度を測定できなかったこともあり、TG-C マウスの肝臓における糖新生増加の決定的な要因を明らかにすることはできなかった。肝細胞核因子 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ )は、*Pck1*の転写調節を介して肝糖新生に関与している[20]。TG-C マウスの肝臓の RNA-シーケンスで、ZT14 での HNF4 $\alpha$  の発現レベルが増加しており(data not shown)、HNF4 $\alpha$  が TG-C マウスの肝臓の糖新生の亢進に関与していることが示唆される。

本研究で特筆すべきは、肝臓特異的な E4BP4 の過剰発現が骨格筋のインスリン抵抗性を引き起こすことであり、このことは肝臓と筋肉にはインスリン感受性における臓器連関があることを示唆している。ヒトの研究では、脂肪肝と肝酵素の上昇が筋肉のインスリン感受性の低下と関連していることが示されており、このことから肝臓、筋肉の代謝における臓器連関の存在が示唆される[21,22]。

TG-C マウスにおけるインスリン抵抗性増大の機序として血漿中 FFA の上昇と筋肉内脂肪の増加が関与していると思われる。脂質誘発性の筋肉インスリン抵抗性のメカニズムとしていくつかの説が提唱されており、筋肉内脂肪の増加はそのうちのひとつと合致する結果であると考えられる [23,24]。

肝臓の概日時計は、糖と脂質という 2 大エネルギー源を時間に応じて切り替えるスイッチのような役割を担っているようである。さらに肝臓の時計遺伝子は、肝臓だけでなく筋肉における脂質代謝、インスリン作用の調節にも関与し、臓器連関の形成に寄与していると思われる(図 10)。最近、肝臓の時計遺伝子が、他臓器あるいは全身の時計遺伝子とは独立して、NAD<sup>+</sup>サルベージ経路やグリコーゲン代謝回転などの代謝プロセスを調節しうるということが報告された[25]。この研究結果は、肝臓の時計が、栄養素が制限された条件下で生き残るために

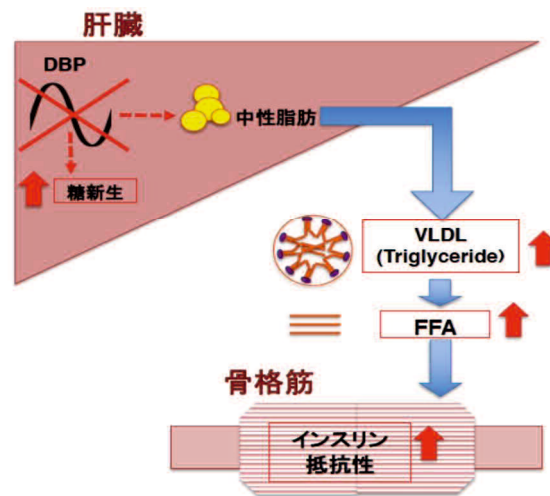


図10. 肝臓の時計遺伝子とインスリン感受性における肝筋連関  
肝臓の時計遺伝子の変調は(DBPシグナルの抑制)は肝臓の糖新生を亢進させるだけでなく、血中の遊離脂肪酸(FFA)を介して骨格筋でのインスリン抵抗性を増大させると考えられる



エネルギー恒常性制御に重要であることを示唆している。本研究は、肝臓と筋肉のエネルギー代謝の調節における肝臓の時計遺伝子による制御システムの重要な側面を明らかにした。エネルギー恒常性の調節における肝の時計遺伝子の役割をより深く理解することで、代謝疾患の管理のためのより良い予防戦略の確立が可能になると考えている。

## 6. 結語

E4BP4 の過剰発現は、肝臓だけでなく、肝臓の  $\beta$  酸化障害に関連して骨格筋にも顕著なインスリン抵抗性を引き起こした。肝臓の概日時計と筋肉のインスリン感受性の間に脂肪酸代謝を介した代謝リンクが存在することが示唆された。肝の概日時計の調整は、糖尿病を含む代謝障害を管理する上で非常に重要な要素であると考えられる。

## 7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、丁寧に御指導くださいました谷澤幸生教授に深く感謝いたします。また、太田康晴先生、福田尚文先生、田口昭彦先生をはじめ、御指導いただきました第3内科の研究室の皆様感謝申し上げます。

