

マウス消化器系機能における
末梢体内時計の関与
Role of peripheral clock systems in function
of digestive organs in mice

2014 年 2 月

青木 菜摘
Natsumi AOKI

マウス消化器系機能における
末梢体内時計の関与
Role of peripheral clock systems in function
of digestive organs in mice

2014年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科および東京
農工大学大学院生物システム応用科学府

共同先進健康科学専攻 薬物・栄養物効果解析学研究

青木 菜摘
Natsumi AOKI

目次

第1章 緒言

1. はじめに	3
2. 体内時計について	4
3. 疾病と体内時計について	6
4. 時間薬理学	8
5. 時間栄養学	9
6. 食餌による体内時計のリセット	10
7. <i>Clock(-/-)</i> マウスについて	11
8. セロトニンについて	12
9. 研究目的	14

第2章 肝臓 TG 蓄積への体内時計の関与

1. 序論	16
2. 実験材料及び方法	19
3. 実験結果	
第1節: 絶食性 TG 蓄積について	
1-1 サンプルング時間検討	30
1-2 絶食時間の長さ検討	32
1-3 朝1食、夕1食の食習慣による影響	33
1-4 制限給餌による影響	45
小括	54
第2節: 時計遺伝子変異マウス <i>Clock(-/-)</i> マウスの肝臓 TG 蓄積	
2-1 低たんぱく質食による影響	55
2-2 サンプルング時間による影響	56
2-3 制限給餌による影響	57
2-4 絶食による影響	63
小括	64
4. 考察	65

第3章 腸と体内時計の関係

1. 序論	68
2. 実験材料及び方法	70
3. 実験結果	
第1節: ストレスが時計遺伝子発現に与える影響	
1-1 慢性拘束ストレスによる影響	83
1-2 慢性拘束ストレスによるセロトニン分泌	85
1-3 一過性拘束ストレスによる影響	86
小括	87
第2節: 末梢のセロトニンと小腸の時計遺伝子発現	
2-1 セロトニン増減による影響	88
2-2 5-HT ₃ , 5-HT ₄ 受容体刺激による影響	93
2-3 抗うつ薬投与による影響	98
小括	100
第3節: 腸運動機能への影響	
3 摘出腸管のアセチルコリンに対する収縮反応への影響	101
小括	103
4. 考察	104

第4章 総括

謝辞	112
掲載ジャーナル	113
参考文献	114
研究業績	130

第1章 緒言

1. はじめに

私たちを取り巻く社会環境は、時間というキーワードで考えていくと、大きく変化している。24時間営業のコンビニエンスストアやスーパー、早朝まで営業している飲食店、カラオケ、街には、常に明かりが灯り、消えることがない。眠らない街の中で、職業形態も朝起きて出勤し、夜に退社するという勤務形態が崩壊し、交代制で夜間勤務をするシフトワーカーが増え、さらには、インターネット普及や国際化の影響を受け、ビジネスマンは寝ずに働き休みはない。ライフスタイルは常に変化しそれに伴い食生活も大きく変わりつつある。私たちは、時に、食生活特に食のバランスの異常が病を招く原因として考えることが多い(Ma Y et al., 2003)。しかし、食のバランスに加えて食事時間も大きく影響することがわかっている(Bray MS et al., 2010, Hirao A et al., 2010)。これは、私たちが持つ体内時計についての研究が進んできたからである。生体では、内部環境を一定に保とうとする恒常的な性質と内部環境を外部の環境変化に合わせて能動的に変化させる同調機能があり、約1日周期をリズムとする体内時計が同調され24時間周期となる(Ramsey KM et al., 2007)。正確な24時間周期のリズムを形成し、維持するには、光と日々の食事による時刻の認識が必要であり、外部環境に同調させることが心身の健康につながる。時計遺伝子異常マウスを用いた研究よりアルコールやコカイン依存、躁病、がんの発病リスクとして時計遺伝子が関わっていることもわかってきている(Spanagel R et al., 2005, Yu EA et al., 2011)。また、シフトワークによって、乳がんや前立腺がん、大腸がんになりやすいという報告もある(Schernhammer ES et al., 2001, 2006, Kubo T et al., 2006)。体内時計を起点として私たちの健康的な生活を考えることが現代社会の重要な課題になっていくだろう。

2. 体内時計について

体内時計とは、約 1 日を周期とするリズムで、体温、副腎皮質ステロイドホルモン分泌、睡眠・覚醒などの昼夜で大きく変化する現象に関わり、これらの概日リズムを動かす時計である。約 24 時間周期で振動するリズムで、動物種によって多少違いがあり、24 時間ぴったりのものは少ない。この理由は、未だはっきりしていないが、生物として季節変動に対応してきた結果だと捉えられている。人の体内時計は、24.5 時間であるが、地球の自転に伴う明暗周期に対応する 24 時間のリズムの日内リズムとなる。概日リズムは、明暗以外に、食事、温度サイクルなどの同調因子によって、日内リズムを刻んでいる(Shibata S et al., 2010)。体内時計は、哺乳類において、時計遺伝子 *Clock* と *Per1* が発見され、(Tei H et al., 1997, King DP et al., 1997)、現在では、10 数種類同定されていて、すべてがひとつひとつの細胞に発現している。自身の発現量を 1 日の中で規則的に増減し、かつ、転写因子として機能し、互いに転写・翻訳の過程で作用しあって安定した約 24 時間周期のリズムを作り出していると考えられ、以下の分子モデルが提唱されている。時計タンパク質の *CLOCK* と *BMAL1* がヘテロダイマーを形成し、時計遺伝子 *Per1, Per2* のプロモーター領域にあるシスエレメント *E/E'Box* を介して *Per1/Per2* の転写を促進し、合成された *PER1/PER2* タンパク質が核内に移行し *CLOCK* と *BMAL1* による転写促進を制御することで、*PER1/PER2* タンパク質の発現が低下し始め、再び、*CLOCK* と *BMAL1* による転写が促進される。このサイクルが約 24 時間で行われていると考えられている(Fig.1)。時計遺伝子が発見されたことで、全身組織に時計遺伝子発現がみられることがわかり、主時計、脳時計、末梢時計の階層構造からなり、視交叉上核が体内時計の中核として同定され、主時計として機能している(Fig.2)。脳時計として大脳皮質や海馬、末梢時計として心臓、肺、肝臓、腎臓、皮膚などあらゆる臓器に時計遺伝子が発現し、リズムをきざみ、例えば、肝臓では、コレステロールや中性脂肪の合成にかかわる酵素に影響していたり(Hara R et al 2001, Kudo T

et al., 2008)、小腸では、グルコースの取り込みに関する遺伝子発現の日内リズムや *Per2* 変異動物でのリズム消失に関わるなど(Balakrishnan A et al 2008, 2010)体内時計の影響を固有にうけ、働いていることが最近の研究で明らかにされつつある。

Fig.1 時計遺伝子のフィードバック機構図

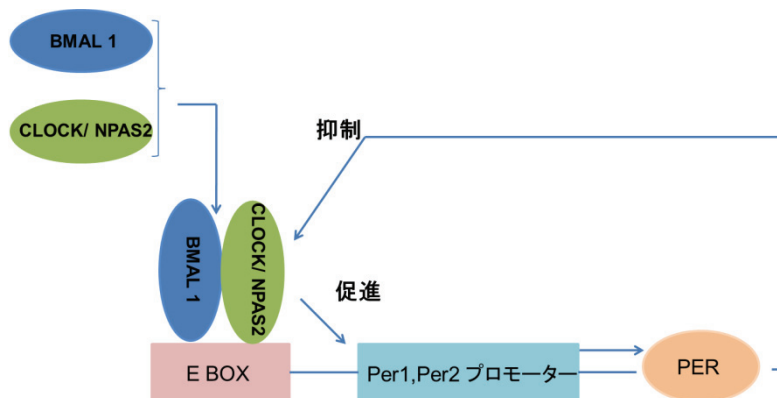
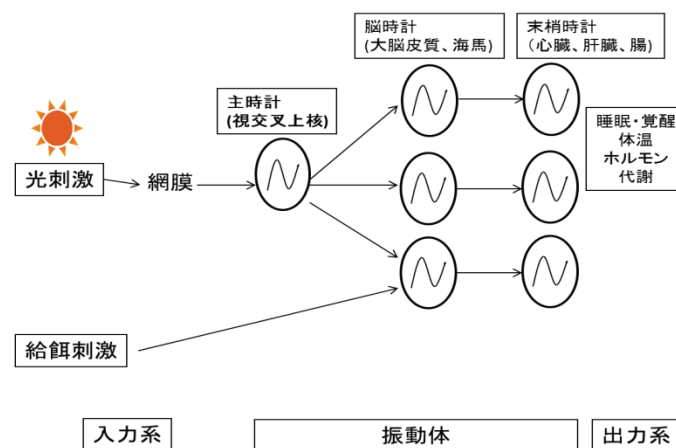


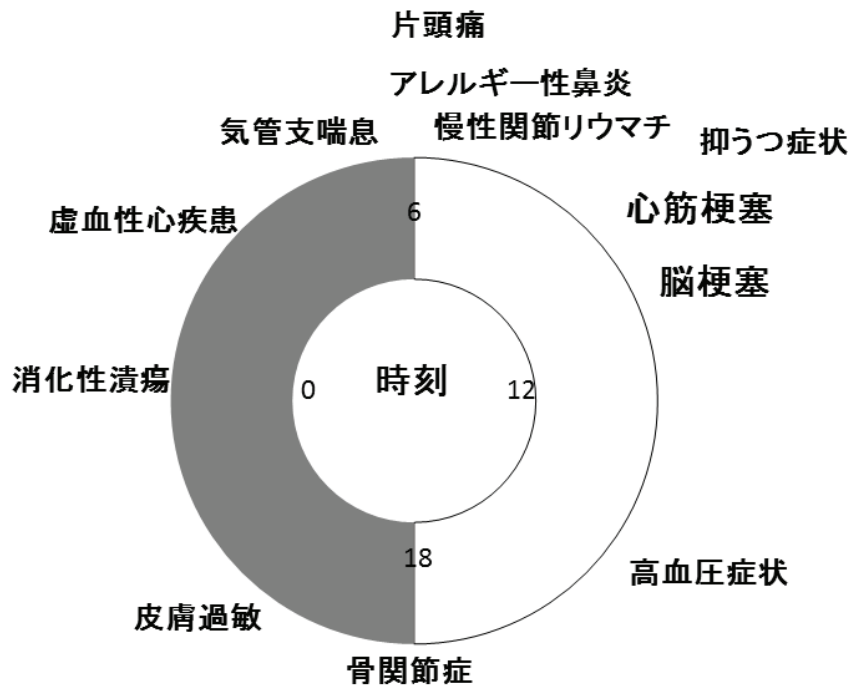
Fig.2 体内時計の仕組み



3. 疾病と体内時計について

病気の症状にリズム現象がみられることは、よく知られている。たとえば、交感神経の活発化によって早朝から午前中にかけて、血圧は著しく増大するため狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患は早朝から午前中に発症しやすい(Angleton P et al., 1989)。また、免疫・アレルギー疾患の症状でもリズム現象がみられ、リウマチ関節炎の「朝のこわばり」に代表される炎症性のむくみがあり、実際の炎症性サイトカイン量に日内変動がみられている(Kowanko IC et al., 1982, Bellamy N et al., 1991,2002)。喘息の発作は、夜間に副交感神経が活発になり、交感神経機能が低下し、気管支の筋肉の収縮が夜間に高まることで、明け方にかけて多い。気道粘膜の働きにもリズムがみられ、夜間に低下することも喘息発作の原因となる(Reinberg A et al 1987)。ほかにも花粉症やアレルギー性鼻炎も朝方に悪化する。このように、さまざまな疾病の発症や症状の悪化に日内リズムがみられ、体内時計が関与していることがわかる(Nishimura K et al., 1992, Shigeyoshi Y et al., 1997, Duncan WC 1996, Ohdo S et al., 1996,2001)(Fig.3)。また、現代社会は多様なストレスが存在し、現代の病気の大きな一因になりつつある。ストレスを受けると、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が分泌され、グルココルチコイドの分泌が増加しストレス応答制御に働くことが知られている。このメカニズムは詳しくわかっていないが、グルココルチコイド分泌は、夕方から早朝にかけては分泌が少なく、早朝から夕方にかけて分泌が多いといった日内変動があることがわかっている(Krieger DT et al., 1971)。時計遺伝子は、ほぼ全身に発現しているからこそ、生体機能の様々な面に関与し、時計遺伝子に異常があると疾病の原因になる。また、時計遺伝子の異常のみならず、シフトワークとメタボリックシンドロームは深く関係していることもわかってきていて、体内時計の異常が疾病の原因になることも示されてきている(Turek FW et al.,2005, Oishi K et al.,2006)。しかし、疾病原因と体内時計異常として、特定の時計遺伝子の異常による疾病との因果関係に関しては不明な点も多く残している。

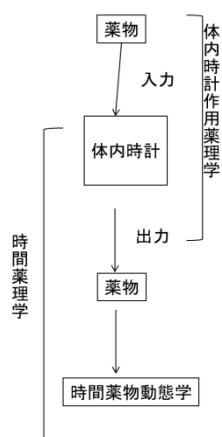
Fig.3 疾病と体内時計



4. 時間薬理学

疾病と体内時計が深く関与していることから、効果的な治療方法として適切な時刻に投薬などを行い治療するということが考えられ、薬理的な観点から時間薬理学として確立し、さらに薬物が体内時計にどのように効くかを調べる体内時計作用薬理学も合わせて研究されている(Smolensky MH et al., 1997, Ohdo S 2007)(Fig.4)。同じ薬であっても服薬時刻によって治療効果や有害反応が異なる。すでに高脂血症や高血圧症の臨床においてはその投与方法が時間治療として応用されている(Hermida RC et al., 2005,2007, Portaluppi F et al., 1995, Kario K et al.,2000)。また、睡眠覚醒リズムの異常や時差ボケの軽減のために、体内時計をリセットさせるメラトニンの効果を利用して、メラトニンやその受容体アゴニストを与え、リズムを整えるなどの研究もされている(Pandi-Permal SR et al., 2008)。ほかに、体内時計異常による疾病発症の治療として、リズムの異常を正常に戻すために、光同調という観点より、高照度光治療器で適切な時間に光を浴び、体内時計の位相を合わせたり、規則正しい食事によって、体内時計の位相をリセットしリズム異常を調整することも重要であると考えられている(Hirao A et al., 2009)。

