



令和5年3月28日

スダチ特有のポリフェノール「スダチチン」が体内時計のリズムを調整  
－肝臓の時計遺伝子を変動、脂肪の蓄積を抑える－

(報道概要)

徳島大学大学院医歯薬学研究部・予防環境栄養学分野の馬渡一諭講師と高橋章教授ら4人、テキサス大学ヒューストン校のZheng Chen博士とSeung-Hee Yoo博士ら5人、京都府立医科大学統合生理学部門の小池宣也講師と八木田和弘教授、池田薬草株式会社と徳島県立工業技術センターの共同研究グループは、スダチ果皮特有のポリフェノール「スダチチン」が体内時計のリズムを調整することを、ヒトやマウス由来培養細胞を用いて確認しました。さらに、スダチチンを食事誘導性肥満マウスに長期投与すると、肝臓の時計遺伝子を変動し、肝臓の脂肪蓄積が抑制することを明らかにしました。スダチまたはスダチ由来の成分の肝臓への効果としては、初の知見となります。この成果は3月17日に学術雑誌 *Molecular Nutrition & Food Research* に正式版がオンライン掲載されました。

【研究グループ】

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野

馬渡一諭 講師、上番増喬 助教、高橋章 教授

下畑隆明 助教（現・福井県立大学海洋資源学部准教授）

テキサス大学ヒューストン校ヘルスサイエンスセンター

Dr. Zheng Chen, Dr. Seung-Hee Yoo, Dr. Kazunari Nohara

Dr. Mark J Burish, Dr. Marvin Wirianto.

京都府立医科大学 大学院医学研究科 統合生理学部門

小池宣也 講師、八木田和弘 教授

池田薬草株式会社

敷島康普 取締役、三浦宏之 代表取締役

徳島県立工業技術センター

新居佳孝 課長

【学術誌への掲載状況】

『The polymethoxyflavone Sudachitin modulates the circadian clock and improves liver physiology』

Kazuaki Mawatari\*, Nobuya Koike, Kazunari Nohara, Marvin Wirianto, Takashi Uebanso, Takaaki Shimohata, Yasuhiro Shikishima, Hiroyuki Miura, Yoshitaka Nii, Mark J. Burish, Kazuhiro Yagita, Akira Takahashi, Seung-Hee Yoo, Zheng Chen\*.  
*Molecular Nutrition & Food Research* (2023年3月17日正式版オンライン掲載)

<https://doi.org/10.1002/mnfr.202200270>

\*Corresponding authors (責任著者)



## 【本研究の背景】

概日リズム（サーカディアンリズム）は睡眠、血圧、体温、代謝などの生理活動にみられる約24時間周期のリズムで、体内時計によって外部環境に適応しながら維持されています。体内時計と1日の生活リズムが同調することは、心身の健康維持に重要です。この概日リズムの乱れが睡眠障害、精神、循環器疾患、糖尿病などの深刻な健康被害と関連しています（図1）。網膜に投入される光や規則正しい食事の時間は、概日リズムを正常に維持する主要な外的因子です。しかし、近年の社会を取り巻く状況（シフトワーカー・夜間勤務の増加、リモートワークの増加、スマートフォン・タブレット端末などの長時間・夜間使用など）は概日リズムの乱れを助長する大きな要因となっています。

現在の概日リズムの乱れに関連した概日リズム攪乱関連疾患への対処法・改善法は、生活習慣の改善や薬物療法、高照度光療法などがあります。ヒトへより安全・安心な介入方法を考えると、食事や食物由来の成分を用いた栄養学的介入は概日リズム攪乱関連疾患の予防や改善に向けた1つ方法であると考えました。

