

# 物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構の解明と操作要因の開発

九州大学大学院薬学研究科薬剤学

大戸 茂弘

Mammalian circadian pacemaker resides in the paired suprachiasmatic nuclei (SCN) and influences a multitude of biological processes. Clock genes are the genes that control the circadian rhythms in physiology and behavior. Not only disease but also the effectiveness and toxicity of many drugs vary depending on dosing time. Identification of a rhythmic marker for selecting dosing time will lead to improved progress and diffusion of chronotherapy. The mechanisms underlying chronopharmacological findings should be clarified from viewpoint of clock genes. On the other hand, several drugs have an effect on molecular clock. Furthermore, to produce new rhythmicity by manipulating the conditions of living organs appears to lead to the new concept of chronopharmacotherapy. The knowledge of interactions between molecular clock and drug should be very useful for the clinical practice. In the present study, we demonstrated the circadian rhythm of CYP and transporter transcription in mice and in vitro cell culture system. Then we clarified the regulatory mechanisms underlying the rhythmicity of CYP and transporter transcription from viewpoints of molecular clock. Furthermore, we produced new rhythmicity by manipulating the conditions of living organs or culture cell by using rhythmic administration of altered feeding schedules or serum shock. The monitoring of rhythm and manipulation of rhythm from viewpoints of molecular clock are essential to improved progress and diffusion of chronopharmacotherapy. Therefore, we show the regulatory system of biological rhythm from viewpoints of clock genes and the possibility of chronopharmaceutics based on molecular clock.

## 1. 緒言

生体リズムは生物界に広く普遍的に存在する生命現象であり、近年、一連の遺伝子群（時計遺伝子）が約24時間周期で発現の増減を繰り返すことが、リズム発振の中心機構であることが明らかになってきた。哺乳類における生体リズム中枢（体内時計）は視床下部の視交叉上核に位置し、神経の活動やホルモン分泌、免疫機能など多くの生体機能の日周リズムを制御している。哺乳類における生体リズム中枢は、視神経が交差する視交叉上核(SCN; suprachiasmatic nucleus)に位置し、神経伝達物質や液性因子などを介して末梢組織における時計遺伝子の発現リズムを制御している(図1)。概日リズム発振の本体は、CLOCK、BMAL1を初めとする時計遺伝子間で起こる発現の促進、抑制によるフィードバック機構であることが明らかとなっている(図2)。すなわち、CLOCK/BMAL1の複合体がPeriod(Per)およびCryptochrome(Cry)遺伝子の各転写を促進する。産生されたPER、CRYの各蛋白質は複合体を形成し、CLOCK/BMAL1による自らの転写活性を抑制することにより、その遺伝子および蛋白質の発現に日周リズムが生じる。また、これらの時計遺伝子群は他の遺伝子の転写にも

関与しており、その発現をリズムカルに制御している。

一方、薬物の体内動態を規定する吸収・分布・代謝・排泄の各過程に関わる生体機能にも日周リズムが認められる。体内動態を規定する因子の一つであるトランスポーターは、生体内において、医薬品の輸送に関与しており、吸収、分布、排泄の各過程において重要な役割を担っている。小腸は経口投与された薬物の主な吸収部位であり、薬物の体内への移行を制限している。薬物の消化管吸収におけるトランスポーターの役割は大きく、消化管腔からの血中への移行や消化管腔への排出など薬物の膜透過に重要な役割を担っている。近年、マウスの小腸でのmdr1a/abcb1aおよびpepT1/slc15a1の発現は日周リズムを示すことが報告され、薬物の吸収にも影響を及ぼすことが指摘されている。しかしながら、これらトランスポーターの発現に何故日周リズムが生じるのか、その分子機構は解明されていない。一方、代表的な薬物代謝酵素であるP450(CYP)は大部分の医薬品の代謝に関与するため、薬物の体内動態を規定する重要な因子と位置づけられている。中でも、CYP3A4は薬物代謝への寄与が大きいこと、また、肝臓における含有量が最も多いことなどから高い注目を集めてきたが、ヒトにおけるCYP3A4の酵素活性にも日周リズムが認められることが報告された。しかしながら、その酵素活性の日周リズムの制御メカニズムは解明されておらず、CYP3A4の活性リズムと体内時計の分子機構とを結びつける因子の存在についても、何ら明らかにされていない。こうした状況の中で、時計遺伝子の機能と役割が生理学的側面より明らかにされつつあるが、今後の重要な課題として医薬品、化粧品、食品など社会応用があげられる。そこで本研究では、まず