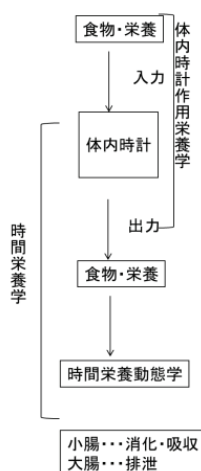
Fig.4 時間薬理学



5. 時間栄養学

時間栄養学は、時間軸上に展開される栄養素の消化、吸収、排泄などを研究する学問である。時間薬理学と同じような視点で栄養を考え、栄養素を含む食物が体内時計に働きかけることで体内時計を同調させる食餌性同調の側面も考えられる。これは、エネルギー代謝やトランスポーターに関わる多くの遺伝子群が日内リズム変動していること (Balakrishnan A et al., 2008,2010, Fatima J et al., 2009)から、食事が、栄養素などの構成や量に加えて摂取時間も重要な要因として考えなくてはならない。ラットを用いた実験では、夕食にあたる時間には、脂肪、たんぱく質、炭水化物の順に選択し(Cho K. 2001)、朝食にあたる時間には、炭水化物を選択し、睡眠前には脂肪分を取りやすくなったという報告があり、ヒトでも同様に、朝食に炭水化物を好み、夕食に脂肪分を好む傾向にあるということがわかっている。就寝前は、糖質の代謝が低下し、消化管運動も遅くなることから消化・吸収の早い炭水化物は朝食に向いているといえる(Dos Santos ML et al., 2006)。このように時間栄養学と体内時計作用栄養学の両方の研究が進むことで、生活習慣病の予防としての食事スタイルの提供につながる。

Fig.5 時間栄養学



6. 食事による体内時計のリセット

動物への給餌を自由摂食から一日のうちの特定の時間帯に制限する制限給餌 (restricted feeding) をした場合、行動や体温のリズム、ホルモンの分泌リズムなど、多くの生理機能の日内リズムが摂食の時間帯に同調するようになり (制限給餌性同調)、視交叉上核が破壊されて生体リズムを消失した動物でも様々な生理現象にリズム性が認められるようになる (King DP et al., 2000)。この制限給餌性リズムを駆動する体内時計の分子機構は不明だが、様々な脳部位が協調することで制限給餌によるリズムが形成され維持できているのではないかと示唆されるようになってきた (Wakamatsu H et al., 2001)。制限給餌性リズムは、給餌を停止してもしばらくは持続した概日リズムを示すことから、摂食の刺激によって一過的に出現する単なる生理的応答ではなく、視交叉上核と似た性質をもつ概日性振動体によって駆動される生体リズムであると考えられ、制限給餌性リズムを形成する分子機構に時計遺伝子が関与していることを示唆している。時計遺伝子のミュータントマウスを用いた解析が行われ、*Cry1/Cry2* ダブルノックアウトマウスは制限給餌による行動リズムの形成が不安定であること、*Npas2* のミュータントマウスでは、給餌スケジュールに適応するのが難しく体重減少が起こり (Dudley CA et al., 2003)、*Npas2* 欠損マウスでも、代謝性条件への適応は阻害されないが制限給餌条件に適応する能力は阻害することがわかっている (Wu X et al., 2010)。一方、*Per1* のミュータントマウスでは弱いながらも制限給餌性行動リズムは認められ、*Bmal1* や *Clock* のミュータントマウスはほぼ正常な制限給餌性の行動リズムを形成するということが明らかにされた。いずれにしても、摂食によって獲得した時刻情報は、インスリンやグルココルチコイド、自律神経系で全身に伝わり、生体リズムの調節が遂行される。食事による体内時計のリセットは、明暗サイクルの変化によって、視交叉上核にある体内時計のリセットと比べて、肝臓や腸などを含む、あらゆる組織のリズムの調整に関与することからも長い時間を要するため、身体の不調は生体リズムが整うまで継続する。

このことを応用し、あらかじめ機内食を現地の時刻に合わせたかたちでスケジュールを組むようにすると、現地での時差ボケが緩和されることになる(Fuller PM et al., 2008, Forbes-Robertson S et al., 2012)。また、近年では、競走馬の海外進出が盛んになってきたことを背景とし、光同調と合わせて給餌による体内時計のリセットについての研究が進み、競走馬の健康管理に活かされている(Murphy BA et al., 2007)。

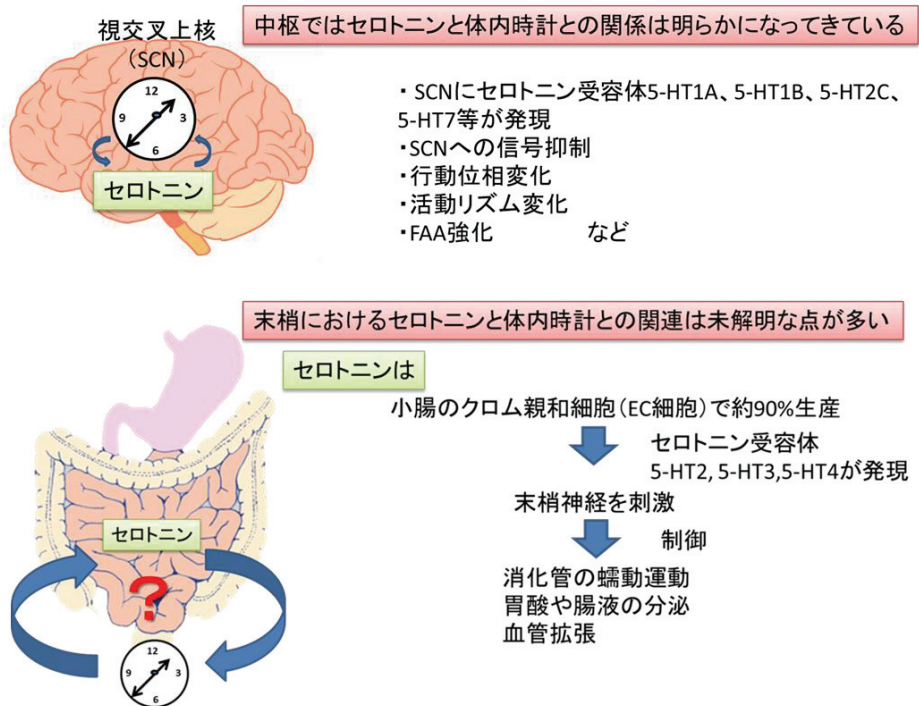
7. *Clock* ミュータントマウス

Clock 遺伝子は、1994年に哺乳類では初めて見つかった時計遺伝子である(Vitaterna MH et al., 1994)。*Clock* 遺伝子のヘテロ型では25時間、ホモ型では、27~28時間ほどの周期を示し、長期間の恒常条件下でリズムが消失する(Florez JC et al., 1995)。*Clock* 変異マウスは、行動変化などから薬物効果に用いられたり(Bernardi RE et al., 2013)、うつ病モデルとして用いられることが多い(Easton A et al., 2003, Koizumi H et al., 2013)。また、代謝に関しても、C57BL系由来の*Clock* 変異マウスは、日内リズムの異常、エネルギー摂取過多による肥満、血中TG値、コレステロール値、グルコース値の増加が報告されている(Turek FW et al., 2005)。さらに、本実験でも使用したICR系由来の*Clock* 変異マウスでは、普通食の場合は、コレステロール値、グルコース値ともに正常値を示す(Oishi K et al., 2006)が、高脂肪食、高コレステロール食、アルコール摂取により、脂肪肝、高脂肪症になりやすいことがわかっている(Kudo T et al., 2007)。最近では、*Clock* 変異マウスは、腸のコレステロール吸収を増加しアテローム硬化を促進するといったことが示された(Pan X et al., 2013)。このように様々な代謝異常に関して*Clock* 変異マウスを用いて研究され、時計遺伝子、概日リズムと代謝が密接に関係することがわかっている。

8. セロトニン

セロトニンは、生体内生理活性物質で、インドール核をもつモノアミンである。腸管蠕動運動や血管収縮、血小板凝集の作用をもち、神経伝達物質として働く。ヒトの場合、セロトニンは体内におよそ 10mg 存在し、脳に 1-2%、胃腸管に 90%、血小板に 8-9% である。脳のセロトニンは、中脳、橋、延髄の縫線核や松果体などに存在し、松果体ではセロトニンからメラトニンが作られ、睡眠反応や明暗反応に関与し、縫線核のセロトニンは衝動、気分、感情、認知機能、性行動などに関与している(Ciarleglio CM et al., 2011)。一方、末梢のセロトニンは、小腸のクロム親和細胞で合成され、空腸に最も多く含まれ、神経伝達物質や局所ホルモンとして働く。末梢神経を刺激し、消化管蠕動運動や腸液の分泌、血管拡張を引き起こす。腸管におけるセロトニン受容体は、5-HT₂、5-HT₃、5-HT₄が存在し、5-HT₂受容体は、Ca²⁺イオン濃度が上がり平滑筋収縮を起こし、5-HT₃受容体は、ナトリウムイオンの流入によって脱分極を引き起こしカルシウムイオンの上昇やアセチルコリン遊離を起こし、胃液分泌、消化管蠕動運動を亢進させる。5-HT₄受容体は、cAMPの上昇やタンパク質のリン酸化などが行われている。セロトニンは血流脳関門(blood brain barrier:BBB)を通過しないため(Fujimura J et al., 1994)、脳と末梢臓器で別々に合成され、相互の移動、直接的な作用の報告はない。さらに、セロトニンと体内時計に関して、中枢においては、体内時計の主時計とされる SCN に 5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{2C}、5-HT₇が発現し(Kiss J et al., 1984, Bosler O et al., 1985, 1989, Manrique C et al., 1993, 1994, Lovenberg TW et al., 1993, Prosser RA et al., 1993)、セロトニン受容体がリズムに関与し、SCN に対して網膜からの入力を制御している(Pickard GE et al., 1999, Quintero JE et al., 1999, Flett J et al., 1999)。また、行動リズム制御や変化にも関与している(Lungwitz E et al., 2009, Paulus EV et al., 2012)。一方で、末梢のセロトニンと体内時計の関与に関してはほとんど報告がない (Fig.6)。

Fig.6 セロトニンと体内時計について



9. 研究目的

私たちの生活スタイルの変化が体内時計の変化を引き起こすことがわかってきた今、消化器系機能と末梢の体内時計の関与について調べることは、健康への第一歩になるだろう。生活スタイルが変化することで、朝食の欠食、夜食の習慣化など食事時間や食事内容が変化し食生活は乱れる。食事の影響をより受ける器官として消化器系に着目した。消化器系で臓器として肝臓は、末梢時計との関連や脂質、エネルギー代謝、糖新生など代謝リズムについて豊富に研究がされている(Hara R et al 2001, Kudo T et al., 2008)。食餌の影響は、肝臓が最も受けやすい。さらに、消化器系で消化管として小腸は、直接、食餌を消化・吸収するといった役割を果たす。また腸は、多様化するライフスタイルの中でもう一つの弊害であるストレスの影響を受けやすい。ストレスに対する反応性について調べることができ、腸とストレスそして時計機構との関連について検索することができる。消化・吸収、代謝といったサイクルの中で肝臓と腸は、生体の恒常性に重要な役割を果たす。そこで、本研究では、第二章で、肝臓への TG 蓄積への体内時計の関与を食事スタイル、時計遺伝子変異マウス *Clock(-/-)*マウスを用いて調べた(Fig.7)。*Clock(-/-)*マウスは、先に述べたように、高脂肪食や高コレステロール食、アルコール摂取により肥満や脂肪肝になることが知られている(Kudo T et al., 2007)。肝臓への TG 蓄積がどのような条件下において変化を示すか、体内時計の関与について検証し医療では生活習慣病や脂肪肝、または脂肪肝が引き起こす肝臓の疾病の予防、産業では、白肝やフォアグラといった高級食の提供といった 2 つの側面に影響を与えることにつながる(Fig.7)。第三章で、ストレスの影響を受けやすい末梢臓器である腸に着目し、腸と体内時計の関与について調べる(Fig.8)。ストレスの腸の時計遺伝子への影響、腸疾患の治療にセロトニンが関わっていることや腸疾患の症状が夜間に起こりやすいといった体内時計との関連から、セロトニンが腸の時計遺伝子に与える影響、また、ストレスによる副交感神経系の刺激として、アセチルコリン反応性への影響について検証する。

Fig.7 第2章 肝臓 TG 蓄積への体内時計の関与概略図

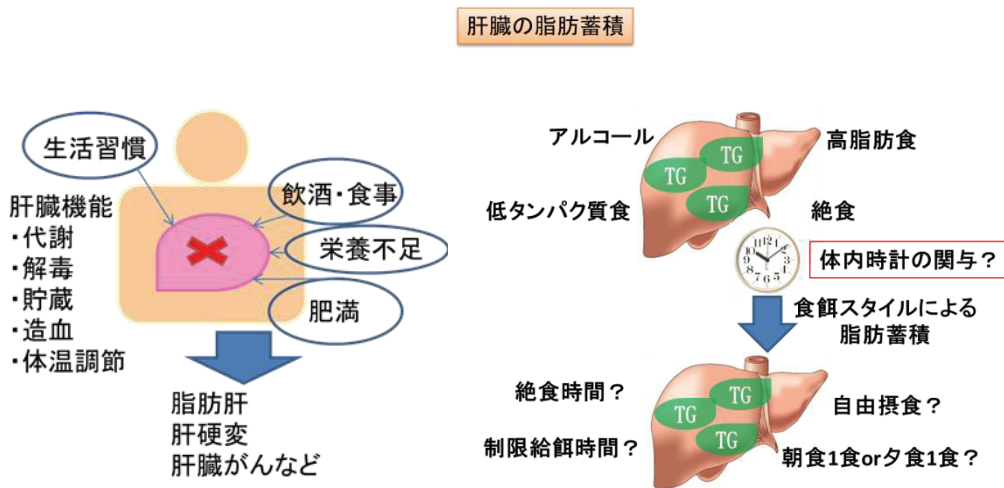
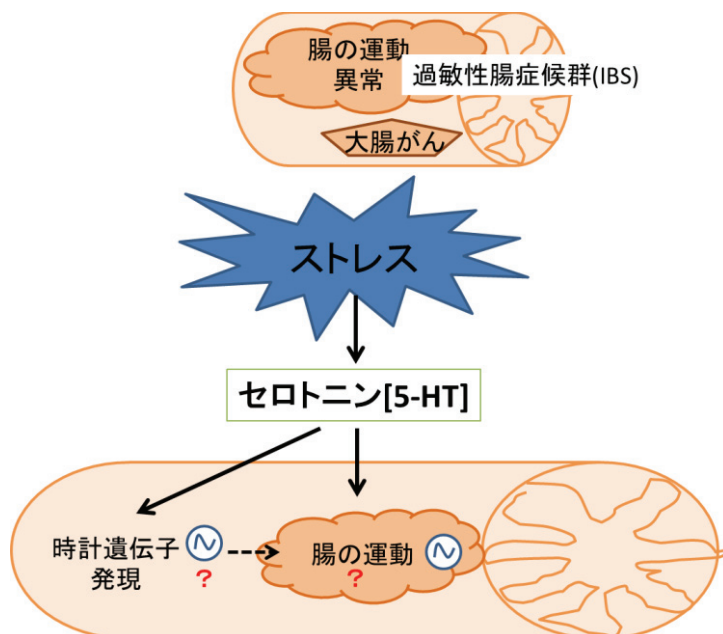


