

# Role of glucocorticoids in the resetting of mammalian circadian clock, its implication with the biological activity of functional food

アディラ, デイリシャット

<https://hdl.handle.net/2324/1785377>

---

出版情報：九州大学, 2016, 博士（創薬科学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名	アディラ ディリシャット (ADILA DILIXIATI)
論 文 名	Role of glucocorticoids in the resetting of mammalian circadian clock, its implication with the biological activity of functional food (時計遺伝子の発現リズム位相変化におけるグルココルチコイドの機能解析および機能性食品による生体リズム同調促進作用に関する研究)
論文調査委員	主 査 九州大学大学院 薬学府 教授 大戸 茂弘 副 査 九州大学大学院 薬学府 教授 小柳 悟 副 査 九州大学大学院 薬学府 准教授 島添 隆雄 副 査 九州大学大学院 薬学府 准教授 松永 直哉

### 論文審査の結果の要旨

睡眠覚醒サイクルやホルモン分泌など我々の身体機能には1日を周期とする概日性リズムが認められる。このようなリズムは外部環境からの時間的な手掛かりのない恒常的な環境下においても観察され、リズム発振の本体(体内時計)は、時計遺伝子によって構成されるフィードバック・ループ機構である。時計遺伝子はほぼ全身の細胞で発現が観察されるが、哺乳類動物における体内時計の中核は視床下部の視交叉上核に位置し、この神経核内における時計遺伝子の発現は、地球の自転に伴う外部環境の明暗周期に同調したリズムを示す。また、視交叉上核から発振されるシグナルによって、神経伝達物質や副腎皮質ホルモンの分泌などに概日リズムが生じ、これらリズムがメディエーターとなって、末梢組織における個々の細胞内の時計遺伝子の発現リズムが同調され、生体機能における様々な概日リズムが形成される。

一方、近年の研究から、様々な食品が生体機能の概日リズムや時計遺伝子の発現に影響を及ぼすことが明らかになってきた。BRAND's Essence of Chicken (BEC) はペプチドやアミノ酸を豊富に含む鶏肉抽出エキスで、疲労回復などに効果があると謳われている。マウスを用いた研究において、BECには外部環境の明暗周期変更時に、時計遺伝子の発現リズムの同調を速める作用があることが示されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

本学位論文の第1章では、体内時計の主要な同調因子である副腎皮質ホルモンに焦点をあて、末梢組織における時計遺伝子の発現リズム位相に及ぼす影響を培養細胞とマウスを用いて検討した。また、第2章では、BECによる体内時計の同調促進効果のメカニズムを解明することを目的として、BEC含有食給餌による副腎皮質ホルモン分泌と活動量の概日リズムに及ぼす影響について検討を行った。

第1章において、はじめに培養細胞を用いた概日リズムの再構築系を用いて検討を行った。Luciferase融合型 PERIOD2 蛋白を発現する Per2::Luc C6 細胞を 100  $\mu$ M Forskolin で 2 時間処理したところ、細胞から発せられる化学発光量には約 24 時間周期のリズムが認められた。この化学発光リズムの位相に及ぼす副腎皮質ホルモンの影響を明らかにするため、1nM Dexamethasone (Dex) を化学発光リズムが上昇する時間帯または下降する時間帯のいずれかに、細胞培養液中に添加し、添加後のリズム位相を観察した。その結果、Dex を化学発光リズムが下降する時間帯に添加した場合、リズムの位相は約 1 時間前進したのに対し、化学発光リズムが上昇する時間帯に添加した場合にはリズムの位相は約 1 時間後退した。このことから、時計遺伝子の発現リズムは副腎皮質ホルモンが作用するタイミングに応じて、その位相が細胞レベルで変化することが明らかになった。次に、同様のリズムの変化が個体レベルでも観察されるかについて、マウスを用いて検討を行った。2 mg/kg Dex を Zeitgeber time (ZT) 2、ZT8、ZT14、ZT20 (明期: ZT0~ZT12) のいずれかに単回皮下投与し、肝臓における時計遺伝子 Per2、Dbp、Rev-erb

