

学位論文（博士）

Metabolic state switches between morning and evening in  
association with circadian clock in people without diabetes

（非糖尿病患者では概日時計に関連して  
代謝状態が朝と晩で切り替わる）

氏名 藤本 留理子

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 病態制御内科学講座

令和4年5月

## 目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	4
4. 方法	4
5. 結果	6
6. 考察	13
7. 結語	15
8. 謝辞	15
9. 参考文献	15

## 1. 要旨

【目的】代謝状態の朝晩の変化を理解することは、代謝障害を管理するためには重要である。我々は、インスリン分泌とインスリン感受性の観点からこの朝晩の変化を解析し、さらに概日リズムとの関連性を含めて検討することを目的とした。

【方法】非糖尿病成人男性 14 人と 10 人に対し、それぞれ 75g 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) と高インスリン正常血糖 (HE) クランプ試験を行った。各被験者に対し、午前 8 時と午後 8 時に OGTT または HE クランプを 1 回ずつ行った。ただし試験時間の順序は無作為とした。各試験直前に毛根を採取し、毛包における時計遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。また、マウスの肝臓と筋肉での AKT リン酸化をウェスタンブロット法により解析した。

【結果】OGTT の結果から、耐糖能は午前 8 時の方が良好であることがわかった。これは、OGTT における負荷後 60 分までのインスリン早期分泌と HE クランプで説明される骨格筋インスリン感受性の違いに起因すると考えられた。一方、OGTT における肝臓のインスリン抵抗性指数によって推定される肝インスリン感受性は、午後 8 時の方が良好であった。60 分までのインスリン分泌量と肝臓のインスリン抵抗性指数の朝晩の差は、Per2 の mRNA の相対的発現量と有意に相関していた。ΔGIR (20 時の値－8 時の値) は、Δ非エステル化脂肪酸 (NEFA) と有意に相関したが、時計遺伝子発現との相関は認められなかった。ΔNEFA は、E4bp4 の mRNA 発現量および Δコルチゾールと有意に相関していた。マウスでは、ヒトの研究から予想されるように、AKT リン酸化は活動時間の初めに肝臓で減少し、筋肉で増加していた。

【結語】各組織の糖代謝は朝と晩で大きく異なっており、脂質代謝、時計遺伝子およびコルチゾールの影響を受けていることがわかった。この関連性についてのより深い知見が代謝障害の新たな改善法の開発に寄与する可能性がある。

## 2. 研究の背景

概日リズムは、睡眠覚醒サイクル、ホルモン分泌、ブドウ糖と脂質代謝、体温調節など、多くの生物学的プロセスで重要な役割を果たす。過去 10 年間の主な研究において、エネルギー代謝の調節に寄与する要因としての概日時計の役割に焦点が当てられてきた<sup>1-3</sup>。体内の大部分の末梢組織はそれぞれの時計システムを持っており、特に、膵臓、肝臓、骨格筋などの代謝が活発な臓器における概日時計は、その臓器固有の機能を調節していると考えられている<sup>4</sup>。たとえば、非活動時間や空腹状態では、ブドウ糖は肝臓から血中へ動員され、脳や筋肉など他の組織に燃料を供給するために血糖値は概ね一定に維持される<sup>5</sup>。ラットのブドウ糖負荷試験では、全身の耐糖能は、活動開始時の方が非活動時間の始まりよりも高く<sup>6</sup>、全身のインスリン感受性の日内変動はその活動開始時でピークに達することが示された<sup>7</sup>。さらに、グルコース刺激インスリン分泌 (GSIS) の概日リズムは強固であり、単離した膵島でもそのリズムが持続することも知られている<sup>8,9</sup>。

非糖尿病のヒト被験者の耐糖能は、非活動 (絶食) 期間の開始前である晩よりも、活動 (摂食) 期間の直前である朝の方が良好であることが既に報告されている<sup>10-14</sup>。末梢インスリン感受性の日内変動と GSIS の日内変動が耐糖能の日内変動に寄与していると考えられ

るが、その詳細なメカニズムはまだよくわかっていない。マウスの研究では、マウス腓島でのリズムカルな Ucp2 の発現が、GSIS と耐糖能のリズムに関連していたとの報告がある<sup>15</sup>。前糖尿病状態のヒトでの解析では、やはり夕方の耐糖能が低くなっており、コルチゾールレベルでは説明できないと論じられている<sup>14</sup>。つまり耐糖能の日内変動の真の調節因子はまだわからないというのが実状である。ヒトにおける末梢組織での体内時計と耐糖能、インスリン分泌、またはインスリン作用の日内変動との関連性に関する報告はない。本研究では、耐糖能障害のないヒトとマウスでその関連性に着目して、研究を進めている。

### 3. 目的

本研究は、インスリン分泌、肝臓と骨格筋におけるインスリン感受性に焦点を当て、非糖尿病患者の朝と晩の代謝状態の相違を明らかにすることを目的としている。毛根における時計遺伝子発現と、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) または高インスリン正常血糖 (HE) クランプ試験から得られた代謝指数の変化との関連性の検討に、マウスを用いた解析結果を加えることによって、耐糖能の日内変動の因子に関する検討を行っている。

### 4. 方法

#### 被験者の登録

同意取得時において 20 歳以上 60 歳未満の成人を対象とし、明らかな糖尿病や耐糖能障害 (空腹時血糖 110mg/dl 以上) を有する者、治療中の疾患がある者、交代勤務従事者は除外した。また、月経周期により耐糖能が変化する可能性があるため、女性は登録しなかった。被験者は、75g OGTT および HE クランプの各試験前に 10 時間以上絶食することを条件としたが、それ以外には睡眠や摂食スケジュールの制限を設けなかった。

同意取得時に、HbA1c と空腹時血糖値を測定し、登録されたすべての被験者に糖尿病がないことを確認した。OGTT または HE クランプのいずれかを、同一被験者に対して午前 8 時と午後 8 時にそれぞれ 1 回ずつ、5 日から 2 週間の間隔を空け、ランダムな順序で行った。2017 年 1 月から 2019 年 11 月までの間に 14 人の被験者が OGTT に登録され、10 人が HE クランプ試験に登録された。すべての被験者は各検査の前に 10~13 時間絶食した。また、各試験開始直前にすべての被験者の毛根を採取した。

#### 75gOGTT

午前 8 時または午後 8 時に、世界保健機関のプロトコールに準じて、75gOGTT を行った。グルコース負荷前および負荷後 (30、60、90、および 120 分) に静脈血を採取し、血漿グルコースおよび血清インスリン濃度を測定した。各種生化学検査は、SRL (東京、日本) によって標準的な方法で測定された。肝臓のインスリン抵抗性指数とは、Abdul Ghani によって提唱された OGTT の最初の 30 分間のグルコースとインスリンの曲線下面積 (AUC) の積 (グルコース AUC 0~30 分×インスリン AUC0~30 分) で表される指数であり<sup>16</sup>、これを肝インスリン抵抗性の指標とした。