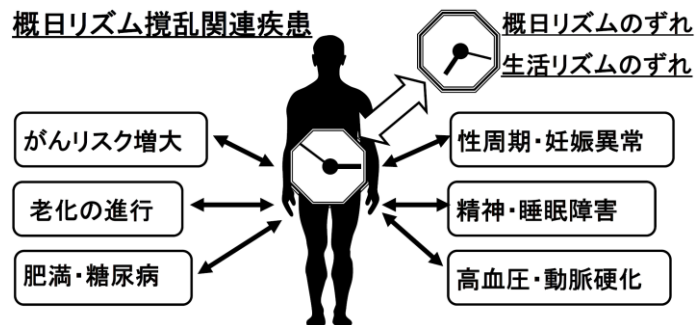


図1. 概日リズム攪乱関連疾患

近年、テキサス大学ヒューストン校ヘルスサイエンスセンターの Dr. Zheng Chen らの研究グループは、シークワサーなどの柑橘類果皮に含まれるポリメトキシフラボン（ポリフェノールの1種）のノビレチン（Nobiletin）が概日リズムを調整する作用を有することを報告してきました [He B, et al. *Cell Metab* (2016)、Nohara K, et al. *Nat Commun* (2019)]。そこで、本研究ではスダチ果皮特有のポリメトキシフラボン、スダチチン（Sudachitin）に着目しました。これまでに、スダチチンの生理活性を報告した論文がいくつかありますが、概日リズムへの作用の詳細は不明でした。また、経口投与したスダチチンがどの組織に主に作用するかは不明でした。そこで本研究では、（1）サーカディアンリズム評価培養細胞を用いて、スダチチンが概日リズムの調節に作用するかを評価する、（2）スダチチンを経口投与したマウスの血中及び組織中のスダチチン濃度を測定し、スダチチンの標的組織を明らかにする、（3）食事誘導性肥満マウスに高純度スダチチンを経口投与し、概日リズムや代謝への影響を評価することを目的としました。

## 本研究の概要

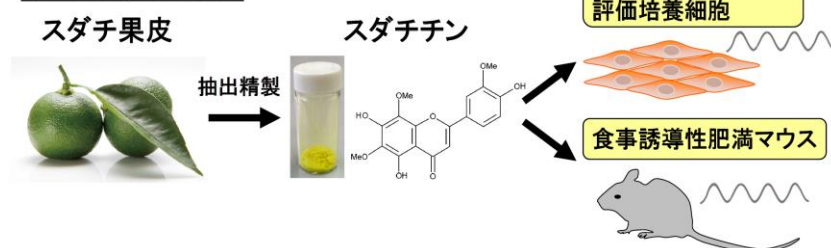


図2. 本研究の概要

## 【結果の概要】

まず、時計遺伝子 *Bmal1* プロモーターにホタルのルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーターを導入したサーカディアンリズム評価培養細胞 (*Bmal1-luc* U2OS 細胞) を用いて、スタチチン添加が概日リズムの調節に作用するか評価しました (図3)。培養細胞実験用のスタチチン (Cell biology grade) は試薬メーカーより購入しました。長時間発光測定装置 (Actimetrics LumiCycle-32) を用いて *Bmal1* の転写活性を測定すると、濃度 1  $\mu\text{M}$  以上のスタチチン添加で *Bmal1* 遺伝子の転写リズムの振幅 (Amplitude) が濃度依存的に有意に上昇しました (図3)。実際、スタチチン添加による時計遺伝子 *Bmal1* や *Per2* の mRNA やタンパク質の発現量の変化が RT-qPCR 法とウエスタンブロット法で観察されました。よって、スタチチンは細胞レベルで概日リズムを調整する活性を有していることがわかりました。