Molecular clock mechanisms of transporter and metabolic enzyme and the manipulation of biological rhythm

Shigehiro Ohdo

Department of Pharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

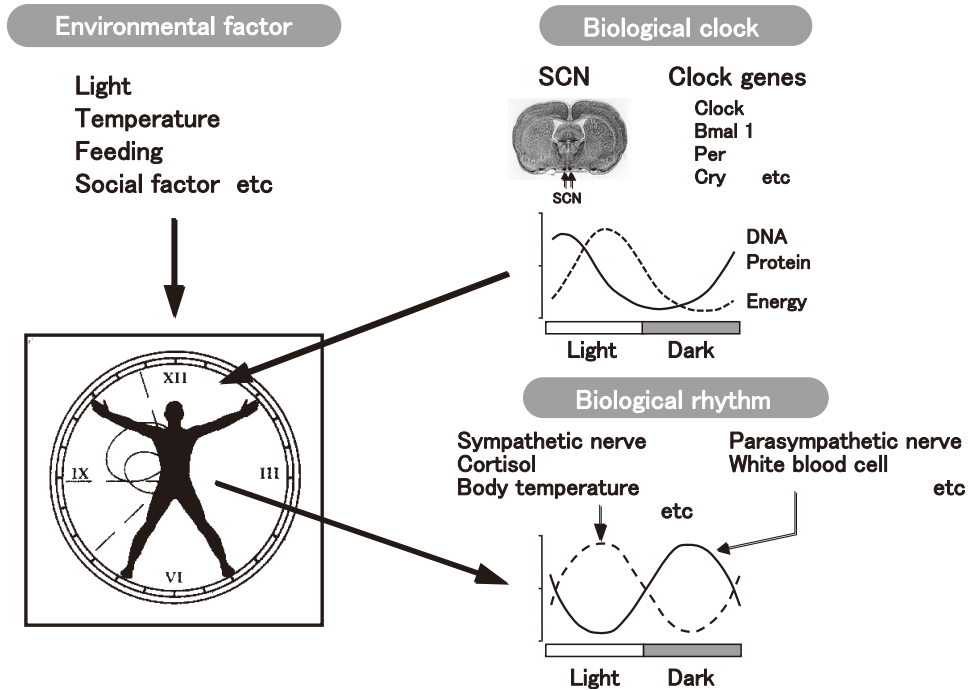


図1 生体リズムの制御図。生体には体内時計が存在し、その本体は視神経が交差する視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus、SCN) に位置し、時計遺伝子により制御されている。この機構により多くの生体機能や疾患症状に24時間周期のリズムが認められる。