#### HE クランプ

人工膵臓 (STG-55;日機装、静岡、日本) を使用した HE クランプは午前 8 時または午後

8 時に行った。クランプ試験は既報の手順に従って以下のように行った<sup>17</sup>。HE クランプ試験中、被験者はレギュラーインスリン（ヒューマリン R; (株)日本イーライリリー、神戸、日本）を一定速度（1.25 mU kg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>）で注入し、血糖値を 95 mg/dl に維持するように 10 %グルコースを可変速度で注入した。ブドウ糖注入速度が定常状態に達した状態での最後の 30 分間（インスリン注入開始から約 90~120 分後）の平均グルコース注入速度（GIR）をインスリン感受性の指標とした。

## マウス

C57BL6J マウスは、12 時間 : 12 時間の明暗サイクル（LD 12:12）で、温度制御された（22°C ± 1°C）室内で管理した。Zeitgeber 時間（ZT）0 は点灯時間、ZT12 は消灯時間として設定した。ZT1 マウスは、実験に供されるまで通常の間暗サイクル（午前 8 時 : 点灯、午後 8 時 : 消灯）で飼育された。ZT13 マウスは、8 週齢以降、逆の間暗サイクル（午後 8 時 : 点灯、午前 8 時 : 消灯）で飼育した。インスリン負荷試験は、ランダムに給餌された 13 週齢の雄マウスで実施した。インスリン（0.75 単位/kg）を午前 9 時（ZT1）に腹腔内注射し、注射後 0、30、60、90、120 分に尾静脈から血液を採取し、ANTSENCE II（Horiba Industry）を使用して血糖値を測定した。注射 15 分後の血液を用いて、血漿非エステル化脂肪酸（NEFA）を酵素アッセイキット（FUJIFILM Wako）で測定した。

## 毛包細胞における時計遺伝子発現

各検査の前に、頭皮の毛を抜き毛包細胞を収集した。その後、既報の手順に従い<sup>18</sup>、2~10 個の毛包を溶解バッファー（RNAqueous-Micro Kit、Thermo Fisher Scientific、USA）にすばやく浸した。RNAqueous-Micro Kit を使用して、トータル RNA を抽出および精製した。キットのプロトコールに従い、SuperScript VILO cDNA 合成キット（Life Technologies、USA）を使用して、100 ng のトータル RNA を逆転写した。Taqman MGB プローブ（Applied Biosystems、USA）を用いたリアルタイム PCR を行い、mRNA 発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。さらに午後 8 時の各時計遺伝子（Dbp、E4bp4、Bmal1、Clock、Nr1d1、および Per2）の相対的発現量を、各個人、各遺伝子の午後 8 時の発現量/午前 8 時の発現量として算出した。

## ウェスタンブロット法

肝臓および腓腹筋（GM）を、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）を使用して蛋白質を抽出した。蛋白質濃度は、BCA 蛋白質アッセイキット（Thermo Fisher Scientific）を使用して測定した。15 mg の蛋白質を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースメンブレン（GE Healthcare）に転写し一次抗体とともにインキュベートした。一次抗体として、抗 Akt 抗体（CST）、抗ホスホ-AKT 抗体（Ser473）（CST）、抗 PEPCK 抗体（Santa Cruz Biotechnology）、および抗  $\alpha$ -チューブリン抗体（CST）を使用した。

## 検定方法

各試験の生化学パラメータの日内変化を、 $\Delta$  = (午後 8 時の値 - 午前 8 時の値) として定義

した。80%の検出力と 0.05 の有意水準に到達するには、 $n=8$  の最小計算サンプルサイズが必要であることがわかった。特に明記しない限り、データは平均  $\pm$  SEM として示した。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。血糖値およびインスリン値、肝インスリン抵抗性指数、GIR、および NEFA 値の午前 8 時と午後 8 時の値に対し、対応のある t 検定（一方向性）を行った。午後 8 時の相対的な時計遺伝子発現量と代謝因子パラメータとの相関関係を、単回帰分析を用いて評価した。

## 5. 結果

### 被験者の背景

75gOGTT と HE クランプ試験に、それぞれ 14 人、10 人の非糖尿病被験者が登録された。これらのうち、5 人の被験者が両方の試験に登録された。参加者は全員日本人男性であった。平均年齢は 38.4 歳 (75g OGTT) および 33.5 歳 (HE クランプ) であった。被験者の平均 BMI は、 $21.9 \pm 0.41$  kg/m<sup>2</sup> (75g OGTT) および  $21.1 \pm 0.29$  kg/m<sup>2</sup> (HE クランプ) でいずれも肥満ではなく、平均 HbA1c は  $5.25 \pm 0.07\%$  (75g OGTT) および  $5.33 \pm 0.07\%$  (HE クランプ) で、糖尿病の者はいなかった。(表 S1)

	Glucose Clamp (SEM)	OGTT (SEM)
<b>Number</b>	10	14
<b>Sex, Male</b>	10	14
<b>Female</b>	0	0
<b>Age (years)</b>	33.5 (2.53)	38.4 (1.84)
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	21.1 (0.29)	21.9 (0.41)
<b>HbA1c (%)</b>	5.25 (0.07)	5.33 (0.07)
<b>(mmol/mol)</b>	33.8 (0.82)	34.7 (0.77)

表S1. 被験者の背景. データは、被験者の数または平均（標準誤差）で表した。

### 75gOGTT での耐糖能とインスリン分泌

図 1 に示すように、朝と晩の OGTT における血糖値（負荷後 60 分、90 分、120 分）およびインスリン値（負荷後 0 分、90 分）はいずれも有意な差が認められた。血糖値は、60 分後では午前 8 時  $8.44 \pm 0.69$  mmol/L に対し午後 8 時  $10.77 \pm 0.65$  mmol/L ( $p = 0.0028$ )、90 分後では午前 8 時  $7.11 \pm 0.53$  mmol/L に対し午後 8 時  $10.34 \pm 0.65$  mmol/L ( $p < 0.0001$ )、120 分後では午前 8 時  $6.95 \pm 0.40$  mmol/L に対し午後 8 時  $9.04 \pm 0.52$  mmol/L ( $p = 0.0005$ ) であり、いずれも午後 8 時で有意に高かった (図 1a)。0~120 分までの血糖値の AUC (Glucose AUC 0~120) は午前 8 時の方が小さかった (午前 8 時  $15.39 \pm 0.77$  対 午後 8 時  $18.54 \pm 0.90$  mmol/h/L、 $p = 0.0007$ ) (図 1b)。これらの結果は、非糖尿病者の耐糖能は午後 8 時よりも午前 8 時の方がはるかに良好であることを示している。

空腹時インスリン値は午後 8 時よりも午前 8 時の方が高かった (午前 8 時  $29.7 \pm 2.4$  対 午後 8 時  $19.7 \pm 2.1$  pmol/L、 $p = 0.0001$ )。ブドウ糖負荷後 30 分のインスリン値は午前 8 時に高くなる傾向がみられたが (午前 8 時  $284.4 \pm 59.0$  対 午後 8 時  $181.2 \pm 18.0$  pmol/L、 $p =$