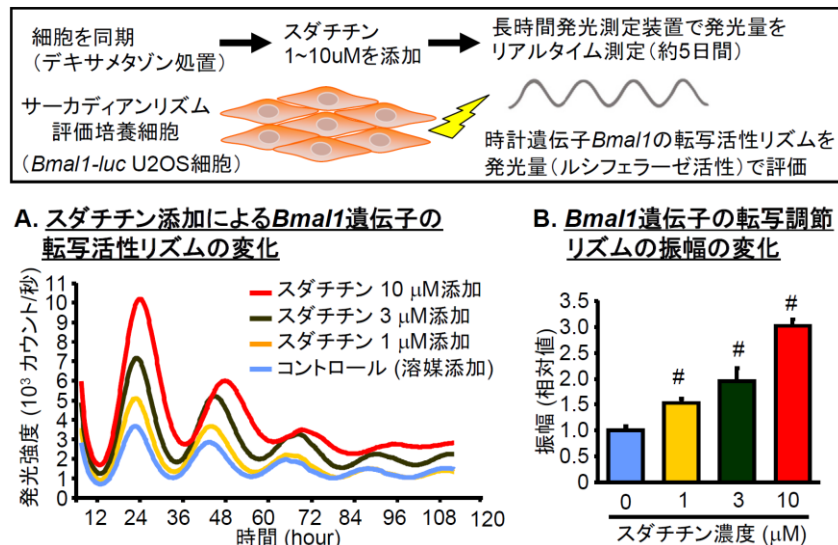
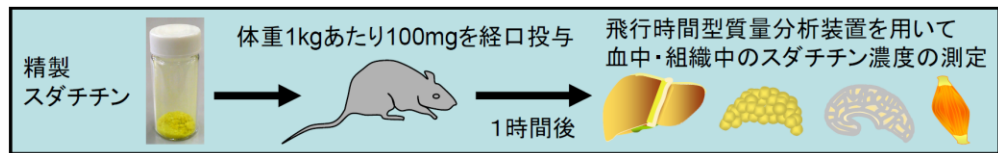


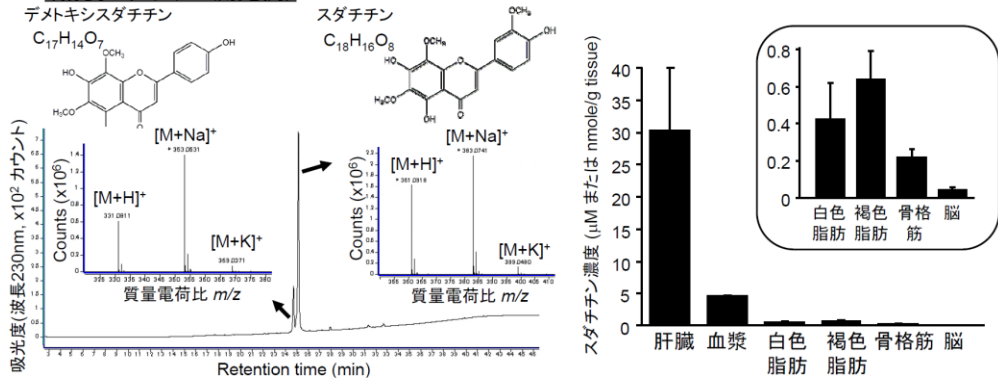
図3. サーカディアンリズム評価培養細胞 (*Bmal1-luc* U2OS 細胞) へのスタチチン添加による時計遺伝子 *Bmal1* の発現変動. (A) スタチチン添加による *Bmal1* 遺伝子の転写リズムの変化. (B) *Bmal1* 遺伝子の転写リズムの振幅変化. # $p < 0.05$  vs. コントロール群.