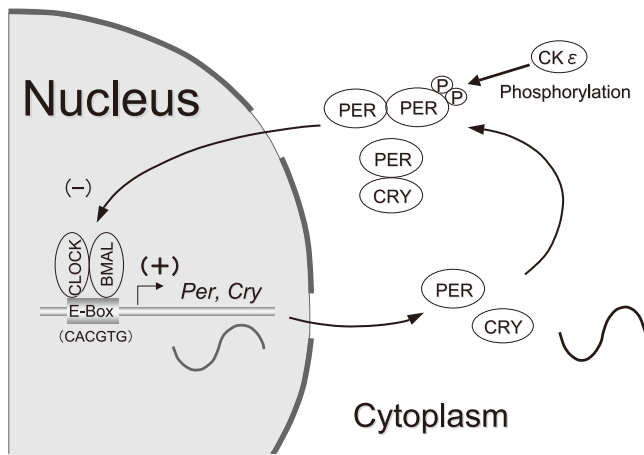


図2 哺乳類における体内時計の分子機構。時計振動遺伝子の転写は負のフィードバック機構で制御されている。例えば、Per 遺伝子の転写はポジティブ因子である CLOCK と BMAL1 のヘテロ二量体が Per 遺伝子上流に存在する E-box 配列 (CACGTG) に結合することによって活性化される。また Per 遺伝子産物がネガティブ因子となり、自らの転写を抑制する。

動物実験系で、物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構を解明する。次に動物実験系および in vitro 細胞培養系で、物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構の操作要因を開発する。なお本研究では、種々の分子について検討したが、mdr1a/abcb1a、CYP3A4、CYP2E1 などを中心に紹介する。

## 2. 実験

自由摂食摂水・明暗周期 (明期 : 07:00 - 19:00) 条件下で飼育した Clock 遺伝子変異マウス (Clk/Clk) および野生型 (Wild-type) マウスを対象に 09:00、13:00、17:00、21:00、01:00、05:00 の 6 時点に種々の細胞を採取した。物質輸送および代謝関連遺伝子および時計遺伝子を含む周期的に変動する遺伝子 mRNA の日周リズムを RT-PCR 法で測定する。物質輸送および代謝関連遺伝子リズムの存在と時計遺伝子リズムとの相互関連を明らかにする。mRNA の定量は、上記 6 時点において、Wild-type および Clk/Clk マウスから小腸を摘出後、DNA を抽出した。GAPDH を内部標準として、Real time RT-PCR 法により Abcb1a mRNA の相対的な発現量を測定した。ルシフェラーゼレポーター解析は、マウス Abcb1a 遺伝子の 5' 上流域を含むルシフェラーゼレポーターベクターを各時計遺伝子の発現ベクターと共に NIH3T3 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトから 24 時間後のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。また、時計遺伝子応答配列を変異させたルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、同様の検討を行った。ゲルシフトアッセイは、マウス Abcb1a 遺伝子 5' 上流域における時計遺伝子応答配列およびその変異配列を含むビオチンラベル化 DNA プローブを合成し、各プローブと in vitro translational system を用いて合成した各転写因子 (HLF、E4BP4) を反応させ、ゲルシフトアッセイ法で各

転写因子の時計遺伝子応答配列への結合能を検討した。Small interfering RNAは、BLOCK-iTTM RNAi Designerを用いて、HLFおよびE4BP4に対するsiRNAを合成し、colon26細胞にトランスフェクトした。細胞を50%血清を含む培地に2時間曝露後、Abcb1a mRNA発現量の経時的变化をReal time RT-PCR法で測定した。ウエスタンブロットリングは、Wild-typeおよびClk/Clkマウスの小腸またはColon26細胞における、HLFおよびE4BP4のタンパク発現をウエスタンブロットリング法で測定した。クロマチン免疫沈降は、Wild-typeおよびClk/Clkマウスから小腸を摘出し、氷冷した1%パラホルムアルデヒド溶液に浸すことでタンパク-DNAのクロスリンクを形成させた。クロスリンクを形成させた小腸の組織片から核タンパクを抽出し、抗HLF抗体および抗E4BP4抗体を用いて、これら各タンパクと結合したDNA断片を免疫沈降法で精製した。各転写因子とDNAとの結合量は、PCR法で定量した。