0.0565)、負荷後 90 分のインスリン値は午後 8 時が午前 8 時を大幅に上回った (午前 8 時  $211.0 \pm 34.0$  対 午後 8 時  $306.0 \pm 39.2$  pmol/L、 $p = 0.0438$ )。インスリン値がピークに達する平均時間は、午後 8 時の方が午前 8 時よりも大幅に長いことがわかった (図 1c)。午前 8 時と午後 8 時の間で、0~120 分までのインスリン AUC (Insulin-AUC 0~120)に有意差は認められなかったが (午前 8 時  $429.8 \pm 49.9$  対  $411.4 \pm 34.5$  pmol/L、 $p = 0.6186$ )、0~60 分のインスリン AUC (Insulin AUC 0~60) は、午後 8 時よりも午前 8 時の OGTT の方が大きかった (午前 8 時  $215.8 \pm 31.7$  対 午後 8 時  $148.5 \pm 12.2$  pmol/L、 $p = 0.0216$ ) (図 1d)。これらの結果より、インスリン初期分泌が午後 8 時よりも午前 8 時の方が大きいことが示唆された。

明石らは、毛包細胞における時計遺伝子発現の定性的評価が、ヒトの概日時計を研究するための効果的なアプローチであることを報告している<sup>19</sup>。この方法にしたがって毛包における時計遺伝子発現量 (表 1) とインスリン初期分泌 (Insulin-AUC 0~60) との相関関係を検討したところ、Per2 の相対的発現量と  $\Delta$  インスリン AUC 0~60 分との間に有意な相関が認められた ( $r = -0.685$ 、 $p = 0.007$ ) (図 1e)。

Participant/gene	<i>Dbp</i>	<i>E4bp4</i>	<i>Bmal1</i>	<i>Nr1d1</i>	<i>Per2</i>
1	4.14	0.081	0.62	1.04	0.81
2	0.82	1.24	1.89	0.81	0.4
3	0.22	0.7	0.28	1.08	0.22
4	0.1	0.27	0.49	0.7	0.63
5	1.28	0.79	1.44	2.35	0.46
6	3.81	1.05	1.9	0.62	4.87
7	9.98	1.17	0.76	1.66	1.73
8	0.71	0.56	1.02	0.69	0.58
9	3.33	4.62	3.61	0.75	6.64
10	1.48	8.5	10.22	0.92	2.82
11	2.11	0.73	2.06	0.8	0.19
12	0.98	1.29	2.28	1.29	0.54
13	0.42	1.38	2.16	1.38	0.72
14	3.6	10.92	4.27	3.72	3.49

表1. 75g経口ブドウ糖負荷試験前の午後8時の毛包における相対的な時計遺伝子発現量 (午後8時/午前8時)。

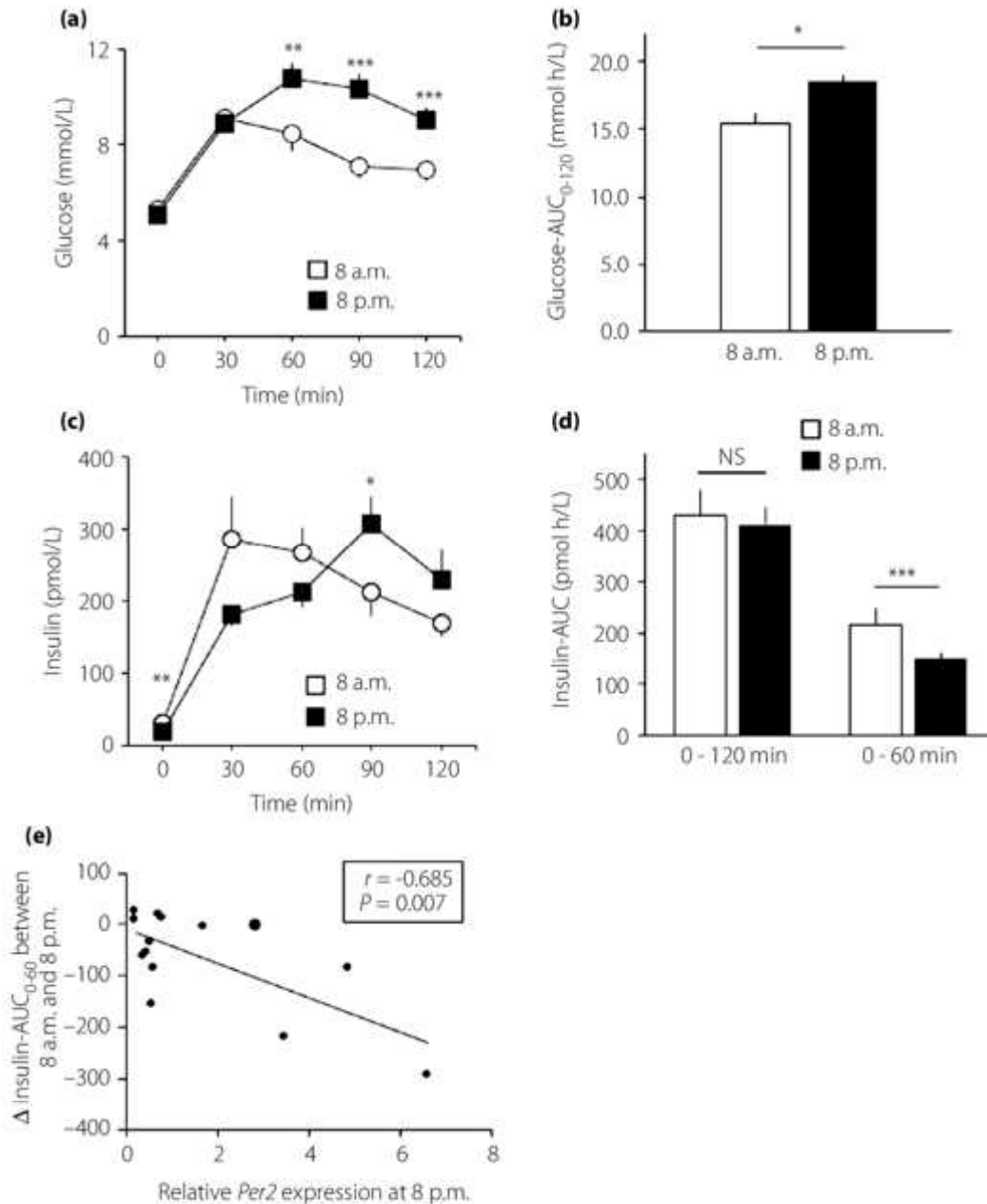


図1. 午前8時と午後8時の75g経口ブドウ糖負荷試験の結果の比較 (n = 14) .