Fig.8 第3章 腸と体内時計の関係概略図



第2章 肝臓 TG 蓄積への体内時計の関与

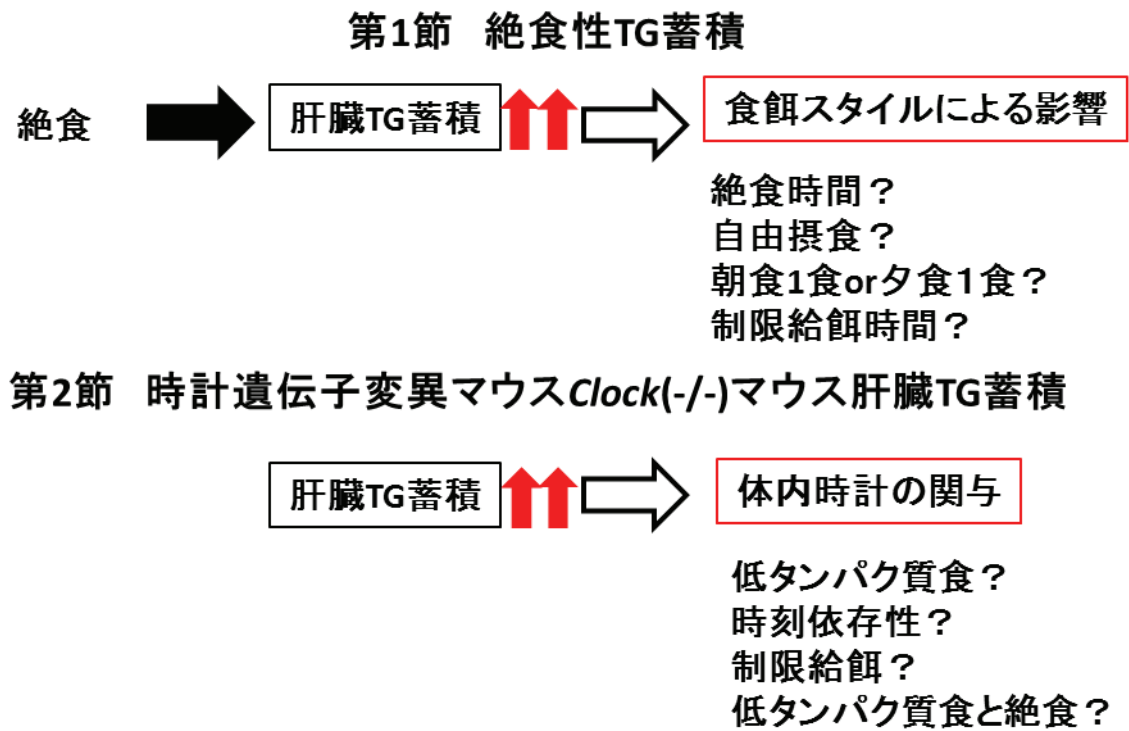
1. 序論

哺乳類において、肝臓は、炭水化物、脂質、タンパク質のホメオスタシスの中心的役割をしている。肝臓のトリグリセリド(TG)蓄積は、アルコール摂取、高脂肪食、低タンパク質食や栄養不足が起因となることは知られている(Lottenberg AM et al., 2012, Koo SH et al., 2013)。脂肪肝は、肝臓の内在性の脂質合成、脂肪酸の供給、 β 酸化、脂質の排出の間のバランスで生じる(Roden M 2006)。遊離脂肪酸(FFA)の取り込みと TG 合成は、脂肪酸輸送タンパク質(*Fatp1, Fatp4*)、脂肪酸結合タンパク質(*Fabp1, Fabp4*)と *Srebp-1c*、アセチル-CoA-カルボキシラーゼ(*Acc*)と脂肪酸合成酵素(*Fas*)によって調整されている(Horton JD et al., 1998)。近年では、*Dgat1* や *Dgat2* も肝臓 TG 代謝に関与することが報告されている(Turkish AR et al., 2008)。脂肪酸酸化は、ペルオキシソーム増殖因子を活性化された受容体 α (*Ppar- α*)、ペルオキシソーム増殖因子を活性化された受容体活性化補助因子 α (*Pgc-1 α*)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1(*Cpt1*)、*Srebp-1c* が関与する。また、糖新生の鍵になる酵素としてホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 1(*Pepck1*)も関与する(Badman MK et al., 2007, Gan SK et al., 2008)。さらに、概日時計システムは、エネルギー代謝や食行動に重要な役割を果たすことがわかっている(Cagampang FR et al., 2012)。*Srebp-1c*、*Acc*、*Fas*、*Ppar- α* 、*Pgc-1 α* 、*Pepck* の遺伝子発現で概日時計リズムがあることが報告されている(Le Martelot G et al., 2009)。したがって、脂肪肝に時計制御が影響する可能性がある。末梢の概日時計システムは、概日時計の中心である視交叉上核(SCN)を通して光による同調に加えて、制限給餌が同調因子になることがわかっている(Shibata S et al., 2010)。

また、高脂肪食を自由摂取したマウスは、時計制御代謝関連遺伝子(Kohsaka A et al., 2007, Hsieh MC et al., 2010)と同様に時計遺伝子の発現リズムを変える可能性がある。最近では、高脂肪食の影響を肝臓の時計遺伝子や TG 代謝で調べた研究もある。例えば、活動期の始めに1回たくさんの食餌をしたマウスが、活動期の始めと終わりに1食ずつ、計1日2食したマウスと比較して肥満になりやすく、異常な時計遺伝子発現になることや(Shibata S et al., 2010)、カロリー摂取量を減らすことなく夜間に制限給餌をすると代謝疾患を抑制すること(Hatori M et al., 2012)などが高脂肪食を利用した実験によって証明されている。他にも、夜遅くに、乳脂肪を消費しているマウスでは、脂肪肝になり、血清 TG と FFA を増加させ、さらに、肝臓の時計遺伝子発現パターンを変えた報告もある(Wang X et al., 2013)。これらのことは、高脂肪食摂取のタイミングが時計遺伝子発現を変化させ、肝臓 TG 蓄積に影響を及ぼすことを示唆している。次に、栄養不足の観点から脂肪肝を考えると、哺乳類は、栄養を長期間摂取することを妨害されると、生体の恒常性が働き、その状態を耐え抜くために、複合的な代謝や行動などを工夫する。この場合、全体の適応応答の鍵になるのは、炭水化物からエネルギー源としてのケトン体への移行である。絶食の間は、脂肪酸が白色脂肪組織から肝臓まで輸送され、また、ビルビン酸からアセチル CoA を合成し、その後脂肪酸を合成する。このように、脳と筋肉によって優先してケトン体を生産する(Gan SK et al., 2008)。実際に、12-36時間の絶食は、マウス(Badman MK et al., 2007, Sokolovic M et al., 2010)とヒト(Moller L et al., 2008)で肝臓で肝臓 TG 蓄積を増加することが報告されている。この増加は、食物不足に対する進化の適応応答であると考えられている。高脂肪食の供給パターンが脂肪組織と肝臓(Shibata S et al., 2010, Hatori M et al., 2012)で TG 代謝に影響を及ぼすことから、本研究では、異なる食餌パターンに対しての絶食によって誘発される肝臓 TG 蓄積に関して、朝食1食、夕食1食のパターンで絶食が誘発する TG 蓄積の影響を調べた。一方で、前章で述べたように食パターンに異常が見られる *Clock(-/-)*マウスを

用いることで、食パターンの変化が肝臓 TG 蓄積に関与するかについて明らかにする (Fig. 9)。

Fig. 9 第2章 肝臓 TG 蓄積と体内時計の仮説概略図



2. 実験材料及び方法

(1) 実験動物

6 週齢のオス C57BL/6J マウス(20g~28g) (東京実験動物株式会社)、または、6 週齢のオス ICR マウス(30g~40g) (東京実験動物株式会社)、6 週齢のオス *Clock* ミュータントマウスを用いた実験を行った。*Clock* ミュータントマウスは、ICR 系統のものを使用し、当研究室で繁殖させたものを使用した。

(2) 飼育環境

マウスは、 22 ± 2 度、湿度 $60 \pm 5\%$ 、明期：暗期=12 時間:12 時間（午前 8 時から午後 20 時までが明期）の環境で集団飼育した。なお、以降この明暗時間を基準とし、点灯開始時刻の 8:00=ZT0 (ZT: Zeitgeber time)、消灯時刻の 20:00=ZT 12 と表記する。実験開始まで、自由飲水下で飼育し、餌は実験動物用飼料 (MF、オリエンタル酵母 株式会社) を用い、自由摂食させた。実験開始時から餌は、AIN-93M(14%カゼイン含有食：オリエンタル酵母株式会社)に変えて行う。餌の組成は別途示す(第 2 章 2(3))。実験期間は、すべて 2 週間とした。実験動物の取り扱いには早稲田大学の実験動物倫理委員会の許可に基づいて行った。

(3) 実験飼料

実験では以下に示す飼料(固形)を2週間与える。

AIN-93S(6%カゼイン)	%	AIN-93M(14%カゼイン)	%	AIN-93G(20%カゼイン)	%
カゼイン	6	カゼイン	14	カゼイン	20
L-シスチン	0.18	L-シスチン	0.18	L-シスチン	0.3
コーンスターチ	54.5692	コーンスターチ	46.5692	コーンスターチ	39.7486
α 化コーンスターチ	15.5	α 化コーンスターチ	15.5	α 化コーンスターチ	13.2
シュークロース	10	シュークロース	10	シュークロース	10
大豆油	4	大豆油	4	大豆油	7
セルロースパウダー	5	セルロースパウダー	5	セルロースパウダー	5
AIN-93Mミネラル混合	3.5	AIN-93Mミネラル混合	3.5	AIN-93Mミネラル混合	3.5
AIN-93ビタミン混合	1	AIN-93ビタミン混合	1	AIN-93ビタミン混合	1
重酒石酸コリン	0.25	重酒石酸コリン	0.25	重酒石酸コリン	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0008	第三ブチルヒドロキノン	0.0008	第三ブチルヒドロキノン	0.0014
合計	100	合計	100	合計	100

実験1では、AIN-93M(14%カゼイン含有食)を使用した。

実験2では、AIN-93S(6%カゼイン含有食)、AIN-93M(14%カゼイン含有食)、AIN-93G(20%カゼイン含有食)を使用した。

(4) 制限給餌(RF)

制限給餌 (Restricted Feeding ; RF) とは、強制的に食餌のできる時間帯を定め、その時間帯以外は餌を与えないことであり、決められた時間帯のみ餌が提示される。餌を与える時間帯によって、末梢組織の時計遺伝子の位相が変化することが知られている (King DP et al., 2000)、写真の給餌装置を使用した。実験 1-3、1-4、2-3、2-4 でこの制限給餌装置を用いて、給餌開始時刻、給餌期間を制限した。

(5) 行動測定

*Clock(-/-)*マウスの行動量及び行動リズムを WT マウスと比較するために、自発行動量を赤外線エリアセンサー(FAFIG05F5B, Omron, Japan)を用いて計測した。ケージ内でマウスが動くと、温熱検知してその情報が接続されたパソコンにデータとして蓄積される。なお、1 ケージにつき 1 つのエリアセンサーを用いて計測を行っているため、行動リズム及び行動量は、ケージに入っているマウスの合計ということになる。自発行動量の解析には数値解析ソフトウェア Clock Lab (The Nath Works, Inc.) を用いた。

(6) 肝臓 TG 測定

マウスをエーテル麻酔によって殺した後、肝臓すべて摘出する。摘出した肝臓は、 -20°C で冷凍し、再び、解凍した肝臓から、20 mgをとり、0.5ml の PBS (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) に入れ、ホモジナイズして均一化した。この均一化したもの $50\ \mu\text{l}$ に イソプロパノール(NAKALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan) 2.5 ml を加え、よくボルテックスし肝臓の脂質を抽出するために、15000rpm、10 分、 4°C で遠心分離機にかけた。抽出したサンプルは、 $2\ \mu\text{l}$ を Triglyceride E Test Wako キット(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた。本キットは GPO-DAOS 法を用いた測定キットである。発色剤添加によって発生する過酸化水素がペルオキシダーゼ (POD) の作用により DAOS と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青色の色素を生成させる。この青色の吸光度を測定することにより試料中のトリグリセライド濃度を求めることができるという原理である。吸光度計 iMark Microplate Reader (BIO-RAD, Tokyo, Japan)を用いて 595nm 測定した。

以下に手順の概略を示す。

- ① 発色剤の濃度が 3.54 mg/mL になるように発色液を緩衝剤で溶解する
- ② 検体、トリグリセライド標準液 $2\ \mu\text{L}$ 、発色液 $298\ \mu\text{L}$ を 0.6mL チューブに分注
- ③ インキュベーション (37°C 、10 分)
- ④ ピペッティング後、96 well プレートに $200\ \mu\text{L}$ ずつ分注
- ⑤ 595 nm の吸光度測定
- ⑥ 標準曲線を用いて検体中のトリグリセライド濃度を読みとる

(7) 血清 TG 測定

マウスに軽くエーテル麻酔をかけ、死ぬ前に眼の静脈から 0.5ml 採取した。採取した血から血清を得るために、1 時間常温(22°C±2°C)で静置し、3000rpm、20 分、4°Cで遠心分離機にかけた。血清のサンプルは、希釈することなく原液を使用し、肝臓 TG 測定同様の過程で行った。

(8) 遊離脂肪酸(FFA)測定

血清 TG 測定と同じサンプルで 5 μ l 使用した。Nonesterified fatty acid C – Test Wako キット(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いた。本キットは ACS-ACOD 法を用いた測定キットである。発色剤添加によって発生する過酸化水素がペルオキシダーゼ (POD) の作用により MEHA と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青紫色の色素を生成させる。この青紫色の吸光度を測定することにより試料中の非エステル結合型脂肪酸(NEFA)濃度を求めることができるという原理である。吸光度計 iMark Microplate Reader (BIO-RAD, Tokyo, Japan)を用いて 550nm で測定した。

以下に手順の概略を示す。

- ① 発色剤 A の濃度が 11.97 mg/ml、発色剤 B の濃度が 4.48mg/ml になるようにそれぞれの発色剤をそれぞれの溶解用試液で溶解する
- ② 検体、NEFA 標準液 5 μ L、発色液 A 100 μ l を 0.6mL チューブに分注
- ③ インキュベーション(37 °C、10 分)
- ④ ③に発色液 B 200 μ l 入れる

- ⑤ インキュベーション(37°C、10分)
- ⑥ ピペッティング後、96 well プレートに 200 μ L ずつ分注
- ⑦ 550 nm の吸光度測定

