

低分子化合物による体内時計システムの調整とその生活習慣病治療・改善薬開発への *in vivo* アプローチ

榛葉 繁紀

(日本大学薬学部)

【目的】核内受容体 REV-ERB α は、体内時計活性を転写レベルにおいて制御する転写抑制因子である。本研究では、REV-ERB α の合成リガンド SR9011 を用いて、生理活性物質ならびに遺伝子発現量の日内変動の調節を試みるとともに生活習慣病治療・改善薬としての可能性を個体レベルで検討した。

【方法】雄性 C57BL/6J マウス（6週齢）に対して1日2回、5日間投与し、血液生化学的検査、各組織の病理学的変化ならびに遺伝子発現の変化を解析した。

【役割分担】総括：榛葉、SR9011 の合成：内山、中枢神経系における解析：小菅、末梢組織ならびに培養細胞における解析：和田

【結果】SR9011 投与マウスにおける各組織の病理組織片を解析した結果、精巣上体脂肪組織ならびに皮下脂肪組織において細胞面積の減少が観察された。脂肪組織の変化は生活習慣病の病態と大きく関連することから、以後の検討は脂肪組織を中心に解析した。脂肪組織から分泌される生理活性物質として食欲調節に関わるレプチンが知られている。またレプチンの血中濃度ならびに遺伝子発現量は日内変動を示すことから体内時計システムによる制御が示唆されている。そこでレプチン量に対する SR9011 投与の影響を検討した。コントロールマウス皮下脂肪組織におけるレプチンの遺伝子発現量は、Zeitgeber time (ZT) 4 から上昇し、ZT10 にピークを迎えるが、SR9011 投与マウスにおいては、ZT10 における遺伝子発現量の増加は認められず、日内変動の消失が示された。また、SR9011 投与マウスにおける血中レプチン量は、コントロールマウスと比較して ZT 4 において有意な低下が認められ、さらに ZT 10 でも低下傾向が認められた。一方でこの差異は ZT16 において消失した。すなわち SR9011 は ZT4 ならびに 10 におけるレプチン量の増加を抑制することが示された。レプチンは主に中枢の視床下部に作用して摂食を制御するが、SR9011 投与マウスの視床下部において摂食抑制生理活性物質である POMC 量の低下が認められた。この結果は、食欲抑制作用を持つレプチン量の低下と一致している。Rev-erba の発現量は、ZT4 から ZT10 にかけて高く、ZT16 に減少するが、この変化は、SR9011 投与のレプチン量に対する影響の強さと一致しており、SR9011 の作用が REV-ERB α を介していることを示唆している。

次に、3T3-L1 脂肪細胞に SR9011 を処理し、レプチン遺伝子の発現量を測定したところ、SR9011 処理によりレプチン遺伝子の発現量に有意な低下が認められた。この結果はマ

ウスを用いた検討結果と一致しており、**REV-ERBs** は脂肪細胞でレプチン遺伝子の発現を転写レベルで調節していることが示唆される。さらに、**3T3-L1** 脂肪細胞および **HEK293** 細胞を用いて、レプチンプロモーター活性に対する **REV-ERBs** および **SR9011** の影響を検討した。**3T3-L1** 細胞において **SR9011** の処理時間依存的なレプチンプロモーターの活性抑制が示された。また、**HEK293** 細胞では **SR9011** は **REV-ERBa** 依存的にレプチンプロモーターの活性を抑制することが示された。さらに **RORE** 配列に変異を入れたレプチンプロモーターをトランスフェクションし、**SR9011** で処理後、プロモーター活性を測定した。その結果、**RORE(-986~-968)**に変異をいれたレプチンプロモーターは、**REV-ERBa** の過剰発現ならびに **SR9011** 処理による活性低下を示さなかった。このことから、レプチン遺伝子が **REV-ERBa** の新規標的遺伝子であることが示唆された。

【総括】本研究により食欲ならびに自律神経活性の調節に携わる生理活性物質レプチンが、体内時計抑制因子である **REV-ERBa** の制御下に有ることが明らかとなった。したがって体内時計の変調が過食を誘発する可能性が示唆された。今後、**REV-ERBa** のアンタゴニストの開発を進めることにより生活時間の乱れによる肥満とそれに起因した生活習慣病発症の予防ならびに改善が期待できる。