(a) 75g OGTT中の血糖値の変化. (b) OGTT中の0~120分の血糖値-曲線下面積 (AUC) . (c) OGTT中の血漿インスリン値の推移. (d) OGTT中の血漿インスリン-AUC 0~120分およびインスリン-AUC 0~60分. データは平均値 ± 標準誤差で示し、各時点に対応のあるt検定 (片側) を行った. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , および\*\*\*  $p < 0.001$ . NS有意差なし. (e) Δインスリン-AUC 0~60分 (夕方の値-朝の値) と毛包細胞におけるPer2 mRNA発現量との単回帰分析

### 肝インスリン抵抗性と毛包における時計遺伝子 Per2 発現との相関

Abdul-Ghani らは、肝臓のインスリン抵抗性指数を、OGTT の最初の 30 分間のグルコースとインスリンの AUC の積として提唱しており、この指数を本研究では活用した<sup>16</sup>。肝インスリン抵抗性指数は、午後 8 時よりも午前 8 時の方が有意に大きく (午前 8 時  $285.0 \pm 55.0$  対 午後 8 時  $175.9 \pm 16.3$ ,  $p = 0.0336$ ) (図 2a)、この変動は、毛包における Per2 の



発現量と有意に相関していることがわかった ( $r = -0.690$ ,  $p = 0.006$ ) (図 2b)。さらに、いくつかのホルモンの血漿中濃度は、有意な日内変化を示した。特に、コルチゾール値は大幅に変化した (午前 8 時  $342.6 \pm 18.1$  対 午後 8 時  $131.8 \pm 20.0$  mmol/L,  $p < 0.00001$ )。コルチゾール値が高いと肝糖新生の亢進とともに耐糖能が低下することが知られているが、単回帰分析では、 $\Delta$  コルチゾールと  $\Delta$  肝インスリン抵抗性指数との間に有意な相関は見られなかった (図 2c)。

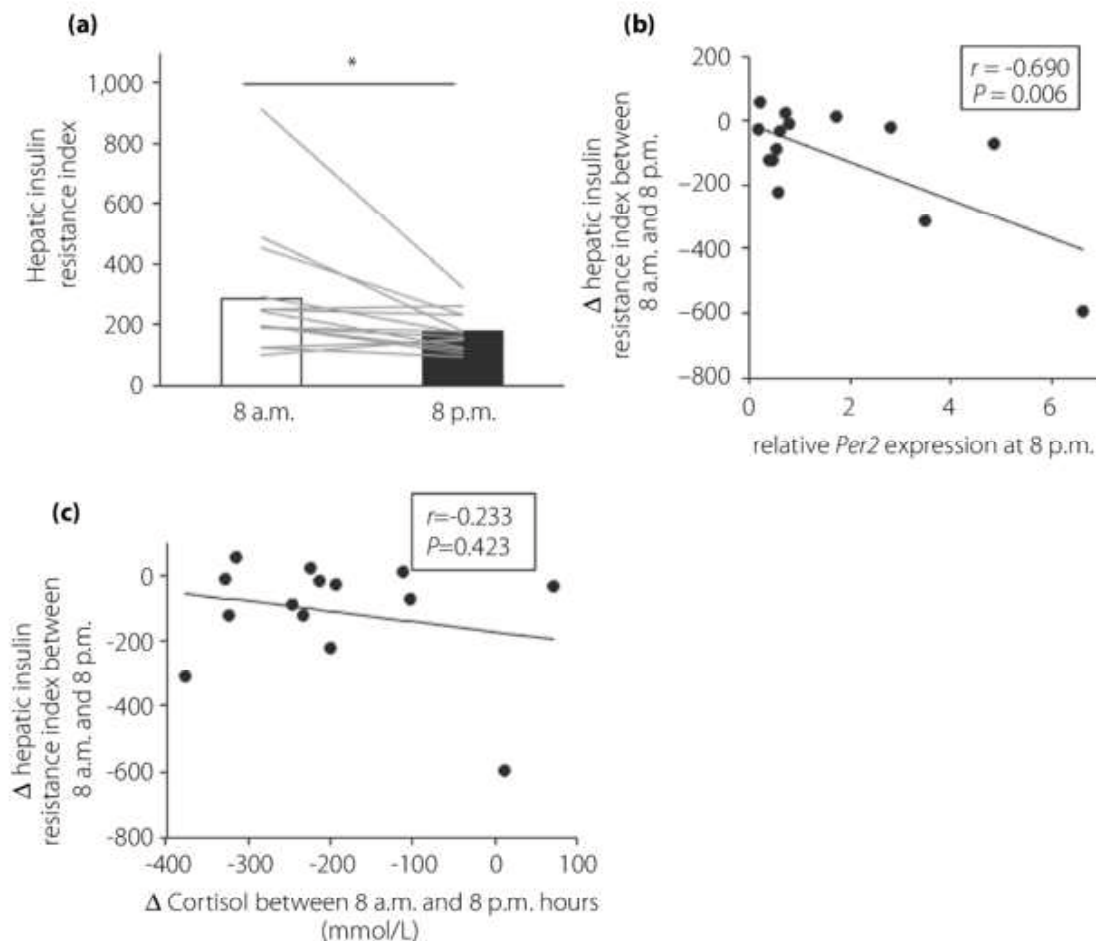


図2. 経口ブドウ糖負荷試験から得られた肝インスリン抵抗性指数の結果分析。

肝臓のインスリン抵抗性指数は、OGTTでの血糖-AUC 0~30分×インスリンAUC 0~30分として定義した ( $n = 14$ )。 (a) 肝インスリン抵抗性の変化。データは平均値で示し、各時点で対応のあるt検定 (片側) を用いた。\* $p < 0.05$ 。 (b, c)  $\Delta$ 肝インスリン抵抗性指数と毛包細胞における相対的Per2 mRNA発現量 (b) ならびに $\Delta$ コルチゾール (c) との間の単回帰分析。

### HE クランプ試験における GIR と NEFA との相関

HE クランプ試験の GIR は、午後 8 時よりも午前 8 時の方が有意に大きかった (午前 8 時  $8.93 \pm 55.0$  対 午後 8 時  $6.69 \pm 16.3$ ,  $p = 0.026$ ) (図 3a)。しかし、 $\Delta$  GIR は時計遺伝子の相対的発現との間には有意な相関は認められなかった (表 2)。さらに、 $\Delta$  GIR と  $\Delta$  コ

ルチゾールとの間にも有意な相関は認められなかった ( $r=0.622$ 、 $p=0.055$ )。しかしながら興味深いことに、 $\Delta$  GIR と  $\Delta$  NEFA の間には有意な相関が認められた ( $r = -0.639$ 、 $p = 0.047$ ) (図 3b)。