標準曲線を用いて検体中の NEFA を読みとる

(9) RNA 抽出と Real – Time RT – PCR 法

I. 組織の抽出方法

採取した肝臓組織はすばやく RNA 抽出液 (RNA-Solv Reagent, Omega Bio-tek) 500 μ L に入れ、ホモジナイズした。ホモジナイズされたサンプルに、RNA 抽出液量の 1/5 量 (100 μ L) のクロロホルムを加え、ボルテックス後 15000 rpm、10 min、20 °C の条件下にて遠心分離機にかけた。三層に分かれた層のうち、上清の水層約 180 μ L を別のチューブに移し、CIA (クロロホルム : イソアミルアルコール=49 : 1) 60 μ L を加え、ボルテックスの後、11500 rpm、10 min、4 °C の条件下にて遠心分離機にかけた。上層を別のチューブに 100 μ L 移し、同量 (100 μ L) のイソプロパノールと 3 M 酢酸ナトリウム 10 μ L を加え、20 分常温静置した。その後 11500 rpm、20 min、4 °C の条件下にて遠心分離機にかけた。沈殿があることを確認後、上清を取り除き 70 %エタノール 200 μ L を加え、転倒攪拌後、8000 rpm、5 min、4 °C の条件下にて遠心分離機にかけた。上清を取り除き、室温で風乾させ、80 μ L DEPC 処理水を加えて沈殿を溶解させ、ボルテックスした。分光光度計 (NanoVue, GE Healthcare) を用いて各サンプルの RNA 濃度を測定した後、DEPC 処理水を使用し、濃度が 50 ng/ μ L になるように調整した。

II. mRNA 定量

リアルタイム PCR (Real-time PCR) は定量 PCR (Q-PCR) のひとつであり、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅を経時的に測定することで増幅率に基づいて鋳型となる DNA の定量を行なうものである。本研究では二本鎖 DNA に特異的に挿入(インターカレート)して蛍光を発する色素 (SYBR green) を用いる方法を用いた。あらゆる配列に対して同じ試薬を用いることができ汎用性が高いが、プライマー二量体のような非特異的な二本鎖 DNA も計測してしまう欠点がある。また、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) と組み合わせて少量の mRNA の定量へ使われ、これにより特定組織での遺伝子の発現をみることができる。

One-Step SYBR RT-PCR kit (TaKaRa, Otsu, Japan) in a PIKO REAL 96 Real – Time PCR System (Thermo Scientific Japan, Yokohama, Japan).

抽出の終えたサンプルはリアルタイム PCR 解析システムを用いてその mRNA 量を定量した。プライマーの配列を Table 2A に示し、RT-PCR の設定条件は以下に示した。

<RT-PCR の設定条件>

① 逆転写反応 (1 repeat)

reverse transcript (40 °C、5 分)

pre-PCR (95 °C、10 秒)

② PCR 反応 (40 repeat)

Denaturing (95 °C、5 秒)

primer annealing, extension (60 °C、34 秒)

③ Dissociation Protocol (1 repeat)

95 °C、15 秒

60 °C、1 分

0.3 °C/秒の温度勾配で 95 °Cまで上昇

95 °C、15 秒

各プライマーの塩基配列

Gene	Sequences of forward primar	Sequences of reverse primar
<i>18srRNA</i>	5' -GGGGAGTATGGTTGCAAAGC-3'	5' -TGTC AATCCTGTCCGTGTCC-3'
<i>Fatp1</i>	5' -CTGGGACTTCCGTGGACCT-3'	5' -TCTTGCAGACGATACGCAGAA-3'
<i>Fatp4</i>	5' -AAAAGGAGCTGCCTCTG-3'	5' -AAGGAGCCTATCAGAAACC-3'
<i>Fabp1</i>	5' -GCAGAGCCAGGAGAACTTTG-3'	5' -CATGCACGATTTCTGACACC-3'
<i>Fabp4</i>	5' -ATCAGCGTAAATGGGGATTTGG-3'	5' -GTCTGGGGTGATTTTCATCGAA-3'
<i>Srebp-1c</i>	5' -CGCTACCGGTCTTCTATCAATG-3'	5' -CAAGAAGCGGATGTAGTCGATG-3'
<i>Acc</i>	5' -CATGAACACCCAGAGCATTG-3'	5' -ATTTGTGCTAGTGGCCGTTTC-3'
<i>Fas</i>	5' -GGCAGAGAAGAAAGCTGTGG-3'	5' -TCGGATGCCTAGGATGTGTG-3'
<i>Dgat1</i>	5' -TCACCACACACCAATTCAGG-3'	5' -GACGGCTACTGGGATCTGA-3'
<i>Dgat2</i>	5' -GAAGATGTCTTGGAGGGCTG-3'	5' -CGCAGGGAAAACAAGAATAA-3'
<i>Ppar-α</i>	5' -TCTTCACGATGCTGTCCTCCT-3'	5' -GGA ACTCGCCTGTGATAAAG-3'
<i>Cpt1</i>	5' -CTTCCATGACTCGGCTCTTC-3'	5' -AGATTGAACCTCTGCTCTGC-3'
<i>Pgc-1 α</i>	5' -GGAGTCTGAAAGGGCCAAAC-3'	5' -AATTCTGTCCGCGTTGTGTC-3'
<i>Mtp</i>	5' -GCCCTAGTCAGGAAGCTGTG-3'	5' -CCAGCAGGTACATTGTGGTG-3'
<i>Pepck</i>	5' -CTTTGGAAGCGGATATGGTG-3'	5' -CTTGCCCTTCGGGGTTAGTTA-3'
<i>Per2</i>	5' -TGTGTGCTTACACGGGTGTCCTA-3'	5' -ACGTTTGGTTTGCGCATGAA-3'
<i>Bmal1</i>	5' -CCACCTCAGAGCCATTGATACA-3'	5' -GAGCAGGTTTAGTTCCA CTTTGTCT-3'

(10) 統計処理

解析には統計解析ソフト StatView for Windows (SAS Institute Inc.) を用いた。2 群間の比較には Student's t-test を、多群間の比較には Tukey-Kramer 法を用いた。1 要因によるリズムの有意差検定は One-way ANOVA を、2 要因によるリズムの有意差検定は Two-way ANOVA を用いて検定した。 $p < 0.05$ の場合に有意差ありとし、* または # で表す。また、 $p < 0.01$ の場合には ** または ##、グラフは平均値±標準誤差で表した。

(11) 実験スケジュール

第1節 絶食性 TG 蓄積について

- 1-1 サンプルング時間検討：サンプルング時間による肝臓 TG 蓄積の違い 1 日 4 ポイントで検証した。
- 1-2 絶食時間の長さ検討：絶食時間の長さによる肝臓 TG 蓄積の変化について絶食時間を 12 時間間隔で検証した。
- 1-3 朝 1 食、夕 1 食の食習慣による影響：食餌のパターンによる TG 蓄積の変化について、制限給餌装置を用いて給餌するタイミングを 2 週間固定し習慣づけてそれぞれの効果を検証した。また、その際の肝臓における中性脂肪に関連する mRNA の発現について検証した。
- 1-4 制限給餌による影響：制限給餌時間の長さによる TG 蓄積の変化について検証し、1-3 同様に肝臓における中性脂肪に関連する mRNA の発現について検証した。

1-1、1-2 では、2 週間、AIN-93M の飼料で自由摂食、自由飲水で飼育しサンプルングをし、1-3、1-4 では、それぞれの実験スケジュールに合わせて、AIN-93M の飼料での飼育方法を変えて 2 週間後にサンプルングをした。具体的な実験のスケジュールは、各実験結果とともに示す。

第2節 時計遺伝子変異マウスの *Clock*(-/-)マウスの肝臓 TG 蓄積

第2節では、時計遺伝子変異マウスの *Clock*(-/-)マウスを用いて実験を行った。

2-1 低タンパク質食による影響：6%カゼイン含有食(AIN-93S)と20%カゼイン含有食(AIN-93G)の飼料をそれぞれ2週間自由摂取、自由飲水させ、タンパク質含有量の違いによる肝臓 TG 蓄積の変化について検証した。以降、この節では、6%カゼイン含有食と20%カゼイン含有食の2種類の飼料による肝臓 TG 蓄積について検証をする。

2-2 サンプルング時間による影響：サンプルング時刻の違いによる肝臓 TG 蓄積の変化について1日4ポイントで検証した。

2-3 制限給餌による影響：常に摂食行動をとる *Clock*(-/-)マウスの給餌時間を制限給餌装置を用いて活動期の12時間に給餌することによる肝臓 TG 蓄積の変化について検証した。さらに、同時に *Clock*(-/-)マウスの行動をアクトグラムを用いて測定した。

2-4 絶食による影響：タンパク質含有量効果と絶食効果の二つの要因を合わせた時、肝臓 TG 蓄積への変化を検証した。6%カゼイン含有食と20%カゼイン含有食でそれぞれ飼育しサンプルング前日から24時間絶食をした。

2節すべての実験で、6%カゼイン含有食(AIN-93S)、20%カゼイン含有食(AIN-93G)の飼料をそれぞれ2週間、自由摂食、自由飲水で飼育し、2-1、2-2、2-3では、サンプルング前日24時間の絶食を行わずにの実験スケジュールに合わせてサンプルングする。2-4では、24時間絶食をしてサンプルングをする。具体的な実験のスケジュールは、各実験結果とともに示す。

3. 実験結果

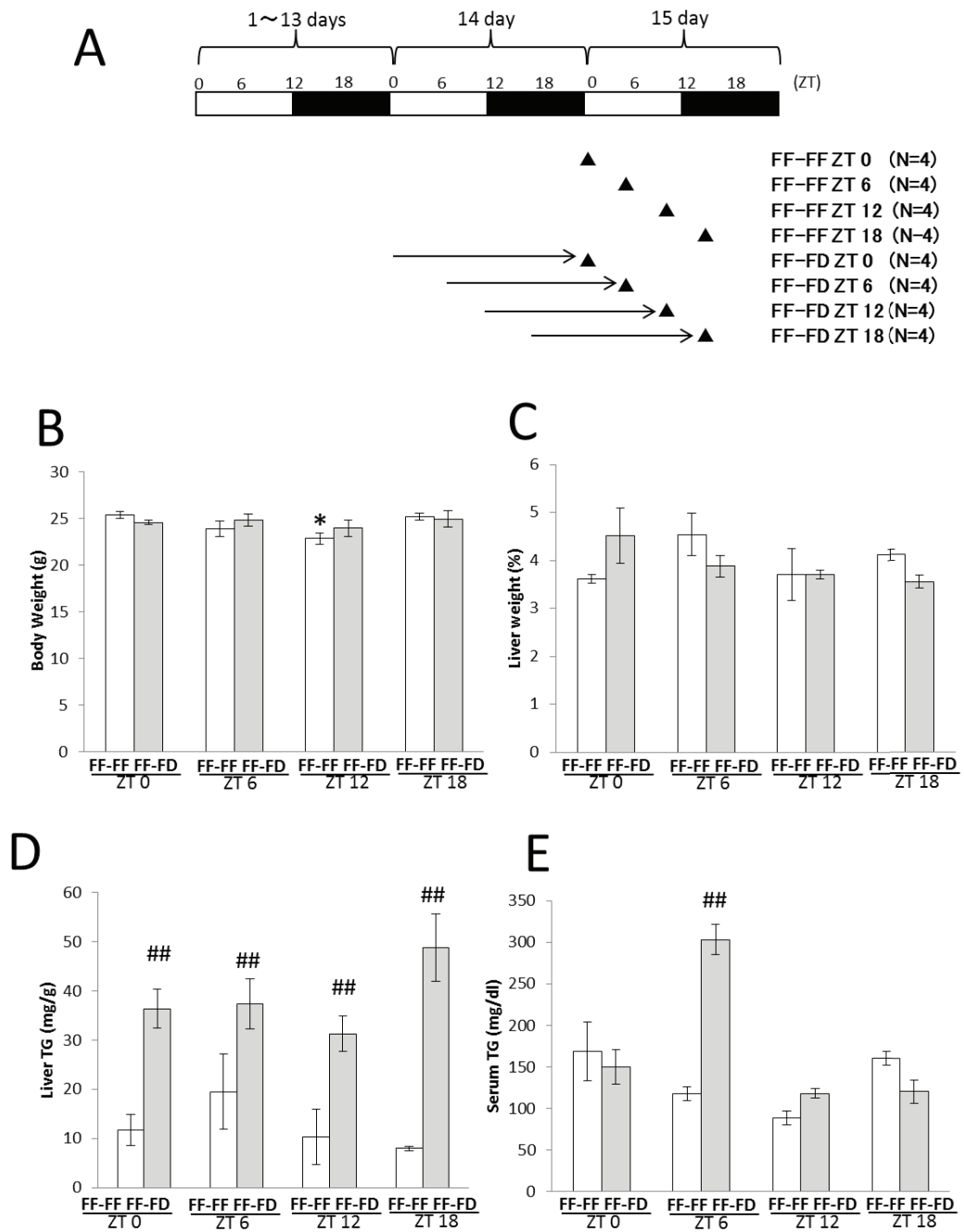
第1節 絶食性 TG 蓄積について

1-1 サンプル開始時刻検討

サンプル開始時刻によって、肝臓 TG 蓄積に及ぼす影響に関して検討した。2 週間、AIN-93M の飼料で飼育後、サンプルをする時間を ZT0,ZT6,ZT12,ZT18 の 4 ポイントに設定しサンプルの前日にそれぞれのポイントの 24 時間前から絶食させたマウス(FD)と絶食させないマウス(FF)を比較した(Fig.10A)。

体重は、FF 群を計測する際に FD 群も同時に計測した。FF 群は、時間によって体重に変化がみられた(Fig.10B)。ZT0 で高く、ZT12 で低いことから、食餌の影響だと考えられる。また、肝重量は、サンプル時に計測したもので、FF 群と FD 群ともに、時間による影響はみられなかった(Fig.10C)。肝臓の TG 蓄積は、サンプル開始時刻による有意差はみられなかった。しかし、各ポイントにおいて FF 群と FD 群を比較すると、有意に FD 群のほうが蓄積した(Fig.10D)。一方で、血清 TG 蓄積は、FD 群において、ZT6 でサンプルした群が他の時間と比較して有意に高い値を示した。また FF 群と FD 群の間で有意差は確認できなかった(Fig.10E)。two-way-ANOVA で体重、肝重量、肝臓 TG 蓄積では、餌の供給とサンプルの相互作用はみられなかった。以上をまとめると、肝臓 TG 蓄積におけるサンプル時刻に違いはない。また、肝臓 TG 蓄積では、絶食効果が強くあらわれる。