次に、スタチチン投与が個体レベルの概日リズムを調整可能か、評価を行うことにしました。しかし、精製したスタチチンを大量に準備する必要がありました。そこで、スタチチン果皮より効率よくスタチチンを抽出・精製する技術を確認していた池田薬草株式会社と徳島県立工業技術センターに支援を頂き、長期間実験動物に投与可能な量の精製スタチチンを確保しました (図4A)。

しかし、経口投与したスタチチンが体内に吸収され、どの組織に分布されるか、これまで全くわかっていませんでした。そこで、8週齢のオス C57BL/6 マウスに体重 1kg あたり 100mg の精製スタチチンを投与後の血中濃度と各組織中の濃度を、液体クロマトグラフィー・飛行時間型質量分析装置 (Agilent technologies LC-TOFMS system 6200) を用いて測定しました (図4)。すると、スタチチンの濃度は血中・組織中ともに投与後 1 時間後が最も高く、血中では約 4.5  $\mu\text{M}$  でした (図4B)。組織中では肝臓での濃度が最も高く、組織 1g あたりのスタチチン量は 30 nmol でした (図4B)。以上の結果より、スタチチンは肝臓に最も作用する可能性が考えられました。また、マウスの体重 1kg あたり 100mg の精製スタチチンの経口投与は、血中や肝臓中で作用するには十分な投与量であることがわかりました。



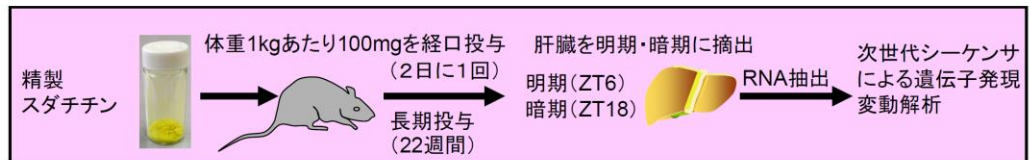
**A. 飛行時間型質量分析装置を用いたスタチン測定 (精製スタチン測定例)**      **B. 血中および組織中のスタチン濃度**



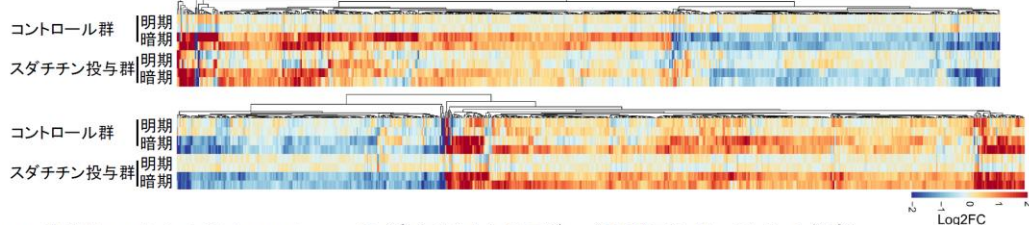
**図4. スタチン経口投与後の血中および組織中濃度の測定** (A) 液体クロマトグラフィー・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOFMS) を用いた動物実験用スタチンの精製度の評価. 横軸は Retention time (分), 縦軸は紫外線検出器 (波長 230nm) の検出強度を示す. 中央小図は検出された主な2つのピークの Mass spectrum を示す. (B) 投与後1時間の血中および組織中のスタチン濃度.

次に、スタチンの長期投与の効果を評価しました。今回は、組織中濃度が最も高かった肝臓へ影響に注目しました。食事誘導性肥満マウスは概日リズムが不良になることが知られています[He B, *et al. Cell Metab* (2016)]。そこで、45%高脂肪食 (カロリー%) により肥満を誘導したマウスに体重 1kg あたり 100mg の精製スタチンを 1 日おきに経口投与しました。22 週間投与後に肝臓を明期 (ZT6) と暗期 (ZT18) にそれぞれに摘出し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析 (網羅的な遺伝子発現解析) を行いました。明期と暗期との間で有意な発現変動がみられた遺伝子数は、コントロール群で 632、スタチン投与群で 651 でしたが、そのうち 2 群で共通した遺伝子は 243 であり (図 5 A-B)、明暗変動する遺伝子群が、スタチンの長期投与によって変化することが示唆されました。さらに、遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析を行うと、スタチン投与群で変動した遺伝子には、概日リズムや脂質代謝に関連する遺伝子が多く含まれていました (図 5 C)。以上の結果より、スタチンの長期投与は肝臓の概日リズムと脂質代謝を調節する可能性が考えられました。