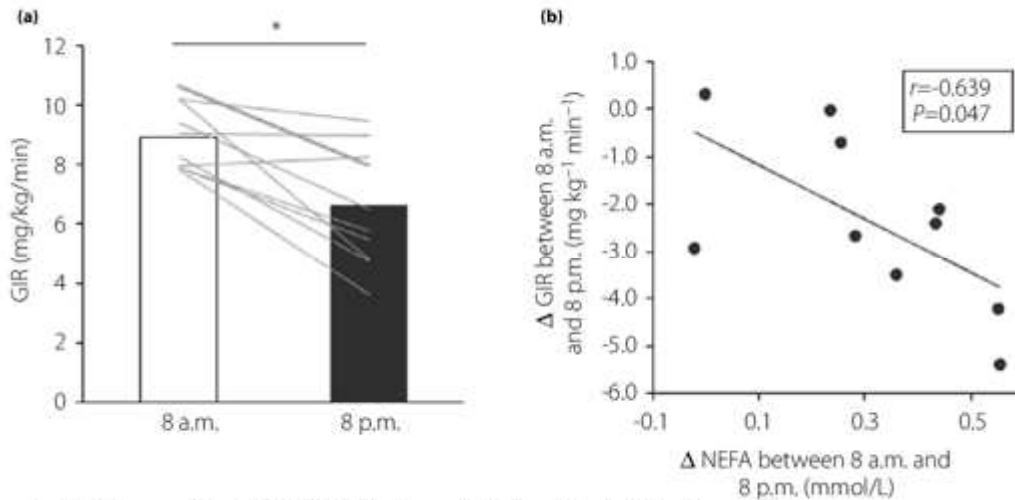


図3. 高インスリン正常血糖クランプ試験の結果分析 (n = 10) .

(a) 午前8時から午後8時までの高インスリン正常血糖クランプにおけるブドウ糖注入速度 (GIR) . 解析には対応のある検定 (片側) を用いた. \* $p < 0.05$ . (b)  $\Delta$  GIRと $\Delta$ 血清非エステル化脂肪酸 (NEFA) との単回帰分析.

Participant/Gene	<i>Dbp</i>	<i>E4bp4</i>	<i>Bmal1</i>	<i>Nr1d1</i>	<i>Per2</i>
1	0.14	0.32	0.8	0.49	0.2
2	0.53	0.82	0.52	0.75	0.57
3	2.81	1.17	1.52	1.53	0.93
4	0.59	1.23	1.46	0.43	0.6
5	0.6	1.05	1.65	1.16	0.64
6	1.4	1.22	1.14	1.28	1.22
7	0.62	0.45	0.44	0.94	0.89
8	0.56	0.76	1.4	4.21	0.33
9	0.4	0.26	0.28	0.33	0.23
10	0.73	0.79	1.03	0.57	0.27

表2. 高インスリン正常血糖クランプ時の午後8時の毛包における相対的な時計遺伝子発現量 (午後8時/午前8時) .

#### 血清 NEFA 値と毛包における時計遺伝子 *E4bp4* 発現との相関

OGTTならびにHEクランプを行った19人の被験者の血清NEFA濃度を測定した。OGTTとHEクランプの両方を行った人(5人)については、最初の検査で提供されたデータを分

析に使用した。血清 NEFA 値は午前 8 時よりも午後 8 時で有意に高かった（午前 8 時  $0.583 \pm 0.076$  対 午後 8 時  $0.857 \pm 0.058$  mmol/L、 $p = 0.0007$ ）（図 4a）。 $\Delta$  NEFA は、E4bp4 の相対的発現と有意に関連していたが（ $r = 0.574$ 、 $p = 0.01$ ）（図 4b）、 $\Delta$  GIR はどの時計遺伝子とも有意な相関は認められなかった。さらに、 $\Delta$  NEFA と  $\Delta$  コルチゾールとの間に有意な相関が認められ（ $r = -0.311$ 、 $p = 0.003$ ）（図 4c）、時計遺伝子とコルチゾールの両方が血清 NEFA を介して骨格筋インスリン感受性を部分的に調節していることが示唆された。

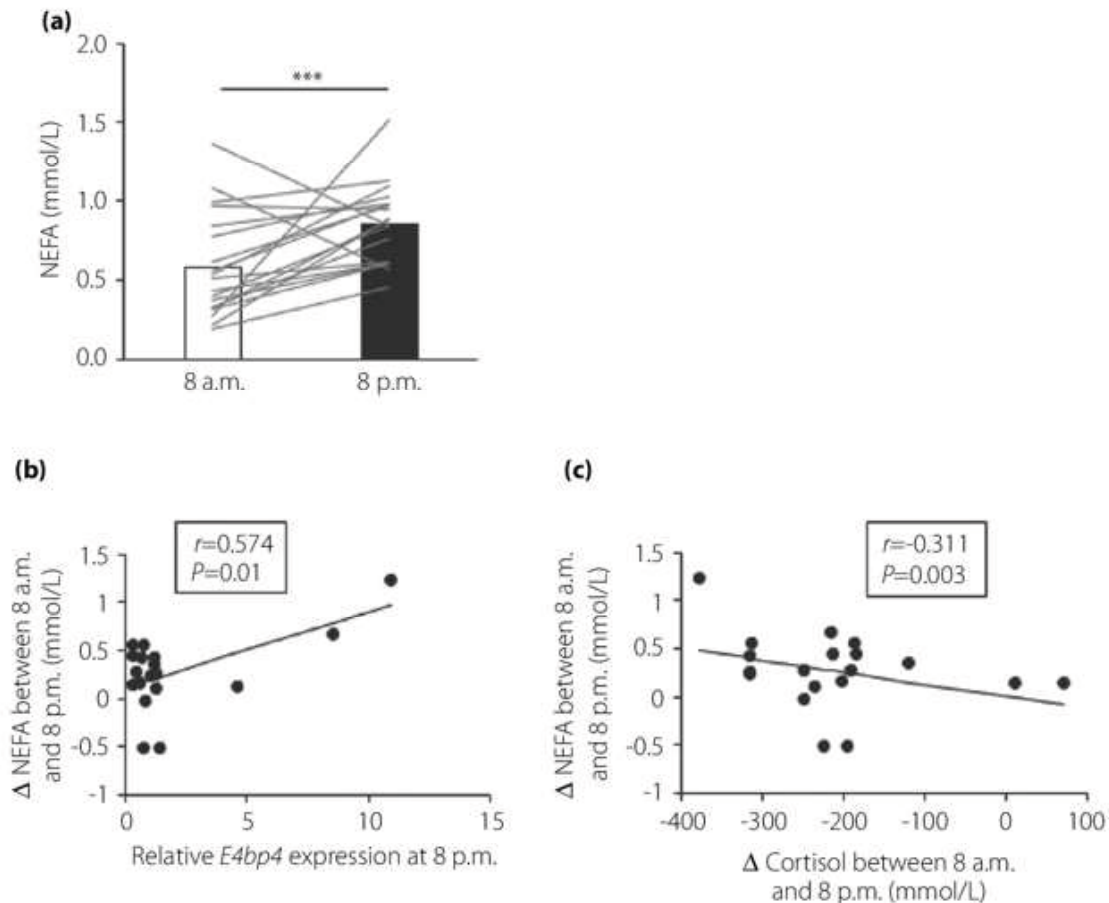


図4. 血清非エステル化脂肪酸 (NEFA) の分析.