$\alpha$  の発現を経時的に測定した。その結果、ZT2 投与時には、いずれの時計遺伝子の発現リズムも位相が前進したが、ZT14 および ZT20 投与時には位相の後退が観察された。一方、ZT8 投与時には位相の変化は認められなかった。このことから、時計遺伝子の発現リズムは個体レベルでも副腎皮質ホルモンの投与タイミングに応じて位相が変化することが明らかになった。

時計遺伝子の発現リズムの変化は、生体機能の概日リズムの変化にも繋がると考えられていることから、副腎皮質ホルモンの投与タイミングに応じてマウス活動量の概日リズム（行動リズム）位相も変化するかについて検討を行った。マウスを恒暗環境下で飼育し、2 mg/kg Dex を Circadian time (CT) 2、CT8、CT14、CT20 (CT12: マウスの活動開始時間) のいずれかに単回皮下投与した。しかしながら、いずれの時刻における Dex 投与においてもマウスの行動リズムの位相に変化は認められなかった。このことから、副腎皮質ホルモンの単回投与による一過性の時計遺伝子の発現リズムの位相変化では、マウスの行動リズムにまでは影響を及ぼさないことが示唆された。

副腎皮質ホルモンは、コレステロールを原材料としてミトコンドリア内膜で生合成されるが、Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) は、コレステロールのミトコンドリア内膜へ運搬を担い、本因子の発現リズムが副腎皮質ホルモンの生合成の概日リズムを形成している。また、StAR の発現リズムは Clock、Bmal1、Per、Cryptochrome (Cry) の各時計遺伝子によっても制御されている。そこで、第2章においては、10%(w/w) BEC 含有食を2週間給餌させたマウスの副腎における時計遺伝子 (Clock、Bmal1、Per2、Cry1、Rev-erb $\alpha$ ) および StAR の発現リズムについて検討を行った。その結果、BEC 含有食給餌によって、いずれの時計遺伝子の発現リズムにも有意な変化は認められなかったが、StAR mRNA の発現はピーク時刻における発現レベルが上昇し、リズムの増幅が観察された。同様の影響は StAR の蛋白の発現リズムにおいても認められ、血漿中 Corticosterone (CORT) 濃度のリズム振幅も有意に増大した。次に、飼育環境の明暗周期を6時間前進または6時間後退させた場合に、新規明暗環境に対するマウスの行動リズムの同調速度を通常食と BEC 含有食を給餌させたマウスにおいて比較した。位相を前進させた場合、通常食給餌マウスの行動リズムは約10日で同調したが、BEC 含有食群では同調期間は有意に短縮し、約8日で同調した。一方、明暗周期を後退させた場合には、通常食および BEC 含有食を給餌させたマウスのいずれにおいても約3日で新規明暗周期環境に同調した。これらの結果を踏まえ、BEC による副腎皮質ホルモンの分泌リズムの増幅と行動リズムの同調速度の上昇との関係を明らかにするため、明暗周期を6時間前進させ、ZT10 に CORT (30 mg/kg) を5日間連日皮下投与した。その結果、CORT の連日投与によって、行動リズム再同調速度の上昇が観察された。以上の結果から、BEC は StAR 遺伝子に作用し、副腎皮質ホルモンの分泌リズムを増幅させることによって、体内時計の再同調機能を活性化させることが示唆された。

副腎皮質ホルモンは、抗炎症、免疫抑制、血糖値上昇、タンパク異化など様々な生理活性を有しているが、これらはいずれも合成薬の薬理学的用量において観察された作用である。一方、生理的レベルでの副腎皮質ホルモンの活性は、これらとは異なる側面があることが指摘されている。これまで、内因性の副腎皮質ホルモンは、視交叉上核から発振されたリズム情報を末梢組織に伝達し、各々の細胞の時計遺伝子の発現リズムを同調させることが示されていたが、本研究によって、同ホルモンには末梢組織における時計遺伝子の発現リズムの位相を変化させる作用があることが明らかになった。また、BEC による体内時計に対する影響は、副腎皮質ホルモンの分泌リズムの増幅によって引き起こされる可能性も示唆された。近年の健康志向の高まりによって、様々な機能性食品が市場に出回っているが、その作用メカニズムが明示されたものは少ない。本研究で示された BEC のように、今後は機能性食品においても作用を示す仕組みを解明していくことが、より安全で有効性の高い機能性食品の市場拡大に繋がると思われる。これらのことから、申請者は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。