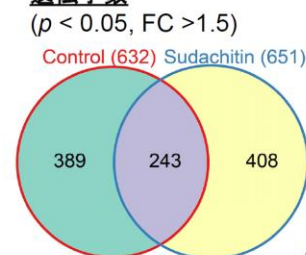




### A. 明期 (ZT6) と暗期 (ZT18) で有意に発現変動がみられた遺伝子のヒートマップ



### B. 明期 (ZT6) と暗期 (ZT18) で有意に発現変動のあった遺伝子数



### C. 遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析

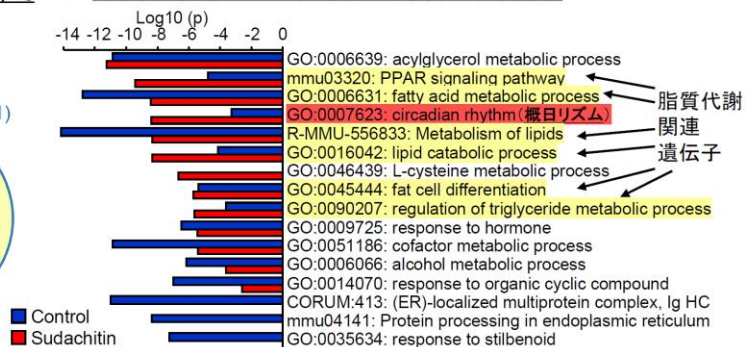
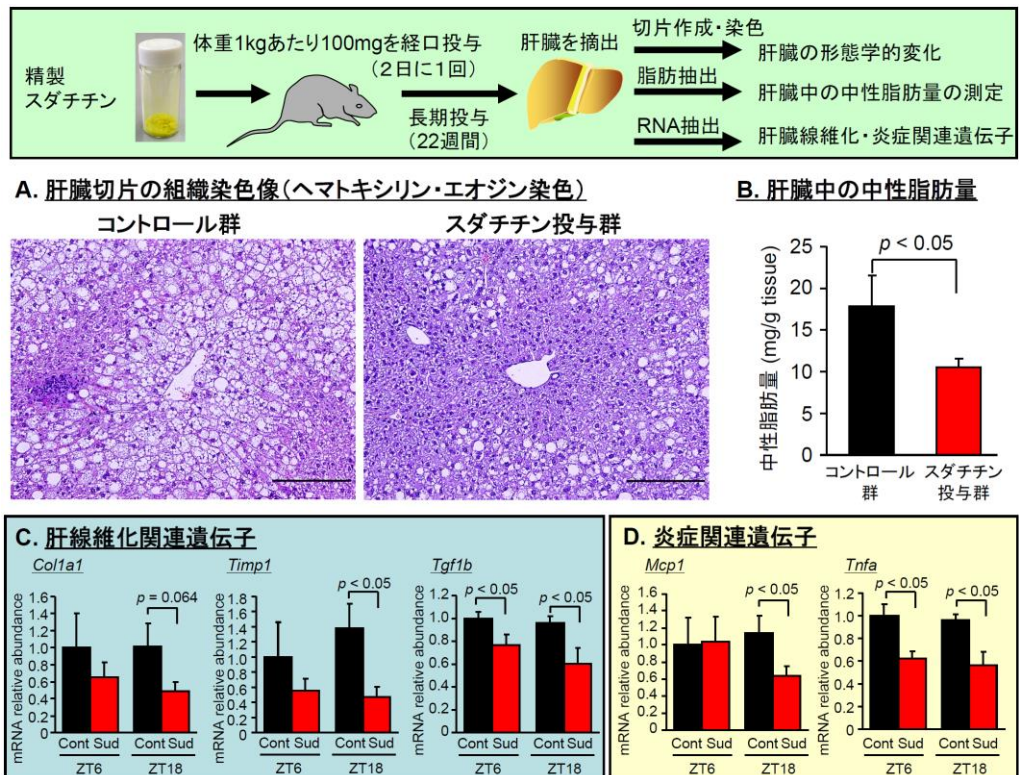