(a) 午前8時と午後8時の血清NEFA値 ( $n = 19$ ). 解析には対応のあるt検定 (片側) を用いた. \*\*\* $p < 0.001$ . (b, c)  $\Delta$ 血清NEFAと E4bp4 mRNA発現量 (b) ならびに $\Delta$ コルチゾール (c) との単回帰分析.

#### 活動期および非活動期開始時のマウスの肝臓および筋肉のインスリン感受性

午前 9 時 (ZT1) は、ZT1 マウスの非活動期の始まりであり、ZT13 マウスにとっては活動期の始まりとなる (図 5a)。ITT において、ZT13 マウスでは ZT1 マウスと比較してインスリン投与後 90 分および 120 分で低い血糖値であった。つまり、マウスでも活動期の始まりでは全身または筋肉のインスリン感受性が高いことが示唆された (図 5b)。また同時刻における血清 NEFA は、ZT1 マウスより ZT13 マウスで有意に低かった (図 5c)。さらに、インスリン注射 15 分後に肝臓と腓腹筋の p-AKT と AKT の比率を評価した。AKT リン酸

化は、ZT1 マウスと比較して ZT13 マウスの肝臓で有意に減少していたが、筋肉では有意に増加していた (図 5d)。PEPCK は ZT13 マウスの肝臓で増加していた (図 5e)。これらの結果は、マウスにおいても非活動時間と比較して、活動時間に筋インスリン感受性が増加し、反対に肝インスリン感受性は減少することを示唆しており、ヒトでの観察と一致していると考えられた。

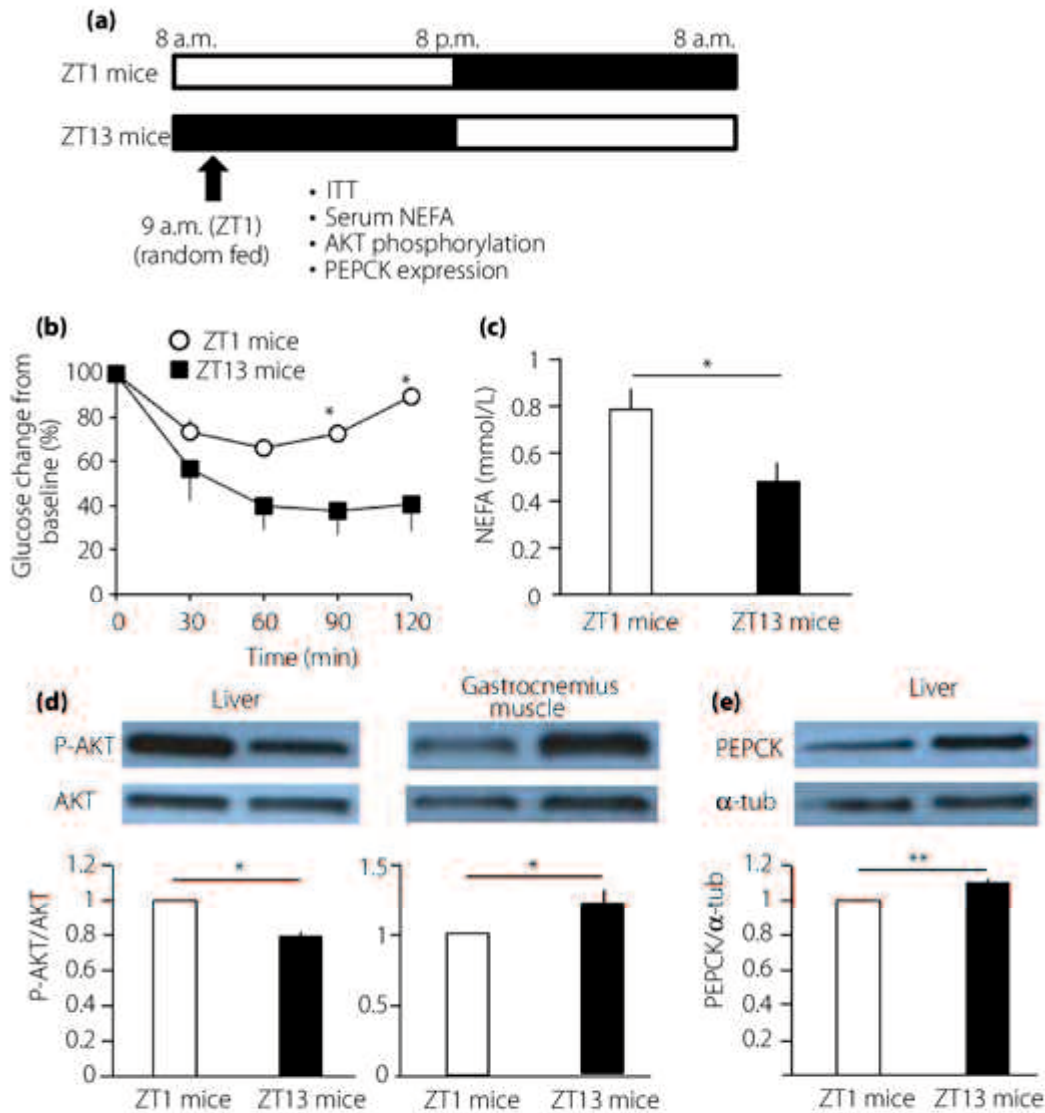


図5. 活動期および非活動期開始時のマウスのインスリン感受性.

(a) 実験条件とグループ. すべてのマウスは、8週齢まで同じ明/暗 (LD) サイクル (午前8時から午後8時まで点灯) で飼育した。8週齢から、ZT1マウスを同じLDサイクルで、ZT13マウスを逆のLDサイクル (午後8時から午前8時まで点灯) で飼育した。一晩絶食させた後、血漿グルコースおよびインスリン値を測定した。(b) インスリン (0.75 U/kg) 負荷試験における血糖値の変化. 負荷前の値を100%としてプロットした (n=4)。(c) インスリン (0.75 U/kg) 注射15分後の血清非エステル化脂肪酸 (NEFA) (n=4)。(d) インスリン注射15分後のZT1マウスおよびZT13マウスから単離された肝臓および腓腹筋におけるリン酸化AKT (P-AKT) およびAKTのウエスタンブロット. P-AKT/AKT比を平均 ± 標準誤差で表した (n=5)。(e) インスリン注射15分後のZT1およびZT13マウスから単離された肝臓におけるPEPCKのウエスタンブロット. PEPCK/α-チューブリン比を平均 ± 標準誤差で表した (n=5)。  
\*p < 0.05、\*\*p < 0.01.