次に、in vitroで物質輸送および代謝関連遺伝子の日周リズムの制御機構を検証した。数種の細胞を対象に50% horse serumを添加することにより時計遺伝子など周期的変動遺伝子のリズムを形成する。すなわち生体で認められるリズムをin vitroで再現する実験系を構築する。Serum shock後、経時的に細胞を採取する。上記の物質輸送、代謝、薬効関連遺伝子および時計遺伝子を含む周期的に変動する遺伝子のmRNAをRT-PCR法で測定し、物質輸送、代謝および薬効関連遺伝子リズムの存在と時計遺伝子リズムとの相互関連を明らかにする。

生体内環境の操作方法として、in vivoでは摂食条件、in vitroではserum shock、ステロイド shockを用いる。時計遺伝子を含む周期的に変動する遺伝子の中からリズム操作要因を抽出した。上記と同様の手法を用いて、in vivoおよびin vitroで要因の妥当性を検証した。コンフルエント状態のヒト由来肝癌細胞(HepG2)を、高濃度(50%)血清培地に2時間曝露させ、処置後経時的にRNAおよび蛋白を抽出した。RNAはTRIZOL試薬を用いて抽出した。GAPDHを内部標準とし、RT-PCR法により各遺伝子のmRNAの相対的な発現量を測定した。CYP3A4の酵素活性の測定は、P450-Glo™ Glo Assaysを用いて、高濃度血清処理後、経時的にCYP3A4の酵素活性を測定した。ヒトCYP3A4遺伝子の5'上流域の塩基配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、各時計遺伝子の発現ベクターと共に、HepG2細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。

自由摂食群は、自由摂食摂水、明暗周期(明期:07:00-19:00)条件下で2週間飼育した7週齢ICR雄性マウスを使用した。時間制限摂食群は、摂食時間(09:00-17:00)、自由摂水、明暗周期(明期:07:00-19:00)条件下で2週間飼育した7週齢ICR雄性マウスを使用した。タ

ンパク質量測定は、Western blotting法で測定した。mRNA量測定は、RT-PCR法により測定した。ルシフェラーゼ活性測定は、Mouse CYP2E1のpromoter領域を対象にHNF-1 $\alpha$ 及び時計遺伝子による影響を測定した。CYP2E1プロモーターへの転写因子結合測定は、クロマチン免疫沈降法で測定した。CYP2E1プロモーター領域における転写因子の相互作用は、ChIP再免疫沈降法で測定した。

培養細胞はヒト新生児線維芽細胞(NB1RGB)を、 $\alpha$ -MEM培地中、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下で培養した。またヒトケラチノサイト細胞(HaCat)を、DMEM (high glucose)培地、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下で培養した。50%血清刺激による時計遺伝子のリズムを再構築する目的で、NB1RGBを $2 \times 10^5$  cells/wellになるように6 well plateに播種した。播種24時間後に無血清培地に交換し12時間培養した。その後50%血清培地に2時間曝露後、1%血清培地に交換し細胞内時計遺伝子のリズムを再構築した。細胞は、4時間ごと血清刺激後52時間にわたり回収した。mRNA量測定は、real time RT-PCR法およびRT-PCR法により測定した。

統計解析は、独立多群の比較には一元配置分散分析法(One-way ANOVA)およびTukey multiple comparison testを用いた。また、独立2群の比較にはStudent's t-testを用い、5%以下を有意な差とした。

### 3. 結果

Wild-typeマウスの小腸におけるAbcb1a mRNAの発現量は、明期後半から暗期前半にかけて高値を示す有意な日周リズムが認められた(図3)。一方、Clk/Clkマウスの小腸におけるAbcb1a mRNAの発現量には、有意な日周リズムは認められなかった。転写調節領域にE-boxやD-siteを有する遺伝子の多くは、時計遺伝子群によって構成されるフィードバックループ機構によって、その遺伝子発現に日