図5. トランスクリプトーム解析によるスタチチン経口投与による食事誘導性肥満マウスの肝臓への効果 (A) 明期と暗期で有意に発現変動がみられた遺伝子のヒートマップ. (B) 明期と暗期で有意に発現変動がみられたコントロール群とスタチチン投与群それぞれの遺伝子数とベン図. (C) 遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析.

これまでに、肝臓の末梢時計 (末梢組織の体内時計) は、肝臓での脂質代謝や脂肪蓄積などに重要な役割を果たしていることが報告されていました [Koronowski KB, *et al. Cell* (2019)]. そこで、スタチチンの長期投与による肝臓の中性脂肪の蓄積量や線維化・炎症への影響を評価しました (図6)。まず、肝臓の組織切片の染色像では、コントロール群に比べて、スタチチン投与群で脂肪の蓄積が顕著に減少していました (図6A)。さらに、肝臓中の中性脂肪量や線維化や炎症に関連する遺伝子の発現量も、スタチチン投与群で有意に減少していました (図6B-D)。以上の結果より、食事誘導性肥満マウスへのスタチチンの長期投与は、肝臓の中性脂肪の蓄積を抑制し、さらに、線維化と炎症を低減することがわかりました。



**図6. スダチチン経口投与による食事誘導性肥満マウスの肝臓への効果**  
 (A) 肝臓切片のヘマトキシリン・エオジン染色像. Scale bar = 0.2 mm. (B) 肝臓中の中性脂肪量. (C-D) 肝線維化関連遺伝子と炎症関連遺伝子の mRNA 発現量.

### 【今後の展望（研究者からのコメント）】

スダチチンはスダチ果皮特有のフラボノイドです。非可食部であるスダチ搾汁後の果皮の有効活用の点で、徳島県内のスダチ生産農家や加工事業者などから注目されている成分です。これまでに様々な生理活性が報告されてきました。本研究では、日本学術振興会・科学研究費助成事業（科研費）国際共同研究加速基金の支援により、時間生物学の専門家、テキサス大学ヒューストン校ヘルスサイエンスセンターの Dr. Zheng Chen と Dr. Seung-Hee Yoo のもとで研究を進めることができ、スダチチンが概日リズムを調整する活性を有することが明らかになりました。

また、スダチチンが吸収されて血中に移行するか、また、スダチチンの標的となる組織がどこかは不明なままでした。本研究では飛行時間型質量分析装置を用いることで、経口投与したスダチチンの体内での動態を明らかにしました。特に経口投与したスダチチンの濃度が高かった肝臓は、脂肪が蓄積し線維化や炎症が進行すると、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) や非アルコール性肝炎 (NASH) になります。本研究結果より、スダチチンの長期投与は NAFLD や NASH への進行を抑える効果が期待できると思われます。しかし、ヒトへの応用を考えると、まだ多くの課題があります。近年の研究では、食事や薬剤、さらにはワクチン接種の効果は、それらの摂食・投薬・接種するタイミングが重要であることがわかってきました。つまり、これらは概日リズムと深く関連しており、スダチチン投与の効果にも昼夜差がある可能性が考えられます。今後、ヒトへ応用するには解決すべき課題の1つであると考えています。