Fig.10 サンプル開始時刻による 24 時間絶食が引き起こす TG 蓄積



N=4

▲: サンプル開始時刻、→: 絶食期間、

FF-FF群(白): 自由摂食、FF-FD群(グレー): 24時間絶食

(A): 実験スケジュール、(B): 体重[g]、(C): 肝重量[%]、サンプル開始時に計測。Y軸は、肝重量/体重×100

(D): 肝臓TG濃度[mg/g]、(E): 血清TG濃度[mg/dl]

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

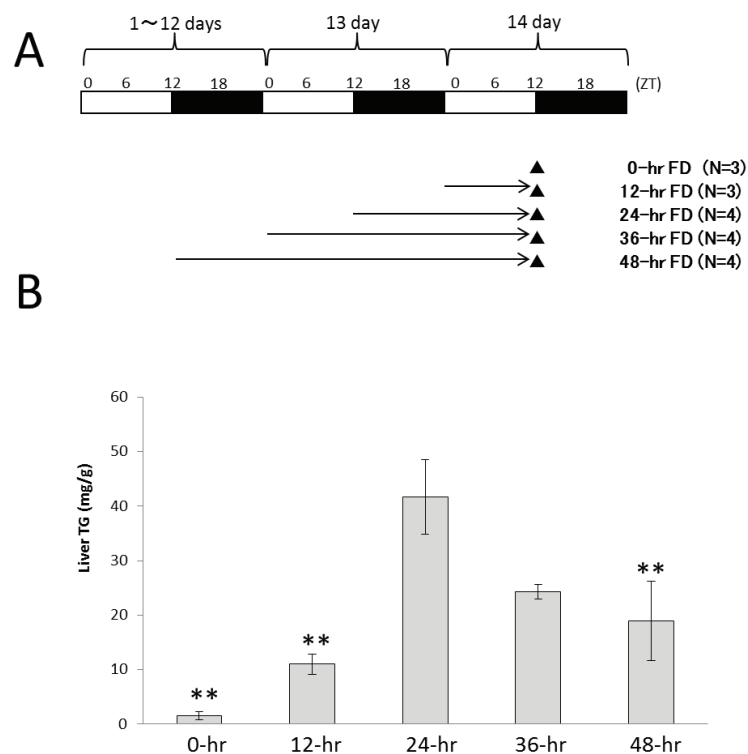
*P<0.05vs.FFZT0群,##P<0.01vs.FF(Tukey-Kramer test)

1-2 絶食時間の長さの検討

絶食時間の長さによる肝臓 TG 蓄積の違いについて絶食時間を 12 時間間隔で検討し、サンプリング時間を ZT12 に固定し、2 週間の自由摂食、自由飲水飼育後実験した (Fig.11A)。絶食時間は、24 時間でもっとも TG 蓄積が高い値を示した。12 時間絶食群では、まだ TG 蓄積が低いながら 24 時間絶食群で 4 倍の蓄積になり 24 時間をすぎた 48 時間絶食状態では、有意に減少し 2 分の 1 程度になった (Fig.11B)。

以上より、絶食時間の長さによって肝臓 TG 蓄積は変化し、24 時間絶食でピークになることがわかった。

Fig.11 絶食時間の長さの肝臓 TG 蓄積



N=3 or 4

▲: サンプリングポイント、→: 絶食期間、ZT0:light on, ZT12:light off
X軸: 絶食時間の長さ、Y軸: 肝臓TG濃度[mg/g]を表す。

(A): 実験スケジュール、(B): 肝臓TG濃度[mg/g]

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

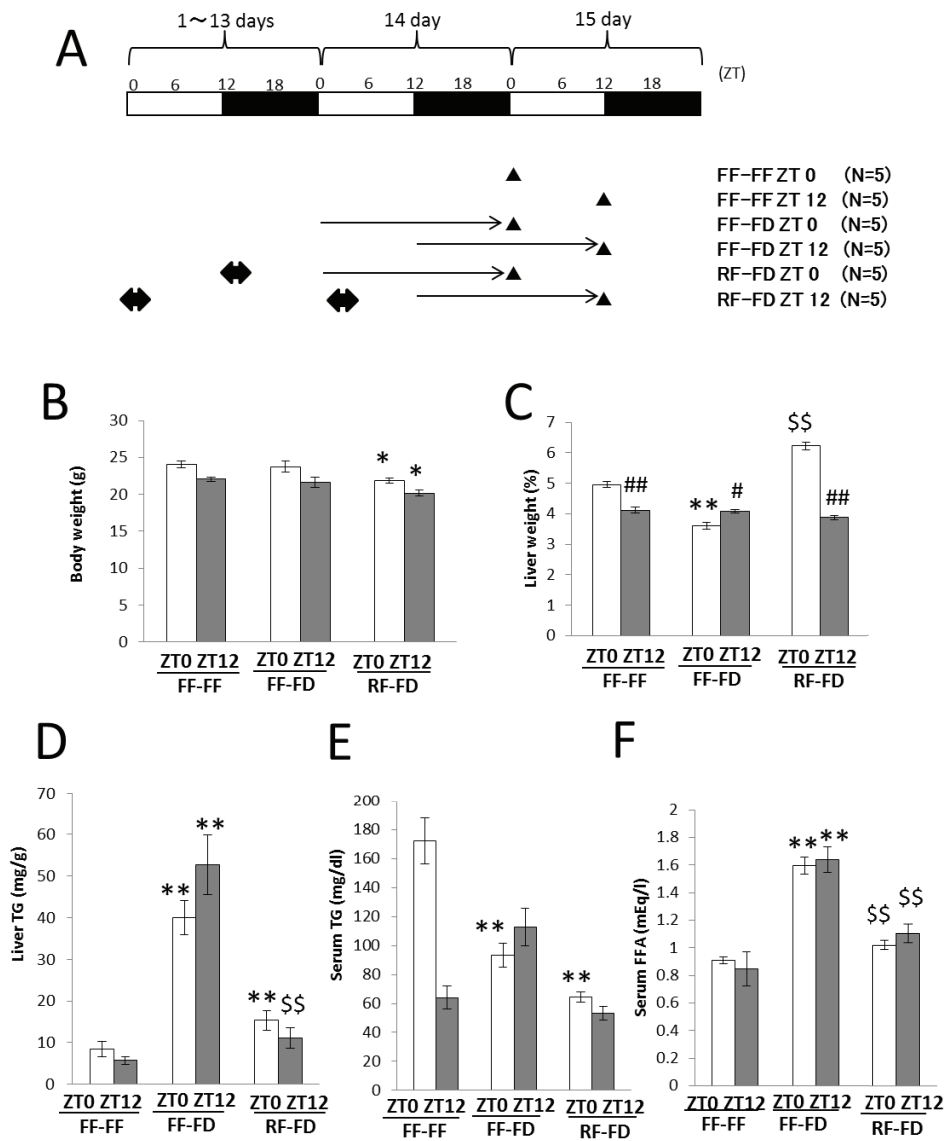
**P<0.01vs.24hs群(Tukey-Kramer test)

1-3-1 朝 1 食と夕 1 食の食習慣による TG 蓄積

食習慣を変えること、すなわち給餌期間を変えることで TG 蓄積に与える影響を検討した。制限給餌装置を用いて給餌タイミングを 2 週間固定し習慣づけて効果を観察した。食習慣として、自由摂食群(FF)、サンプリング前日に 24 時間絶食する群(FD)、朝 1 食群、夕 1 食群それぞれ 3 時間与えてサンプリング前日に 24 時間絶食する群(RF)とする (Fig.12A)。体重は、FF 群と比較して RF 群で有意に減少していた (Fig.12B)。肝重量は、食習慣とサンプリング時間の相互作用があり ($F_{2,24}=102.69$, $P<0.01$)、すべての群で ZT0 と ZT12 に有意な差がみられた。加えて ZT0 の群では、FF 群と RF 群と比較して FD 群で有意に低かった。ZT12 では、有意差はみられなかった (Fig.12C)。肝臓 TG 蓄積は、食習慣による変化がみられたが、ZT0 と ZT12 の間で有意な差はみられなかった。ZT12 で FD 群は FF 群と RF 群より TG 蓄積が有意に高い値を示した。ZT0 では、FF 群と比較して FD 群、RF 群ともに有意に高い値を示した。RF 群は、FF 群と比較すると TG 蓄積は高い値を示すが、FD 群が FF 群に比べて高い値を示すことと比較すると RF 群は、肝臓の絶食性 TG 蓄積を抑制する傾向にあることが示された (Fig.12D)。対照的に、血清 TG 蓄積は、ZT0 で FF 群が FD 群や RF 群と比べて高い値を示した (Fig.12E)。FF 群の ZT0 は、食餌直後のサンプリングのため、血清 TG 蓄積に食餌の影響が反映されている。また、血清 FFA も食習慣による変化はみられ、肝臓 TG 蓄積の結果と類似した結果を得た (Fig.12F)。

以上より、食習慣は体重に影響を及ぼすが、肝臓 TG 蓄積と体重は関係ない。さらに、絶食による肝臓 TG 蓄積増加は朝 1 食、夕 1 食いずれも抑制する。

Fig.12 食習慣による TG 蓄積の変化



N=5、▲ サンプルング、→ 絶食時間、◀▶ 給餌中、ZT0:light on, ZT12: light off
ZT0:(白)、ZT12:(グレー)

FF-FF群: 自由摂食、FF-FD群: 2週間自由摂食後24時間絶食、

RF-FD群: 2週間制限給餌後24時間絶食、

ZT0群は、ZT21-ZT24に給餌、ZT12群は、ZT12-14に給餌。

(A): 実験スケジュール、(B): 体重[g]、(C): 肝重量[%]、サンプルング時に計測。Y軸は、肝重量/体重 × 100

(D): 肝臓TG濃度[mg/g]、(E): 血清TG濃度[mg/dl]、(F): FFA濃度[mEq/l]

それぞれの結果は、平均値 ± SEMで表した。

*P<0.05、**P<0.01vs.FF-FF群、#P<0.05、##P<0.01vs.それぞれのZT0群

\$\$\$P<0.01vsFF-FD群

(Tukey-Kramer test)

1-3-2 肝臓における中性脂肪に関連する mRNA の発現

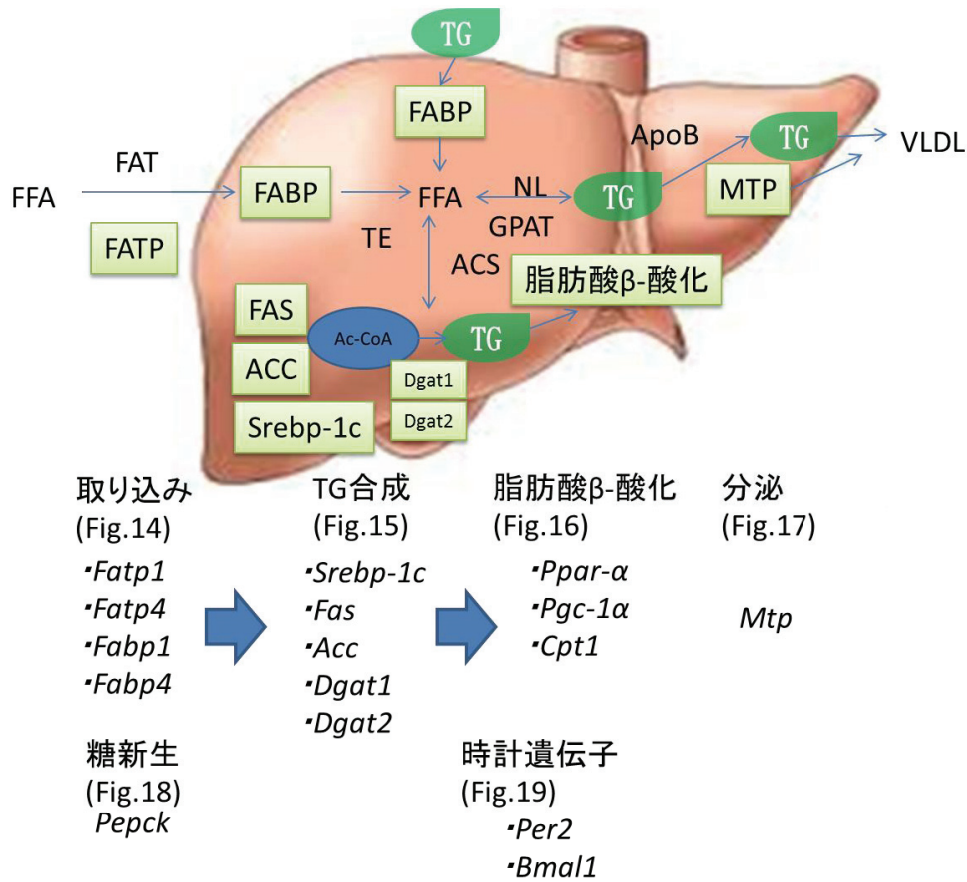
肝臓 TG 蓄積のメカニズムを調べる手段として肝臓の中性脂肪に関する mRNA 発現について、(1)取り込み系(2)合成系(3)脂肪酸 β 酸化(4)分泌系(5)糖新生系(6)時計遺伝子を調べた(Fig.13)。

(1) 肝臓における中性脂肪の取り込み系遺伝子発現への影響

1-3-1 と同様の実験スケジュール下において中性脂肪の取り込み系遺伝子の mRNA 発現を測定した(Fig.14A)。 *Fatp1* mRNA は、食習慣とサンプリング時間によって変化した(Fig.14B)。 ZT0 と ZT12 で、FD 群で FF 群と RF 群と比較して有意に高い値を示した。*Fatp4* mRNA は、食習慣とサンプリング時間間に有意に相互作用がみられた($F_{2,24} = 5.07$, $P < 0.05$)。 FF 群で ZT0 と ZT12 の間で有意に ZT0 が高い値を示し、その ZT0 の群と RF 群の ZT0 を比較すると FF 群のほうが高い値を示した(Fig.14C)。同様に、*Fabp1* mRNA も食習慣とサンプリング時間に有意に相互作用がみられた($F_{2,24} = 8.78$, $P < 0.01$)。 ZT0 で、FF 群が RF 群と比べて有意に値が高く、ZT12 では、FD 群が有意に FF 群と RF 群に比べて低い値を示した。また、RF 群では、ZT0 と ZT12 の間で有意な差がみられた(Fig.14D)。しかし、*Fabp4* mRNA は、食習慣、サンプリング時間どちらの影響も受けなかった(Fig.14E)。