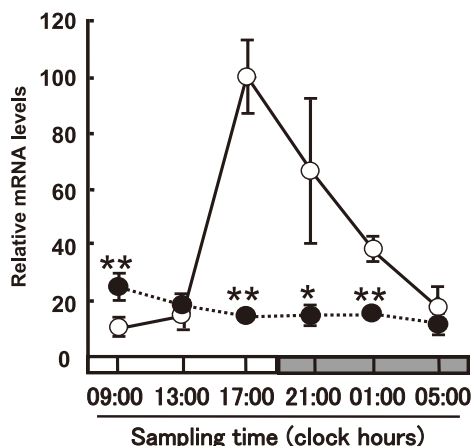


図3 マウス小腸細胞におけるAbcb1a mRNAの日周リズム。野生型マウス(○)のAbcb1a mRNAの発現は日周リズムを示したが、clock変異型マウス(●)のリズムは消失した。(N=3, mean $\pm$ SE, 6時点P<0.01; ANOVA, \*\*P<0.01: Tukey-Kramer's test)



周リズムが生じることが知られている。マウス *Abcb1a* 遺伝子の5'上流域約1,000bp内の塩基配列について解析を行ったところ、E-boxおよびD-siteが数カ所存在することが確認された。そこで、これら塩基配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、その転写活性に及ぼす各時計遺伝子の影響について検討した結果、PAR basic leucine zipper (bZIP) 転写促進因子によって *Abcb1a* の転写活性は上昇し、その転写活性はPAR bZIP 転写因子のリプレッサーであるE4BP4によって抑制された。また、ゲルシフトアッセイによる解析の結果から、これらタンパクは、*Abcb1a* 遺伝子上のD-site 様配列に直接結合することで、その転写活性を制御している可能性が示唆された。また、マウス小腸におけるHLF、E4BP4の蛋白発現量の経時的变化をウエスタンブロットング法で検討した結果、HLFの発現リズムは *Abcb1a* mRNA と同位相を、E4BP4発現リズムは逆位相を示した。さらに、クロマチン免疫沈降による解析の結果、*Abcb1a* mRNA の発現量が低下する時間帯にE4BP4のプロモーター領域への結合量の増加が認められた。これらの結果から、マウス小腸における *Abcb1a* 遺伝子の発現は、HLFとE4BP4の働きによりリズムミカルに制御されていることが示唆された。すなわち、CLOCK、BMAL1、PER、CRYにより構成されるフィードバックループ機構により、HLFおよびE4BP4タンパクの発現にはそれぞれ逆位相の日周リズムが生じる。*Abcb1a* 遺伝子は、これらPAR bZIPタンパクの発現リズムにより、転写の「促進」と「抑制」の切り替え調節を交互に受ける結果、その発現に日周リズムが生じると考えられた。

高濃度血清処理後の HepG2 細胞内における Bmal1、Per2、Dbp および E4bp4 の各時計遺伝子の発現量は経時

的に変化し、それぞれ約24時間周期のリズミカルな変動を示した。また、同一条件下において、CYP3A4 遺伝子の mRNA の発現量およびその酵素活性にもそれぞれ24時間周期の変動が認められ、本酵素活性の日周リズムは転写レベルで制御されている可能性が示唆された(図4)。転写調節領域にE-box(CANGTG)やD-site(TTA[C/T][A/G]TAA)を有する遺伝子の多くは、時計遺伝子群によって構成されるフィードバックループ機構によって、その遺伝子発現に日周リズムが生じることが知られている。ヒトCYP3A4遺伝子の5'上流域約1,800bp内の塩基配列について解析したところ、E-boxおよびD-siteが数カ所存在することが確認された。そこで、これら塩基配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、その転写活性に及ぼす各時計遺伝子の影響について検討した結果、CYP3A4遺伝子の転写活性リズムはDBPおよびE4BP4の各時計遺伝子により、制御されていることが明らかになった。また、この転写活性の調節には5'上流域-45~-38bp内に存在するD-site配列が重要な役割を担っている可能性が示唆された。同様の所見は、高濃度血清処理した培養 colon26 細胞においても、*Abcb1a* mRNA の発現量に約24時間周期のリズミカルな変動が認められた。すなわち、高濃度血清処理した培養 colon26 細胞においても、*Abcb1a* mRNA の発現量には約24時間周期のリズミカルな変動が認められた。しかしながら、siRNA法によってHLFまたはE4BP4の各タンパクの発現を抑制した細胞では *Abcb1a* mRNA の発現リズムは観察されず、本遺伝子の発現リズムの形成にHLFとE4BP4とが関与していることが示唆された。