概日リズムは様々な疾患に関連していることがわかっています（図1）。スダチ

チンが脂質代謝の改善に加えて、がんや感染症など、他の疾患の予防や改善にも効果があるのか、今後も探求していきたいと考えています。

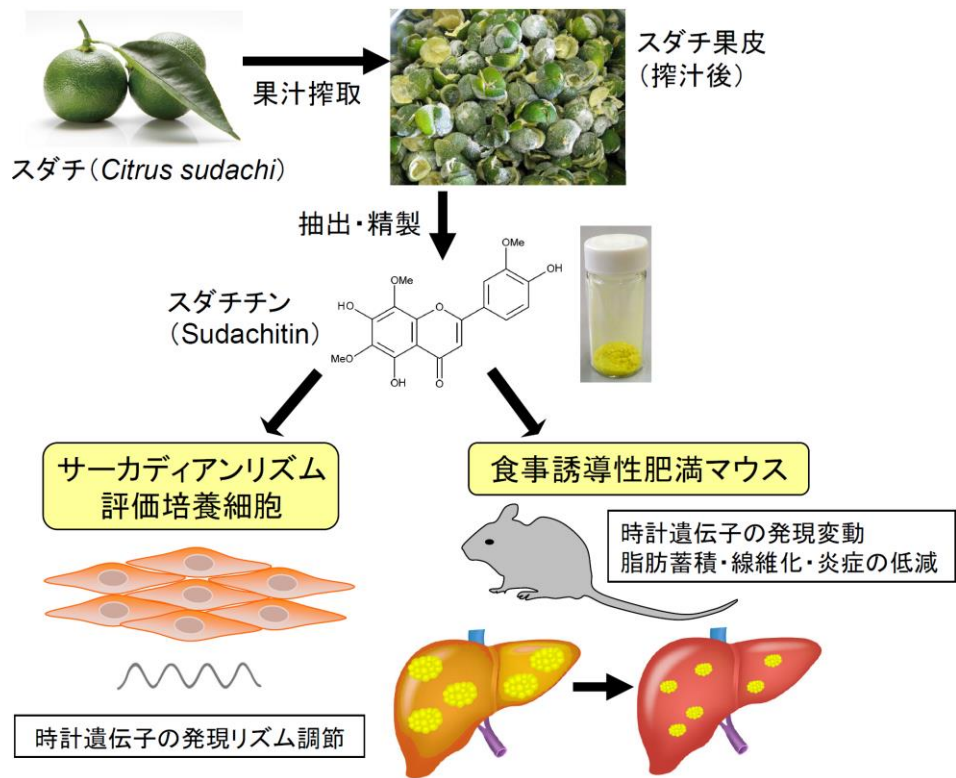


図7. 本研究結果の概要

**【特記事項】**

本研究は、日本学術振興会・科学研究費助成事業（科研費）国際共同研究加速基金（課題番号 15KK0345 及び 18KK0274）、徳島県立工業技術センター・技術シーズ創出調査事業、徳島大学・産学連携研究者育成支援事業および地域連携戦略室・ミッション実現戦略経費の支援を受けて行いました。

### 【研究内容に関する問い合わせ先】

#### <徳島大学>

大学院医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野講師  
馬渡 一諭 (マワタリ カズアキ)

電話番号 088-633-9598

FAX 088-633-7092

メールアドレス mawatari@tokushima-u.ac.jp

#### <池田薬草株式会社>

取締役 品質管理部長

敷島 康普 (シキシマ ヤスヒロ)

電話番号 0883-72-5320

FAX 0883-72-5005

メールアドレス y-shikishima@dks-web.co.jp

#### <徳島県立工業技術センター>

企画総務担当 課長

新居 佳孝 (ニイ ヨシタカ)

電話番号 088-635-7901

FAX 088-669-4755

メールアドレス nii@itc.pref.tokushima.jp

#### <The University of Texas Health Science Center at Houston>

Department of Biochemistry and Molecular biology

Dr. Zheng Chen

メールアドレス Zheng.Chen.1@uth.tmc.edu

### 【報道に関する問い合わせ先】

#### <徳島大学>

蔵本事務部医学部総務課総務係

電話番号 088-633-9116

FAX 088-633-9028

メールアドレス isysoumu1k@tokushima-u.ac.jp