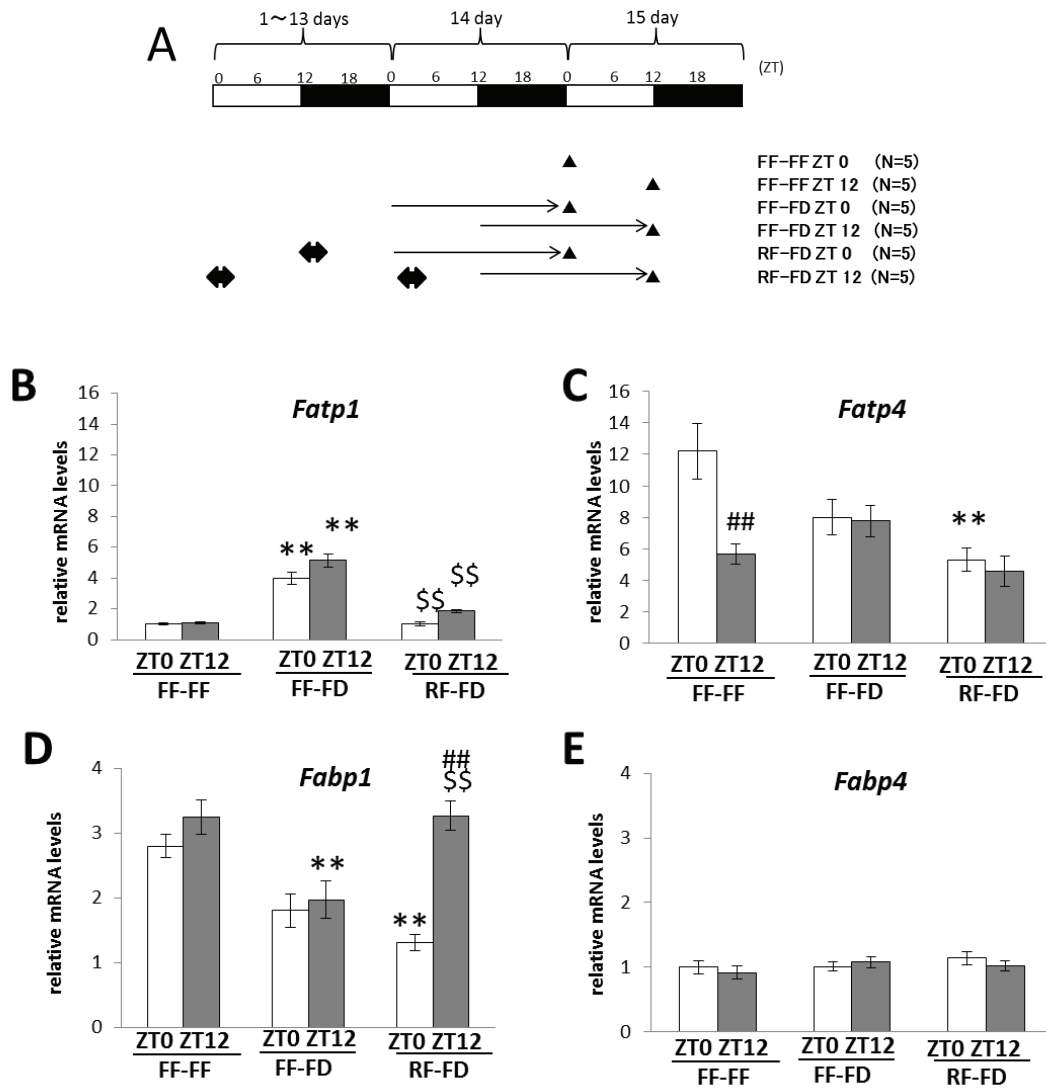
以上の結果より、絶食マウスにおける肝臓 TG 蓄積が多いことは、FFA 流入増加による可能性が示唆できる。また、3 時間制限給餌は、絶食性の FFA 流入を減弱させる可能性が考えられる。

Fig.13 肝臓における中性脂肪に関連する mRNA の発現概略図



- Fatp1; fatty acid transport protein 1
 Fatp4; fatty acid transport protein 4
 Fabp1; fatty acid binding protein 1
 Fabp4; fatty acid binding protein 4
 Srebp-1c; sterol regulatory element binding protein
 Fas; fatty acid synthase
 Acc; acetyl-CoA carboxylase
 Dgat1; diacylglycerol acyltransferase 1
 Dgat2; diacylglycerol acyltransferase 2
 Ppar-α; peroxisome proliferator-activated receptor alpha
 Pgc-1α; peroxisome proliferator-activated receptor coactivator alpha
 Cpt1; carnitine palmitoyltransferase 1
 Mtp; microsomal triacylglycerol-transfer protein
 Pepck; phosphoenolpyruvate carboxykinase
 Per2; period 2
 Bmal1; brain and muscle arnt-like protein 1

Fig.14 肝臓における中性脂肪の取り込み系遺伝子の mRNA の発現



N=5、▲ サンプルング、→ 絶食時間、◀ 給餌中、ZT0:light on, ZT12: light off
Y軸: mRNA発現量

FF-FF群: 自由摂食、FF-FD群: 2週間自由摂食後24時間絶食、

RF-FD群: 2週間制限給餌後24時間絶食、

ZT0群は、ZT21-ZT24に給餌、ZT12群は、ZT12-14に給餌

(A): 実験スケジュール、(B): *Fatp1*、(C): *Fatp4*、(D): *Fabp1*、(E): *Fabp4*

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

**P<0.01vs. FF-FF群, ##P<0.01vs. それぞれのZT0群

\$\$P<0.01vs FF-FD群

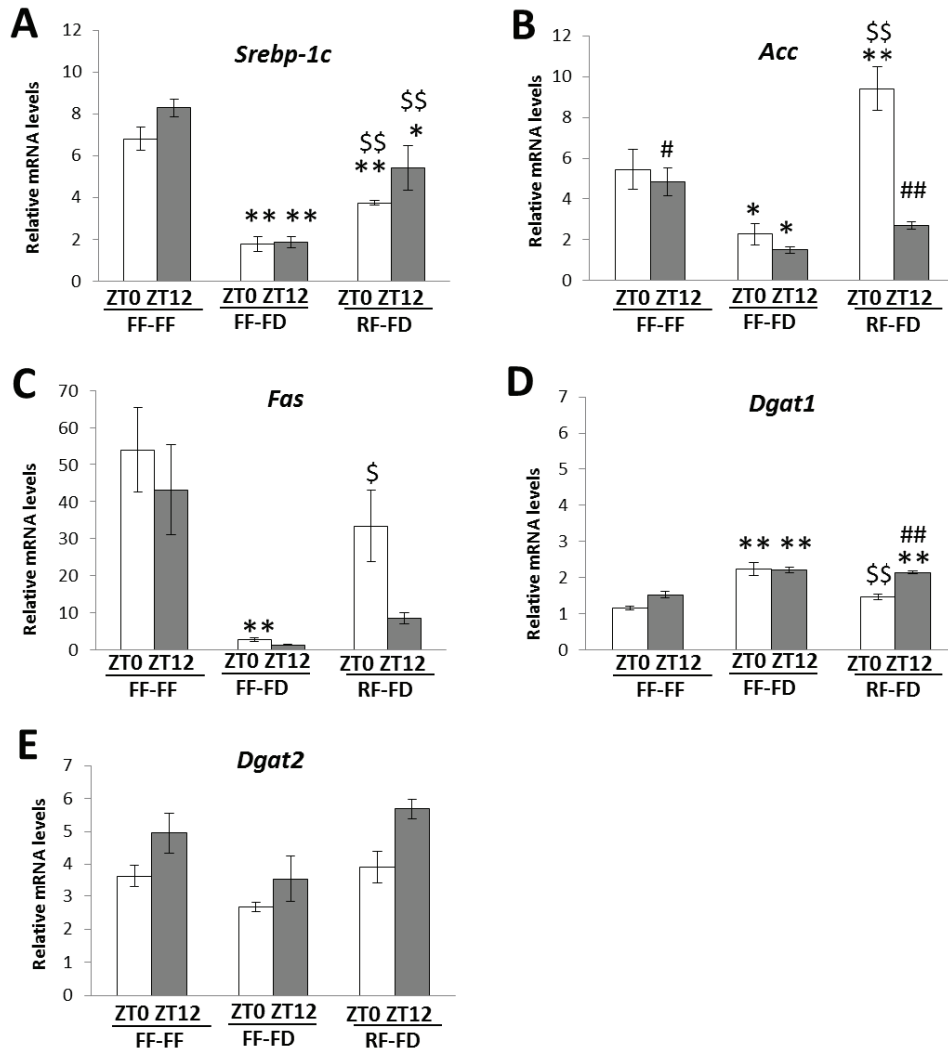
(Tukey-Kramer test)

(2) TG 合成系遺伝子発現への影響

Srebp-1c と *Fas* の mRNA は、食習慣とサンプリング時間で変化したが相互作用はみられなかった (Fig.15A,C)。ZT0 と ZT12 において、*Srebp-1c* mRNA は、FF 群で FD 群と RF 群と比較して有意に高い値を示し、FD 群が最も低い値を示した。*Fas* mRNA は、ZT0 と ZT12 において、FD 群で FF 群や RF 群と比較して低い値を示した。この結果は、*Srebp-1c* mRNA の結果と類似していた。一方で、*Acc* mRNA は、食習慣とサンプリング時間との間に有意に相互作用がみられた ($F_{2,24}=12.54$, $P<0.01$, Fig.15B)。FF 群と RF 群でサンプリング時間に有意に影響を受け、FF 群と FD 群は ZT0、ZT12 ともに FD 群のほうが有意に低い値 ($P<0.05$) を示した。しかし、RF 群と FF 群を比較すると RF 群のほうが ZT0 で有意に高い値を示した ($P<0.01$)。 *Dgat1* mRNA も食習慣とサンプリング時間との間に有意な相互作用がみられた ($F_{2,24}=6.55$, $P<0.01$, Fig.15D)。ZT0 において、FD 群は FF 群と RF 群に比べて有意に高く ($P<0.01$)、ZT12 においては、FF 群が FD 群や RF 群に比べて低い値を示した ($P<0.01$)。RF 群では、サンプリング間で有意に差が認められ、ZT12 のほうが ZT0 に比べて高い値を示した ($P<0.01$)。しかし、*Dgat2* mRNA では、食習慣、サンプリング時間どちらも有意な効果は認められなかった (Fig.15E)。

以上の結果より、*Srebp-1c*、*Acc*、*Fas* は絶食により抑制される。*Srebp-1c*、*Acc*、*Fas* の遺伝子発現の減少は、エネルギー不足による適応応答の可能性はある。朝 1 食、夕 1 食により、適応応答が減弱し、結果的に肝臓 TG を合成しようとする。

Fig.15 TG 合成系遺伝子の mRNA 発現



N=5、ZT0(白)、ZT12(グレー)でサンプリング Y軸:mRNA発現量

FF-FF群: 自由摂食、FF-FD群: 2週間自由摂食後24時間絶食、

RF-FD群: 2週間制限給餌後24時間絶食、

ZT0群は、ZT21-ZT24に給餌、ZT12群は、ZT12-14に給餌。

(A): *Srebp-1c*、(B): *Acc*、(C): *Fas*、(D): *Dgat1*、(E): *Dgat2*

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

*P<0.05、**P<0.01vs.FF-FF群,#P<0.05、##P<0.01vs.それぞれのZT0群

\$P<0.05、\$\$P<0.01vsFF-FD群

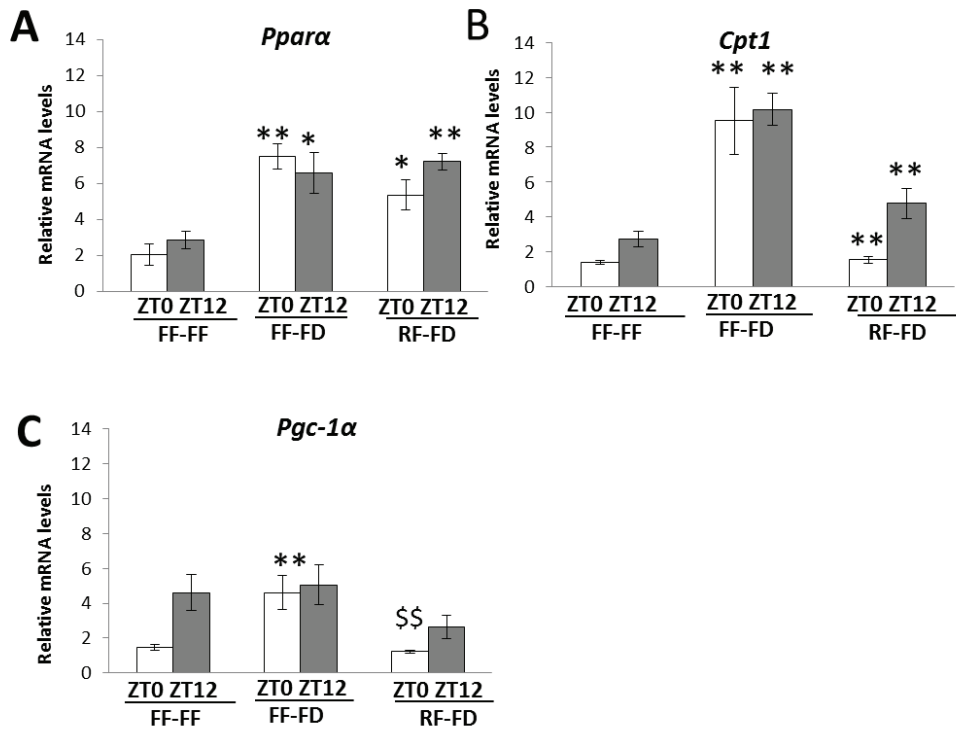
(Tukey-Kramer test)

(3) 脂肪酸 β 酸化遺伝子発現への影響

Ppara mRNA は、すべての群でサンプリング時間に影響はみられなかった。しかし、食習慣による変化がみられ、ZT0 及び ZT12 において FF 群は FD 群や RF 群と比較すると有意に低い値を示した (Fig.16A)。*Cpt1* mRNA は、食習慣とサンプリング時間で変化が見られ、ZT0 と ZT12 において、FF 群は、有意に FD 群、RF 群と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.01$, Fig.16B)。FF 群と比較すると FD 群、RF 群ともに高い値を示すが FD 群と RF 群比較すると、有意な効果はみられず、FD 群で高い値を示す。絶食が誘発する発現増加を食習慣が抑制する可能性を示唆している。*Pgc-1 α* mRNA も、食習慣とサンプリング時間で変化が見られ、ZT0 において、FD 群が FF 群や RF 群と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.01$, Fig.16C)。

以上の結果より、*Ppara*、*Cpt1*、*Pgc-1 α* など β 酸化系の遺伝子発現は増大する。脂肪酸 β 酸化遺伝子も TG 合成遺伝子同様にエネルギー不足への適応応答の可能性が考えられる。朝1食、夜1食の食習慣では、絶食によるエネルギー不足がやや解消され、適応応答が必要なくなる。

Fig.16 脂肪酸β-酸化遺伝子の mRNA 発現



N=5、ZT0(白)、ZT12(グレー)でサンプリング Y軸:mRNAレベル
 FF-FF群:自由摂食、FF-FD群:2週間自由摂食後24時間絶食、
 RF-FD群:2週間制限給餌後24時間絶食、
 ZT0群は、ZT21-ZT24に給餌、ZT12群は、ZT12-14に給餌。