## 6. 考察

糖代謝を中心に、非糖尿病患者の代謝の日内変動について解析した。朝の GSIS と骨格筋のインスリン感受性の増加に伴い、糖代謝に有意な変動が認められ、耐糖能は朝の方が良好であった。これらの結果は、日本人とは異なる人種や生活習慣のグループでの解析結果と概ね同じであった<sup>11-13,15</sup>。GSIS と筋インスリン感受性は、間違いなく、朝の耐糖能が晩に比べて良いということの要因になっている。しかし、肝でのインスリン抵抗性指数は、朝の方が高くなっており、朝の血糖値をむしろ上昇させる方向に働いていた(図 6)。このような現象はマウスでも同様であり、インスリン刺激による AKT リン酸化は、骨格筋では活動時間でより強く、肝臓では非活動時間でより強くなることを確認した。2 型糖尿病に特徴的な朝の高血糖の主な原因は、肝臓のグルコース産生の上昇であることが知られているが<sup>20</sup>、非糖尿病患者における肝臓のグルコース代謝の日内変動を示した先行研究はない。起床後のインスリンを介した筋肉への素早いグルコースの取り込みとグリコーゲン合成の急速な増加は、活動時間が始まってすぐに素早い行動ができるという点で、進化の過程で生存競争に有益な現象であると考えられる<sup>21</sup>。

過去のマウスの研究では、骨格筋細胞の自律的な概日リズムが、活動期(暗期)のインスリン感受性を高めることが示されており<sup>22</sup>、時計遺伝子は、糖質コルチコイド受容体依存性遺伝子の発現を介して、肝臓の糖新生を調節することが報告されている<sup>23</sup>。活動期初期の肝臓のグルコース産生と筋肉への供給の増加は、身体活動と栄養要求の増加に備えるという点で、やはり生存にとって重要なメカニズムであると仮定される。

体内分子時計が組織固有のメカニズムを通じて糖および脂質代謝に重要な役割を果たすことが遺伝子改変マウスを用いて示されてきた。膵臓特異的 *Bmal1* ノックアウトおよび  $\beta$  細胞特異的 *E4bp4* 過剰発現は、GSIS を低下させる<sup>24,25</sup>。肝臓特異的 *Bmal1* ノックアウトマウスは、空腹時のインスリン感受性を低下させる<sup>26</sup>。肝臓特異的な *E4bp4* の過剰発現は、肝臓だけでなく骨格筋にも、脂肪酸酸化の低下を介して顕著なインスリン抵抗性を誘発する<sup>27</sup>。骨格筋特異的 *Bmal1* ノックアウトは、単離した筋肉でのインスリン依存性の糖取り込みを減少させる<sup>28</sup>。これらの研究結果から、個々の臓器(膵臓  $\beta$  細胞、肝臓、骨格筋)内の概日時計が全身の代謝に異なる影響を与えることが示唆される。血糖値などの全身の恒常性は、時計遺伝子を介した臓器間コミュニケーションによって調整されている可能性がある。

我々は、本研究で、毛包細胞における時計遺伝子発現と、GSIS、GIR(骨格筋インスリン感受性)、肝インスリン抵抗性指数(肝臓糖新生)、およびヒト被験者の血漿 NEFA レベルとの関連性を検討した。GSIS 及び肝インスリン抵抗性の変動は時計遺伝子 *Per2* の発現量と、また血漿 NEFA の変動は時計遺伝子 *E4bp4* と有意に相関していることが示された(図 6)。

コルチゾールは、*PEPCK* の発現を介して肝臓での糖新生を増加させる<sup>29</sup>。ヒトでは、コルチゾールレベルは朝に高く、夕方や夜に低いため、コルチゾールの日内変動は肝インスリン抵抗性と相関する可能性が高いと予想した。しかし、予期せぬことにコルチゾールの日内変動の振幅( $\Delta$ コルチゾール)は肝インスリン抵抗性指数と全く相関しなかった。本研究の結果によって、コルチゾールが肝インスリン感受性の主要な決定要因であることを否定されるわけではないものの、時計遺伝子を介した他のメカニズムも機能している可能

性があるといえるのではないだろうか。

骨格筋では、コルチゾールがインスリン作用の強力な拮抗作用を有することが知られている<sup>30</sup>。しかし、私たちの研究結果は、コルチゾール値が大幅に低下にもかかわらず、筋肉のインスリン感受性を表す GIR は晩に低くなった。コルチゾールの日内変動 ( $\Delta$  コルチゾール) と  $\Delta$  GIR との間には有意な相関が認められなかった ( $r = -0.062$ ,  $p = 0.864$ )。この結果から、骨格筋のインスリン感受性に対するコルチゾールの効果は、他の要因によって相殺されている可能性がある。一方、 $\Delta$  GIR は  $\Delta$  NEFA と有意な相関を示した。

NEFA は、全身（主に骨格筋）のインスリン抵抗性に寄与する主要な要因の一つであり<sup>31,32</sup>、NEFA への過剰な曝露は筋肉のインスリン抵抗性を増加させる。 $\Delta$  NEFA は、時計遺伝子の一つである E4bp4 の発現および  $\Delta$  コルチゾールと有意に相関していることが観察された。したがって、筋インスリン感受性は、NEFA を介して時計遺伝子の間接的な制御下にある可能性がある（図 6）。我々の研究グループは、マウスの肝臓での E4bp4 の過剰発現が、NEFA を介して間接的に筋肉のインスリン抵抗性を引き起こすことを報告している<sup>27</sup>。

この研究では、残念ながら GLP-1、GIP、グルカゴンを測定できなかった。ヒトにおいて、GLP-1 と GIP は、1 日の最初の食事後の迅速なインスリン反応に寄与する可能性があることが報告されている<sup>33</sup>。一方、グルカゴンは、1 日の最初の食事後のインスリン分泌に続く肝臓のグルコース産生を活性化すると推測されている<sup>34</sup>。GLP-1、GIP、グルカゴンの概日分泌パターンと時計遺伝子との関連を分析することは今後の重要な課題である。

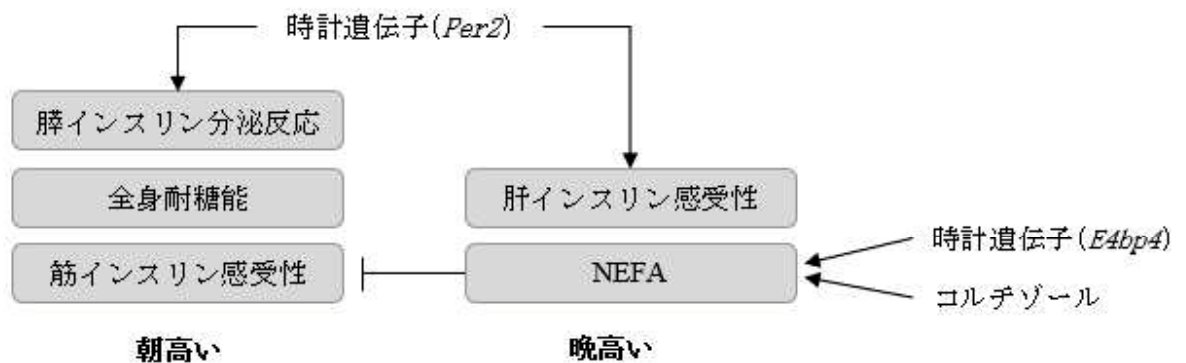


図6. 各臓器における糖代謝の朝晩の時計遺伝子との関連性.