マウスの肝臓において、CYP2E1活性およびmRNA発現量に日周リズムが認められた(図5)。その機序としHNF-1 $\alpha$ が転写促進因子として作用し、時計遺伝子(CRY1)

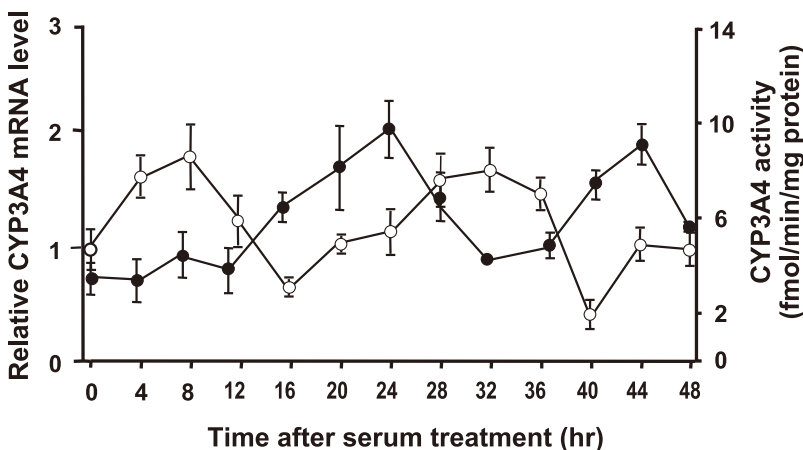


図4 高濃度血清刺激後の HepG2 細胞における CYP3A4 の mRNA (○) および酵素活性 (●) のリズム。(N=3, mean±SE, P<0.01; ANOVA)

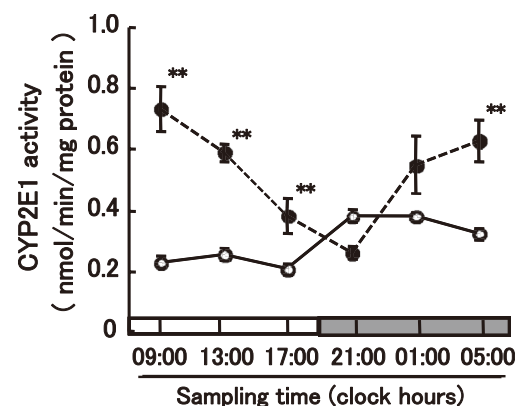


図5 マウス肝臓における CYP2E1 mRNA の日周リズムに及ぼす摂食条件の影響。自由摂食時 (○) に認められる CYP2E1 mRNA の日周リズムは、時間制限摂食 (●) によりリズムの位相が大きくシフトした。(N=10, mean±SE, 6時点 P<0.01; ANOVA, \*\*P<0.01: Tukey-Kramer's test)

が転写抑制因子として作用していることが示唆された。これらのリズムは、時間制限摂食でも認められたが、互いにはほぼ逆位相を示した。

50%血清刺激後のヒト新生児線維芽細胞およびヒトケラチノサイト細胞における時計遺伝子のmRNA発現リズムを測定した結果、約24時間を周期とするリズムカルな発現変動を示すことが明らかとなった(図6)。また酵素やトランスポーターにも約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められ、時計遺伝子の発現リズムとの関連が示唆された。以上の結果より、50%血清刺激後の1%血清培地存在下で培養した細胞においては、細胞内の時計遺伝子リズムの再構築に成功した。他の酵素およびトランスポーターについても同様の所見が認められた。