(A): *Ppara*、(B): *Cpt1*、(C): *Pgc-1α*

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

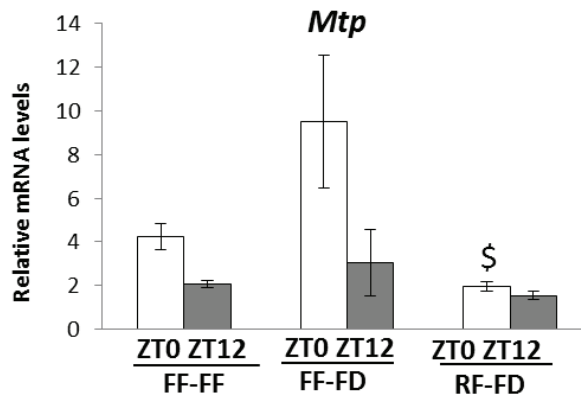
*P<0.05、**P<0.01vs.FF-FF群、\$\$P<0.01vsFF-FD群

(Tukey-Kramer test)

(4) 分泌系遺伝子発現への影響

Mtp mRNA は、食習慣とサンプリング時間によって変化した。ZT0において、FD群がRF群と比較し有意に高い値が観察された ($P < 0.05$, Fig.17)。VLDLによるTGの分泌は、絶食で亢進し、エネルギー供給に寄与する。1食群では、その必要性は低かった。

Fig.17 分泌系遺伝子の mRNA 発現

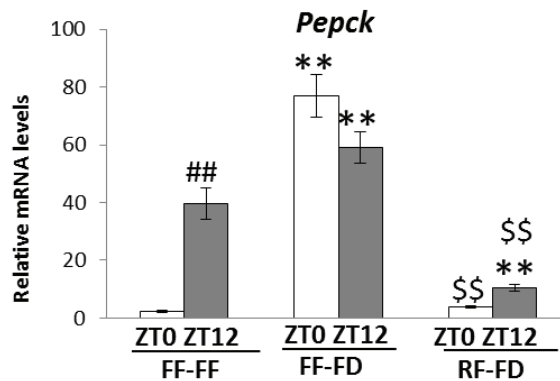


N=5、ZT0(白)、ZT12(グレー)でサンプリング Y軸:mRNAレベル
FF-FF群: 自由摂食、FF-FD群: 2週間自由摂食後24時間絶食、
RF-FD群: 2週間制限給餌後24時間絶食、
ZT0群は、ZT21-ZT24に給餌、ZT12群は、ZT12-14に給餌。
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。
\$ $P < 0.01$ vs FF-FD群 (Tukey-Kramer test)

(5) 糖新生系遺伝子発現への影響

Pepck mRNA は、食習慣とサンプリング時間との間に相互作用がみられた($P_{2,24}=19.86$ 、 $P<0.01$)。ZT0 と ZT12 において、*Pepck* mRNA は、FF 群や RF 群と比較して FD 群で有意に高い値を示した($P<0.01$)。ZT12 では、FF 群と比較して RF 群で有意に低い値を示した($P<0.01$, Fig.18)。1 食の食習慣は、絶食で増加した糖新生を減少させた。糖新生も絶食による促進を 1 日 1 食の食習慣によって抑制する。

Fig.18 糖新生系遺伝子の mRNA 発現

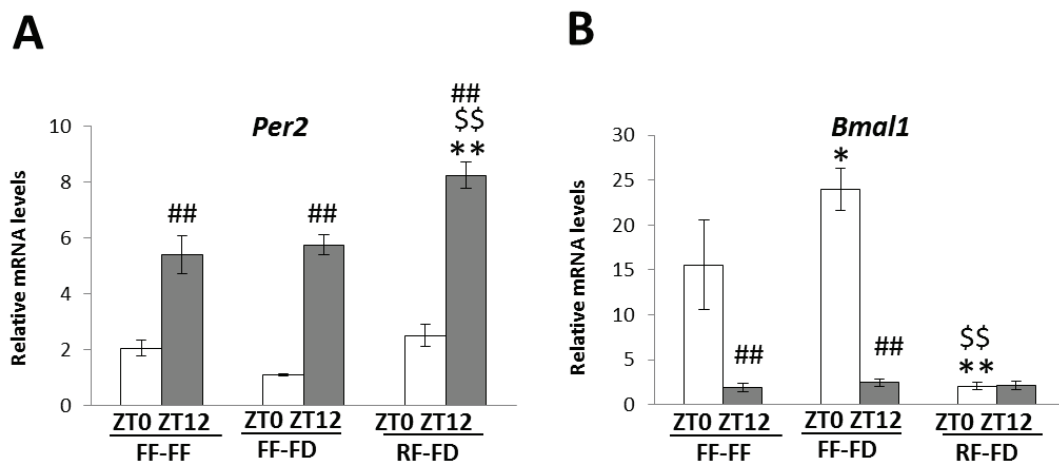


N=5、ZT0(白)、ZT12(グレー)でサンプリング Y軸:mRNAレベル
FF-FF群:自由摂食、FF-FD群:2週間自由摂食後24時間絶食、
RF-FD群:2週間制限給餌後24時間絶食、
ZT0群は、ZT21-ZT24に給餌、ZT12群は、ZT12-14に給餌。
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。
** $P<0.01$ vs. FF-FF群, ## $P<0.01$ vs.それぞれのZT0群
\$\$ $P<0.01$ vs FF-FD群(Tukey-Kramer test)

(6) 時計遺伝子発現への影響

時計遺伝子発現への影響として、*Per2* と *Bmal1* の mRNA 発現について検証した。*Per2* mRNA は、食習慣とサンプリング時間の中に相互作用がみられた ($F_{2,24}=4.210$, $P<0.05$, Fig.19A)。ZT12 において、RF 群は、FF 群、FD 群より有意に高い値を示した ($P<0.01$)。さらに、*Bmal1* mRNA も食習慣とサンプリング時間の中に相互作用がみられた ($F_{2,24}=16.77$, $P<0.01$, Fig.19B)。ZT0 において、RF 群は、FF 群や FD 群と比較して有意に低い値を示し ($P<0.01$)、FD 群は、FF 群と比較して有意に高い値を示した ($P<0.05$)。時計遺伝子発現への影響は、絶食効果よりも、サンプリング時間や食習慣の影響が大きい。

Fig.19 時計遺伝子発現の mRNA 発現



N=5、ZT0(白)、ZT12(グレー)でサンプリング Y軸:mRNAレベル
FF-FF群:自由摂食、FF-FD群:2週間自由摂食後24時間絶食、
RF-FD群:2週間制限給餌後24時間絶食、
ZT0群は、ZT21-ZT24に給餌、ZT12群は、ZT12-14に給餌。

(A): *Per2*、(B): *Bmal1*

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ vs.FF-FF群、## $P<0.01$ vs.それぞれのZT0群

\$\$ $P<0.01$ vsFF-FD群(Tukey-Kramer test)

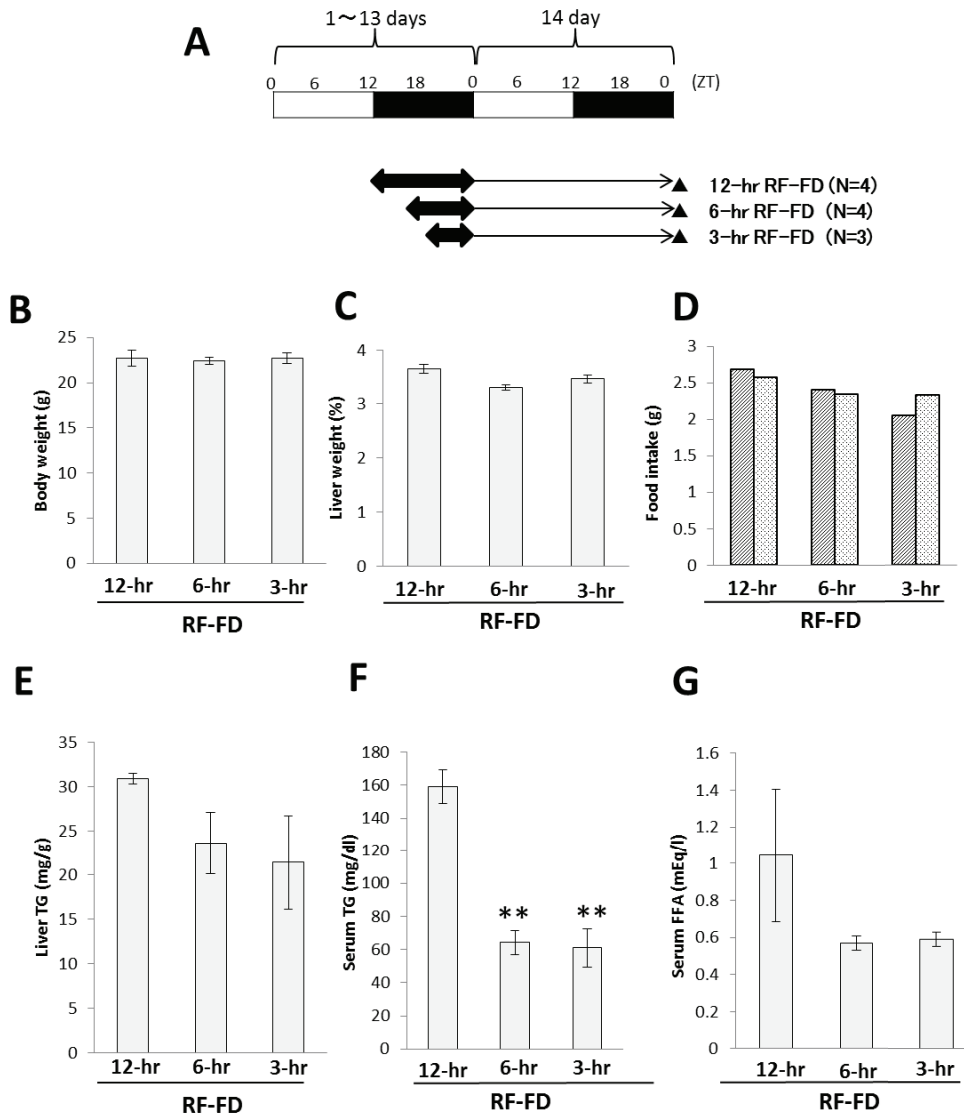
1-4 制限給餌の影響

1-4-1 制限給餌の長さによる影響

制限給餌の長さによる影響について、マウスが通常食行動をする暗期の時間に給餌を制限し検証した。給餌時間を 12 時間給餌(12-hr)、6 時間給餌(6-hr)、3 時間給餌(3-hr)にして 2 週間飼育し 24 時間絶食しサンプリングした(Fig.20A)。すべての群において、体重、肝重量ともに有意な差は見られず同程度の値を示した(Fig.20A、B)。また摂食量も、制限給餌 1 週間目で測定した時は、3-hr 群は給餌にマウスが慣れていないためか他の群と比較すると少ない傾向にあったが、2 週間目では、他の群と変わらない程度に摂食していることがわかった(Fig.20C)。さらに、肝臓 TG 蓄積、血清 TG 蓄積、FFA 測定では、12-hr 群が、他の群より高い値を示した(Fig.20D,E,F)。肝臓 TG 蓄積では、3-hr 群で TG 蓄積を 12-hr 群より抑制した。

以上の結果より、肝臓 TG 蓄積、血清 TG 蓄積、FFA は、摂食量、体重に関わらず、制限給餌によって抑制され、制限給餌の長さは、12 時間よりも短い方が効果が大きい。

Fig.20 制限給餌の時間の長さによる影響



12-hr,6-hr(N=4)、3-hr(N=3)。ZT0でサンプリング。

X軸: RF-FD: 2週間制限給餌後24時間絶食、給餌期間を表した。

12-hr群は、ZT12-ZT24、6-hr群は、ZT18-ZT24、3-hr群は、ZT21-24で給餌。

▲サンプリング時間、→絶食、↔給餌中

(A):実験スケジュール、(B):体重[g]、(C):肝重量[%]、サンプリング時に計測。

Y軸は、肝重量/体重×100。

(D): 1日当たりのマウスの摂食量。飼育1週間(斜線)、飼育2週間(格子)。

摂食量/day/mouse。

(E): 肝臓TG濃度[mg/g]、(F): 血清TG濃度[mg/dl]、(G): FFA濃度[mEq/l]

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

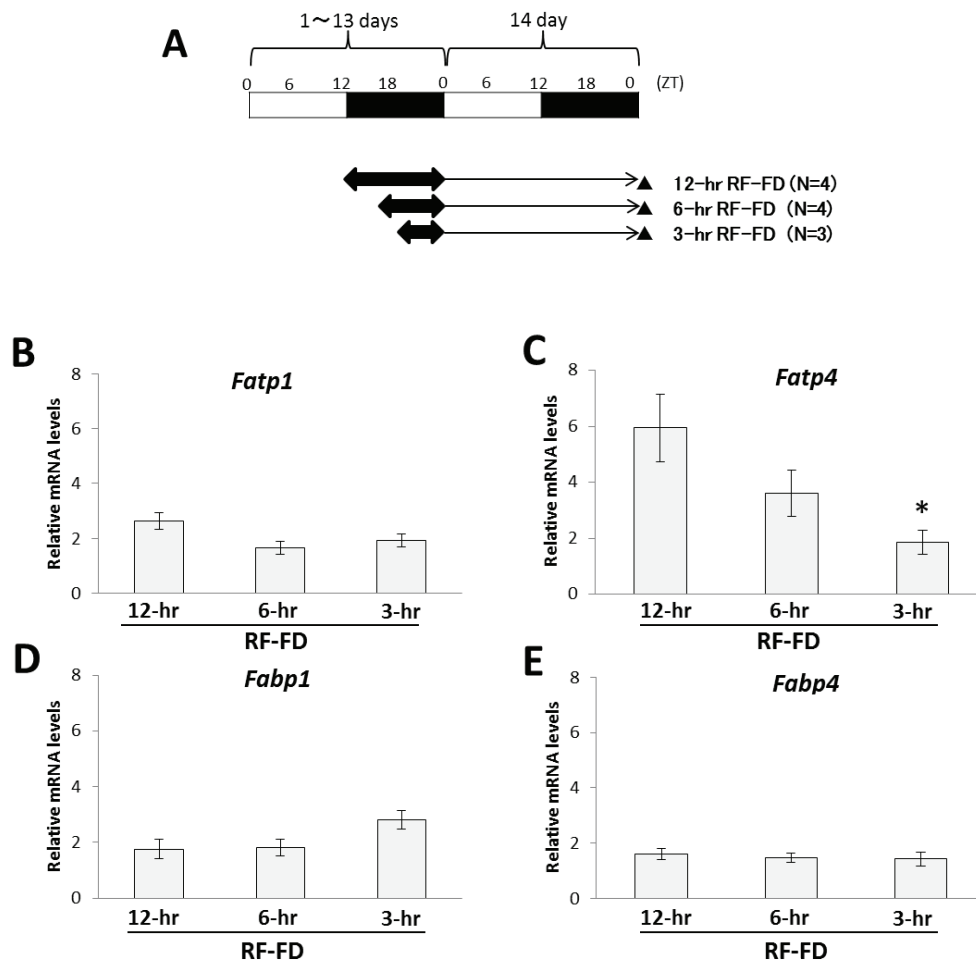
**P<0.01vs.12-hr群(Tukey-Kramer test)