全身耐糖能は、早期インスリン分泌と筋インスリン感受性の増加に伴い、朝の方が良好であった。一方、肝臓のインスリン感受性は朝の血糖値を上昇させる方向で変動していた。本研究での回帰分析の結果に基づけば、膵インスリン分泌および肝インスリン感受性は時計遺伝子によりコントロールされている可能性がある。筋インスリン感受性と時計遺伝子との間には有意な相関が認められなかったが、NEFA との間には有意な相関が認められ、NEFA と筋インスリン感受性との間にも有意な相関が認められた。これらの結果から時計遺伝子やコルチゾールはNEFAを介して筋インスリン感受性を調節していることが示唆された。

## 7. 結語

非糖尿病男性における耐糖能と臓器間の糖の流れの日内変動を解析し、臓器レベルでこれらの変化に寄与する要因について検討した。朝晩の耐糖能の違いは、インスリン分泌の律動性と骨格筋のインスリン感受性が主に関与していると考えられた。さらに我々は、肝臓と筋肉のインスリン感受性の日内変動が、相反する方向で変化することを示した。概日時計と代謝状態間のコミュニケーションのメカニズムをより深く理解することは、代謝障害の予防または治療を目的とした戦略につながる可能性があるため、さらに研究を進めていきたい。

## 8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、病態制御内科学講座 太田康晴先生、谷澤幸生教授、山口大学時間学研究所 明石真教授をはじめ、御指導いただきました先生方、技術補佐員の和田さん、そしてすべての研究参加者の方々に深く感謝申し上げます。なお、本学位論文の主要部分は、Ruriko Fujimoto, Yasuharu Ohta, Konosuke Masuda, Akihiko Taguchi, Masaru Akiyama, Kaoru Yamamoto, Hiroko Nakabayashi, Yuko Nagao, Takuro Matsumura, Syunsuke Hiroshige, Yasuko Kajimura, Makoto Akashi, Yukio Tanizawa. *Metabolic state switches between morning and evening in association with circadian clock in people without diabetes. Journal of Diabetes Investigation. 2022 Apr 15. doi: 10.1111/jdi.13810. Online ahead of print.* に原著論文として発表したものです。

## 9. 参考文献

1. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, et al. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 2011; 121: 2133-2141.
2. Shi M, Zheng X. Interactions between the circadian clock and metabolism: there are good times and bad times. *Acta Biochim Biophys Sin* 2013; 45: 61-69.
3. Dollet L, Pendergrast LA, Zierath JR. The role of the molecular circadian clock in human energy homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 2021; 32: 16-23.
4. Cagampang FR, Bruce KD. The role of the circadian clock system in nutrition and metabolism. *Br J Nutr* 2012; 108: 381-392.
5. Han HS, Kang G, Kim JS, et al. Regulation of glucose metabolism from a livercentric perspective. *Exp Mol Med* 2016; 48: e218.
6. la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, et al. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 2001; 50: 1237-1243.
7. Ma X, Zhou Z, Chen Y, et al. RBP4 functions as a hepatokine in the regulation of glucose metabolism by the circadian clock in mice. *Diabetologia* 2016; 59: 354-362.
8. Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, et al. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 2002; 33: 172-177.
9. Delattre E, Cipolla-Neto J, Boschero AC. Diurnal variations in insulin secretion and K<sup>+</sup> permeability in isolated rat islets. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 505-510.

10. Saad A, Dalla Man C, Nandy DK, et al. Diurnal pattern to insulin secretion and insulin action in healthy individuals. *Diabetes* 2012; 61: 2691-2700.
11. Carroll KF, Nestel PJ. Diurnal variation in glucose tolerance and in insulin secretion in man. *Diabetes* 1973; 22: 333-348.
12. Van Cauter E, Désir D, Decoster C, et al. Nocturnal decrease in glucose tolerance during constant glucose infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 604-611.
13. Van Cauter E, Blackman JD, Roland D, et al. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J Clin Invest* 1991; 88: 934-942.
14. Sonnier T, Rood J, Gimble JM, et al. Glycemic control is impaired in the evening in prediabetes through multiple diurnal rhythms. *J Diabetes Complications* 2014; 28: 836-843.
15. Seshadri N, Jonasson ME, Hunt KL, et al. Uncoupling protein 2 regulates daily rhythms of insulin secretion capacity in MIN6 cells and isolated islets from male mice. *Mol Metab* 2017; 6: 760-769.
16. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, et al. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 2007; 30: 89-94.
17. Okuno Y, Komada H, Sakaguchi K, et al. Postprandial serum C-peptide to plasma glucose concentration ratio correlates with oral glucose tolerance test- and glucose clamp-based disposition indexes. *Metabolism* 2013; 62: 1470–1476.
18. Yamaguchi A, Tatsumoto M, Matsumura R, et al. Normal peripheral circadian phase in the old-old with abnormal circadian behavior. *Genes Cells* 2018; 23: 849-859.
19. Akashi M, Soma H, Yamamoto T, et al. Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15643-15648.
20. Radziuk J, Pye S. Diurnal rhythm in endogenous glucose production is a major contributor to fasting hyperglycaemia in type 2 diabetes. Suprachiasmatic deficit or limit cycle behaviour? *Diabetologia* 2006; 49: 1619-1628.
21. Jensen J, Rustad PI, Kolnes AJ, et al. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. *Front Physiol* 2011; 2: 112.
22. Basse AL, Dalbram E, Larsson L, et al. Skeletal Muscle Insulin Sensitivity Show Circadian Rhythmicity Which Is Independent of Exercise Training Status. *Front Physiol* 2018; 9: 1198.
23. Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, et al. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* 2011; 480: 552–556.
24. Marcheiva B, Ramsey KM, Buhr ED, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 2010; 466: 627-31.
25. Ohta Y, Taguchi A, Matsumura T, et al. Clock Gene Dysregulation Induced by Chronic ER Stress Disrupts  $\beta$ -cell Function. *EBioMedicine* 2017; 18: 146- 156.
26. Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15172-15177.
27. Matsumura T, Ohta Y, Taguchi A, et al. Liver-specific dysregulation of clockcontrolled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 534: 415-421.
28. Dyar KA, Ciciliot S, Wright LE, et al. Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are



- controlled by the intrinsic muscle clock. *Mol Metab* 2013; 3: 29-41.
29. Beaupere C, Liboz A, Fève B, et al. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 623.
  30. Harfmann BD, Schroder EA, Esser KA. Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *J Biol Rhythms* 2015; 30: 84-94.
  31. Rachek LI, Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014; 121: 267-292.
  32. Kraegen EW, Cooney GJ. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 235-241.
  33. Lindgren O, Mari A, Deacon CF, et al. Differential islet and incretin hormone responses in morning versus afternoon after standardized meal in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2887-2892.
  34. Petrenko V, Dibner C. Circadian orchestration of insulin and glucagon release. *Cell Cycle* 2017; 16:1141-1142.