電子顕微鏡について御指導いただいた篠田晃教授、柳井章江先生、トランスクリプトーム分析について御指導いただいた水上洋一教授、渡邊健司先生に厚く御礼申し上げます。

本学位論文の主要部分は、Matsumura T, Ohta Y, Taguchi A, Hiroshige S, Kajimura Y, Fukuda N, Yamamoto K, Nakabayashi H, Fujimoto R, Yanai A, Shinoda K, Watanabe K, Mizukami Y, Kanki K, Goshi S, Tanizawa Y. Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2020 Nov 27;S0006-291X(20)32110-0. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.11.066. Online ahead of print. PMID: 33256979 に原著論文として発表したものです。

## 8. 参考文献

- [1] J. Bass, M.A. Lazar, Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* 354(2016)994–999.
- [2] J. Bass, J.S. Takahashi, Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330(2010)1349–1354.
- [3] A. Zarrinpar, A. Chaix, S. Panda, Daily eating patterns and their impact on health and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 27(2016)69–83.

- [4] K.A. Lamia, K.F. Storch, C.J. Weitz, Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105(2008)15172–15177.
- [5] D. Jacobi, S. Liu, K. Burkewitz, et al., Hepatic Bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness. *Cell Metab.* 22(2015)709–720.
- [6] A. Chaix, T. Lin, H.D. Le, et al., Time-restricted feeding prevents obesity and metabolic syndrome in mice lacking a circadian clock. *Cell Metab.* 29(2019)303–319.
- [7] S. Mitsui, S. Yamaguchi, T. Matsuo, et al., Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev.* 15(2001):995–1006.
- [8] H. Yoshitane, Y. Asano, A. Sagami, et al., Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms. *Commun. Biol.* 2(2019)300.
- [9] Y. Ohta, A. Taguchi, T. Matsumura, et al., Clock Gene Dysregulation Induced by Chronic ER Stress Disrupts  $\beta$ -cell Function. *EBioMedicine* 18(2017)146–156.
- [10] A. Tsutusmi, G. Shiota, H. Yamazaki et al., Accelerated growth of hepatocytes in association with Up-regulation of cyclin E in transgenic mice expressing the dominant negative form of retinoic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278(2000)229–235.
- [11] N. Fukuda, M. Emoto, Y. Nakamori, et al., DOC2B: a novel syntaxin-4 binding protein mediating insulin-regulated GLUT4 vesicle fusion in adipocytes. *Diabetes* 58(2009)377–384.
- [12] K. Uno, H. Katagiri, T. Yamada, et al., Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312(2016)1656–1659.
- [13] M. Akiyama, M. Hatanaka, Y. Ohta, et al., Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in *Wfs1* knockout mice. *Diabetologia* 52(2009)653–663.
- [14] G.I. Shulman, Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106(2000)171–176.
- [15] M. Roden, How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol. Sci.* 19(2004)92–96.
- [16] B. Marcheva, K.M. Ramsey, E.D. Buhr, Y, et al., Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466(2010)627–631.

- [17] M. Perelis, B. Marcheva, K.M. Ramsey, et al. Pancreatic  $\beta$  cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science* 350(2015)aac4250.
- [18] F. Gachon, P. Fonjallaz, F. Damiola, et al., The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. *Genes Dev.* 18(2004)1397–1412.
- [19] S. Jitrapakdee, Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 44(2012)33–45.
- [20] J. Sakamaki, H. Daitoku, Y. Kaneko, et al., GSK3  $\beta$  regulates gluconeogenic gene expression through HNF4  $\alpha$  and FOXO1. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 32(2012)96–101.
- [21] K. Kato, Y. Takeshita, H. Misu H, et al., Liver steatosis is associated with insulin resistance in skeletal muscle rather than in the liver in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Diabetes Investig.* 6(2015)158–163.
- [22] K. Takeno, Y. Tamura, M. Kawaguchi, et al., Relation Between Insulin Sensitivity and Metabolic Abnormalities in Japanese Men with BMI of 23–25 kg/m<sup>2</sup>. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101(2016)3676–3684.
- [23] M.C. Petersen, G.I. Shulman. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* 98(2018)2133–2223.
- [24] A.R. Martins, R.T. Nachbar, R. Gorjao, et al., Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 11(2012)30.
- [25] K.B. Koronowski, K. Kinouchi K, P.S. Welz, et al., Defining the Independence of the Liver Circadian Clock. *Cell* 177(2019):1448–1462.