

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 ZHANG Manhui
論文題目 Study on biological clocks that underly various diseases
(様々な病気をもたらす生物時計に関する研究)

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	吉村崇
委 員	名古屋大学教授	山本直之
委 員	名古屋大学教授	大蔵聡
委 員	名古屋大学准教授	大川妙子
委 員	名古屋大学助教	塚田光

論文審査の結果の要旨

ZHANG Manhui は、概日時計を制御する分子の探索を目的として、既存薬再開発(drug repositioning)のアプローチから、漢方薬の生薬ライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、概日時計の周期と位相を制御する生薬を発見した。さらに概日時計の制御に AKT 情報伝達系が関与していること明らかにした。以下にその要旨を記載する。

概日時計は地球上のほぼすべての生物に備わる約 24 時間周期の内因性の計時機構である。概日時計は、睡眠・覚醒、代謝、ホルモン分泌など、様々な生理機能や行動のリズム性を制御している。哺乳類の概日時計の中樞は視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nucleus: SCN)に存在する。近年の研究によって、概日時計は中樞の SCN だけでなく、末梢組織を含むほとんどの組織や細胞に存在することが明らかになった。すなわち、概日時計を理解するには、SCN だけでなく、末梢組織由来の細胞もモデルとなりうることを示されたのである。

過去数十年の研究により、概日時計は「時計遺伝子」と呼ばれる一連の遺伝子の転写翻訳のフィードバックループによって制御されることが明らかになってきた。コアループを構成する CLOCK と BMAL1 タンパク質は転写因子として *PERIOD* (*PER*), *CRYPTOCHROME* (*CRY*) 遺伝子の発現を誘導する。細胞質に蓄積した *PER*, *CRY* タンパク質は核に移行し、自らの転写を抑制する負のフィードバックループを構成している。そのため、*BMAL1* 遺伝子や *PER* 遺伝子のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子などの発光レポーターを組み込むことで、概日リズムをリアルタイムモニタリングできるのである。

高度に文明化された現代社会では夜間も光があふれており、スマートフォンやパソコン、テレビなどのデバイスによって、睡眠時間が短くなっている。また最近の研究から、交代制勤務や国際線のキャビンアテンダントなどで、概日時計が慢性的に狂うと、心疾患、脳血管疾患、代謝疾患、免疫機能、がんなど、様々な病気のリスクが高まることが明らかになってきた。そのため、概日時計を調節する分子を開発することで、様々な病気を治療したり、未然に防いだりできるのではないかと期待されている。

創薬の分野では新薬の開発に膨大なお金と時間がかかるにも関わらず、新薬開発の成功率は著しく低下している。そのため、既存薬に新たな薬効を見出す既存薬再開発のアプローチが注目されている。既存薬再開発では、多くの場合、安全性が既に確認されており、化合物のターゲットも既知である。そのため、安い価格で、短時間で薬を開発でき、なおかつ、失敗のリスクが少ないというメリットがある。

漢方は中国を起源とする日本の伝統医薬であり、1400 年以上かけて日本の風土や気候、日本人の体質に合わせて独自の進化を遂げてきた。漢方薬を構成する原料の生薬は、植物の葉、茎、根などを加工したものであり、様々な疾患に処方されて

論文審査の結果の要旨

きた。生薬は長年ヒトに処方されていることから、安全性が確認されている。また様々な化合物を含むため、新薬の開発に優れた素材を提供する。そのため、本研究では漢方薬に由来する生薬成分を使って概日時計を制御する分子を探索することにした。

まず *BMAL1* 遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだ *BMAL1-dLuc* レポーター遺伝子を安定発現するヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞を用いて 137 個の生薬成分をスクリーニングした。その結果、137 個の生薬のうち、17 個の生薬成分が概日リズムの周期や位相に影響を及ぼすことが明らかになり、生薬全体の 12% が概日リズムに影響を及ぼした。これらの効果については容量依存性も確認している。

見出した生薬成分の効果は細胞の種類やレポーター遺伝子に特異的である可能性が考えられた。この可能性を検討するために、代表的なヒット生薬である茵陈蒿（インチンコウ： *Artemisiae Capillaris Flos*）、蘇葉（ソヨウ： *Perillae Herba*）、薤白（ガイハク： *Allii Chinense Bulbus*）について、*Per2-dLuc* を安定発現する Rat-1 繊維芽細胞においても概日リズムに及ぼす効果を確認した。

漢方薬や生薬は様々な活性を持つ複数の化合物を含んでいる。そのため、生薬に含まれる代表的な構成成分についても効果を検討することにした。その結果、多くの構成成分について概日リズムへの効果が確認されたが、その効果はもとの生薬よりも小さかった。

次に活性を示した構成成分について、文献をもとに既存のターゲットタンパク質を探索したところ、セリン/スレオニンキナーゼである AKT とそれに関連する情報伝達系がターゲットとなっている可能性が明らかになった。Akt 情報伝達系と概日リズムの関係についてはショウジョウバエにおいて報告がある。しかし哺乳類には AKT1, AKT2, AKT3 の三つのアイソフォームがあることもあり、*AKT1* ノックアウトマウスの表現型においては、概日リズムに及ぼす異常は報告されておらず、哺乳類の概日リズムに及ぼす影響は不明であった。そこで哺乳類の概日時計機構に AKT 情報伝達系が関与するか否かを明らかにすることを目的として、AKT の活性化剤 SC79 と阻害剤の A-443654 の効果を U2OS 細胞で検討した。その結果、活性化剤の SC79 は概日時計の周期を短縮したのに対して、阻害剤の A-443654 は概日時計の周期を延長することが明らかになった。

そこでさらに *AKT1*, *AKT2*, *AKT3* の三つの遺伝子が概日リズムの制御に関与しているか否かを明らかにすることを目的として、siRNA を用いて *AKT1*, *AKT2*, *AKT3* をそれぞれノックダウンした。その結果、*AKT1*, *AKT2*, *AKT3* の三つを同時にノックダウンすると、概日リズムの周期が有意に短縮されることが明らかになった。以上の結果から、AKT 情報伝達系が哺乳類の概日時計の制御に関与することが

論文審査の結果の要旨

明らかになった。

概日時計の慢性的な不調が様々な病気のリスクを高めることから、概日リズムを制御する薬の開発が求められている。ZHANG Manhui は漢方の生薬ライブラリーから哺乳類の概日リズムを制御する生薬とその構成成分を明らかにした。また、既存薬再開発のアプローチから哺乳類の概日時計の制御に AKT 情報伝達系が関与していることを明らかにした。

したがって、本委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。