#### 4. 考察

本研究ではマウスを対象に、CYPやトランスポーターに日周リズムが存在することを明らかにした。その機序として時計遺伝子が関与していることを明らかにした。またClock遺伝子の変異マウスにおいてはそれら各遺伝子の発現リズムが消失することを見出した。マイクロアレイを用いた解析結果などからPAR bZIP 転写因子は、薬物動態に関与する多くの遺伝子の発現制御に関与していることが指摘されていたが、本研究における解析の結果から、それら転写制御因子によるCYPやトランスポーターの遺伝子の発現リズム制御メカニズムが明らかになった。例えば、マウス小腸におけるAbcb1a 遺伝子の発現は、HLFとE4BP4の働きによってリズムカルに制御されていることを明らかにした。現在までに、投薬時刻によって体内動態に変化が生じる薬物が複数知られているが、その中には今回検証したCYPやトランスポーターの基質となるものも

含まれている。本研究で明らかになったCYPやトランスポーター発現リズムの制御メカニズムは、投薬時刻の違いによる体内動態の変動の原因の理解のみならず、それら薬物の至適投薬タイミングを設定する上で重要な知見となりうると思われる。

次に、本研究では、ヒト培養細胞を用いた生体リズムの再構築を試み、CYPやトランスポーターのリズムの調節メカニズムを解明することに成功した。例えば、ヒトCYP3A4の活性リズムは転写レベルで制御され、その遺伝子発現はD-siteを介して時計遺伝子であるDBPとE4BP4とによってリズムカルに制御されていることが明らかになった。これらの結果から、CYP3A4の基質薬物を用いて治療を行う際には、体内時計の分子機構に基づいた至適投薬タイミングを設定することで、より効率的な治療が可能になることが示唆された。また、本研究で構築されたヒト培養細胞でのリズム評価系は、これまで困難であったヒトにおける生体リズム研究の分子レベルでの進展にも寄与できるものと考えられた。さらに、摂食条件を操作することにより、CYPやトランスポーターの日周リズムをコントロールできる可能性が示唆された。同様に、皮膚培養細胞を用いた検討においても時計遺伝子の発現に約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められた。また酵素やトランスポーターの発現にも約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められた。これらのことから、皮膚細胞においても高血清処理により生体リズムを再現し、リズムを操作できることが明らかとなった。

本研究により、体内時計の分子機構の所見を効率よく化粧品品の適正使用に応用するためのリズム診断法、リズム操作法を開発できる可能性が示唆された。また生命体がうまく機能していくうえで最重要と考えられている「生体のホメオスタシス機構の維持」に大きく貢献できるものと考えられる。

#### 5. 謝辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団の研究助成により行われました。心より感謝申し上げます。また研究の進展にご協力を頂きました共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

#### (文献)

- 1) Ohdo S: Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 859-875, 2010.
- 2) Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N: Chrono-drug-delivery focused on biological clock: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 885-897, 2010.

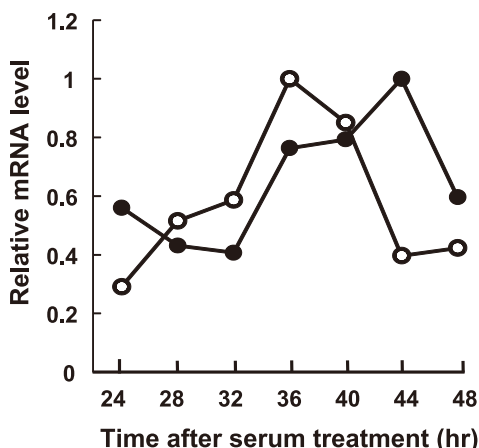


図6 高濃度血清刺激後のヒト新生児線維芽細胞 (NB1RGB) における時計遺伝子 (○; hBmal1, ●; hPer1) のmRNAの発現リズム。(N=3、mean、P<0.01;ANOVA)