1-4-2 肝臓における中性脂肪に関連する mRNA の発現

(1) 取り込み系遺伝子発現への影響

1-3-2 と同様に、中性脂肪に関連する mRNA の発現を検証した。*Fatp4* mRNA で 3-hr 群が 12-hr 群と比較して有意に低い値を示した(P<0.05, Fig.21C)が、他の遺伝子発現は、全ての群で同程度の値を示した(Fig.21B,D,E)。*Fatp4* の遺伝子発現のみ制限給餌の違いによる効果がみられた。他の 3 遺伝子発現の影響は見られなかったことから、制限給餌の時間の長さはあまり関与しないと考えられる。

Fig.21 取り込み系遺伝子のmRNA 発現



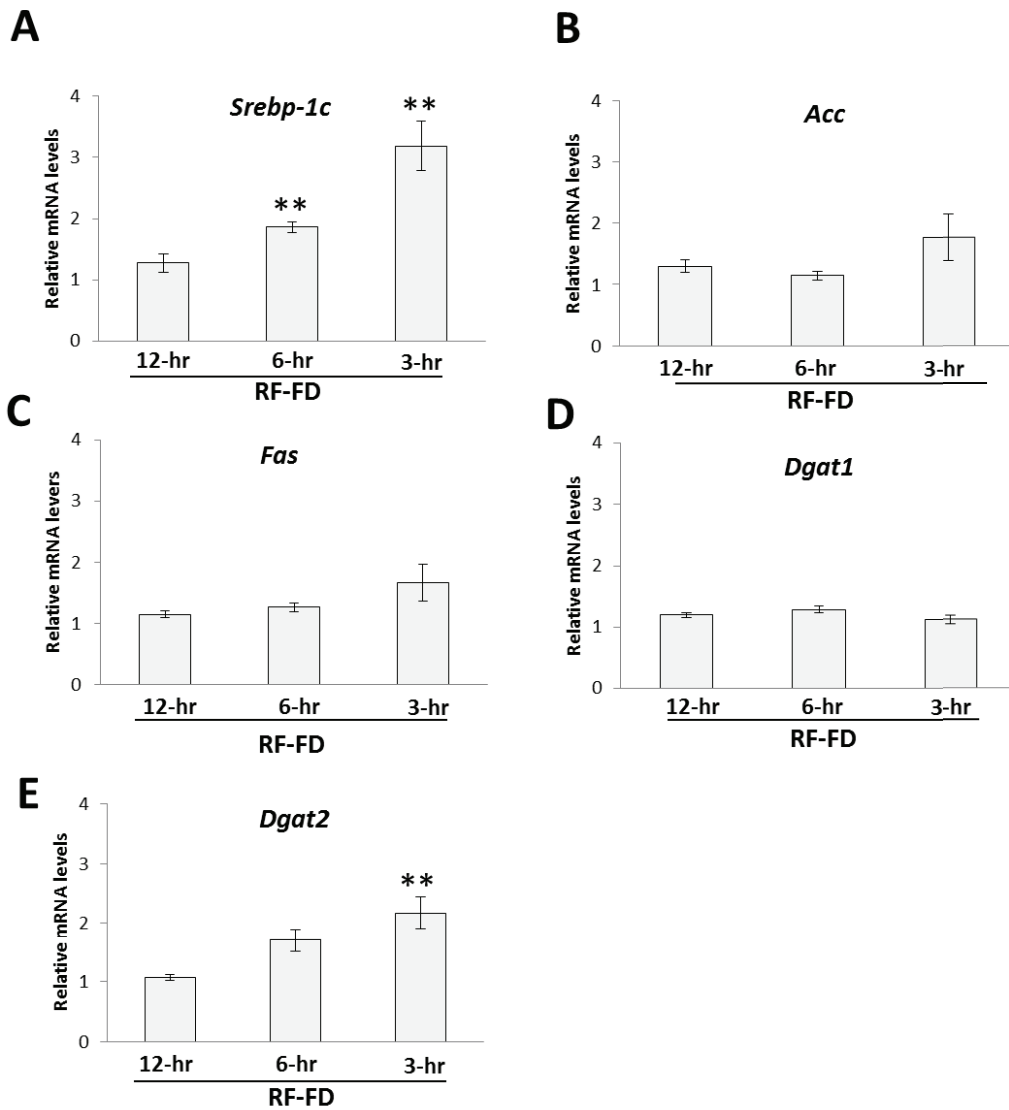
12-hr,6-hr(N=4)、3-hr(N=3)。ZT0でサンプリング Y軸: mRNAレベル
X軸: RF-FD: 2週間制限給餌後24時間絶食、給餌期間を表した。
▲サンプリング時間、→絶食、◄給餌中
12-hr群は、ZT12-ZT24、6-hr群は、ZT18-ZT24、3-hr群は、ZT21-24で給餌。
(A): *Fatp1*、(B): *Fatp4*、(C): *Fabp1*、(D): *Fabp4*
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。
*P<0.05vs.12-hr群(Tukey-Kramar test)

(2) TG 合成遺伝子発現への影響

TG 合成遺伝子発現は、*Srebp-1c* mRNA が、3-hr 群や 6-hr 群で 12-hr 群より有意に高い値を示した(P<0.01, Fig.22A)。また、*Dgat2* mRNA でも、3-hr 群が 12-hr 群より有意に高い値を示した(P<0.01, Fig.22E)。他の TG 合成遺伝子発現は、全ての群間で有意な効果はみられなかった(Fig.22B-D)。

以上の結果より、*Srebp-1c* と *Dgat2* の遺伝子発現は、制限給餌時間が短くなるにつれて発現が高くなる。給餌時間が短いことで、常にエネルギー不足状態にあり(エネルギー耐性)、絶食効果をうけにくいことがわかった。

Fig.22 TG 合成系遺伝子のmRNA 発現

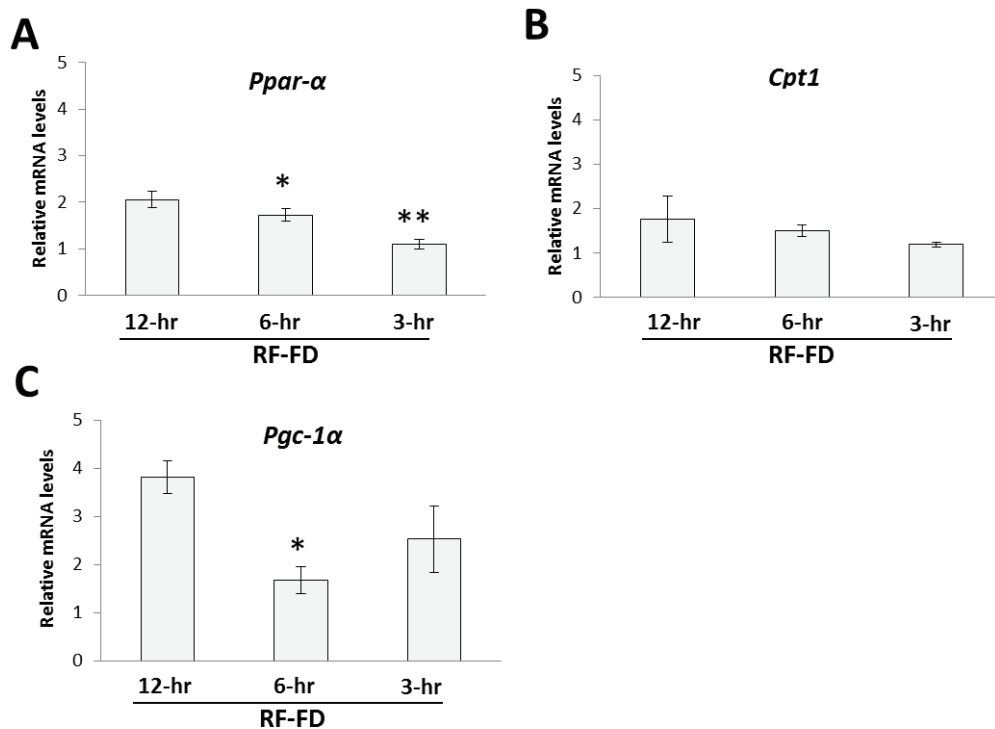


12-hr,6-hr(N=4)、3-hr(N=3)。ZT0でサンプリング Y 軸: mRNAレベル
X軸: RF-FD: 2週間制限給餌後24時間絶食、給餌期間を表した。
12-hr群は、ZT12-ZT24、6-hr群は、ZT18-ZT24、3-hr群は、ZT21-24で給餌。
(A): *Srebp-1c*、(B): *Acc*、(C): *Fas*、(D): *Dgat1*、(E): *Dgat2*
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。
**P<0.01vs.12-hr群(Tukey-Kramer test)

(3) 脂肪酸β酸化遺伝子発現への影響

脂肪酸β酸化遺伝子発現への影響を検証した。*Ppar-α* mRNAは、12-hr群が6-hr群や3-hr群と比較して有意に高い値を示した(Fig.23A)。*Pgc-1α* mRNAは、6-hr群と比較して12-hr群が有意に高い値を示した($P<0.05$, Fig.23C)。*Cpt1* mRNAは、全ての群間で異なる影響はみられなかった(Fig.23B)。制限給餌時間の長さが短い方が、脂肪酸β酸化遺伝子発現を減少させる。

Fig.23 脂肪酸β酸化遺伝子の mRNA 発現

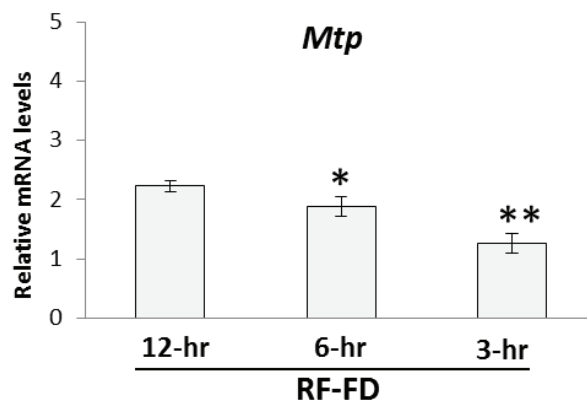


12-hr,6-hr(N=4)、3-hr(N=3)。ZT0でサンプリング Y軸: mRNAレベル
X軸: RF-FD: 2週間制限給餌後24時間絶食、給餌期間を表した。
12-hr群は、ZT12-ZT24、6-hr群は、ZT18-ZT24、3-hr群は、ZT21-24で給餌。
(A): *Ppara*、(B): *Cpt1*、(C): *Pgc-1α*
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。
* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ vs.12-hr群(Tukey-Kramer test)

(4) 分泌系遺伝子発現への影響

分泌系遺伝子発現への影響として *Mtp* mRNA を検証した。脂肪酸β酸化遺伝子の *Ppar-α* mRNA の結果と同様に 12-hr 群が 6-hr 群や 3-hr 群と比較して有意に高い値を示した (Fig.24)。絶食による効果を制限給餌時間の長さが短くなるにつれて抑制した。

Fig.24 分泌系遺伝子のmRNA 発現

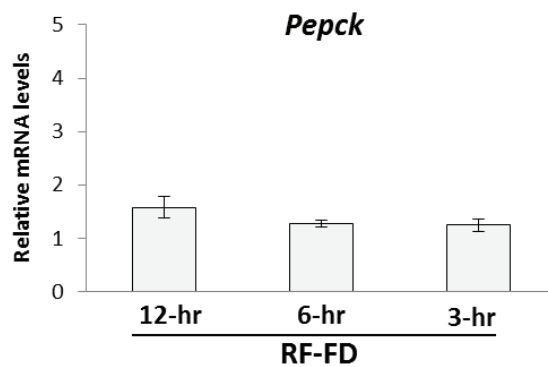


12-hr,6-hr(N=4)、3-hr(N=3)。ZT0でサンプリング Y軸:mRNA
X軸:RF-FD:2週間制限給餌後24時間絶食、給餌期間を表した。
12-hr群は、ZT12-ZT24、6-hr群は、ZT18-ZT24、3-hr群は、ZT21-24で給餌。
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。
*P<0.05、**P<0.01vs.12-hr群(Tukey-Kramer test)

(5) 糖新生の遺伝子発現への影響

糖新生の遺伝子発現への影響として *Pepck* mRNA を検証した。全ての群間において、同程度の発現が見られ、有意な差はなかった(Fig.25)。

Fig.25 糖新生系遺伝子のmRNA 発現



12-hr,6-hr(N=4)、3-hr(N=3)。ZT0でサンプリング Y軸: mRNA
X軸: RF-FD: 2週間制限給餌後24時間絶食、給餌期間を表した。
12-hr群は、ZT12-ZT24、6-hr群は、ZT18-ZT24、3-hr群は、ZT21-24で給餌。
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

小括：第1節 絶食性 TG 蓄積

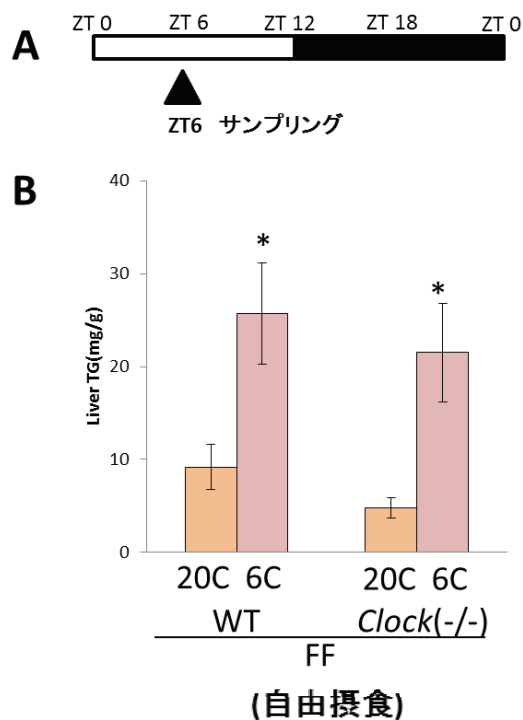
- ・ 絶食で肝臓 TG 蓄積が増加する
- ・ 絶食時間 24 時間で肝臓 TG 蓄積はピークになる
- ・ 朝 1 食、夕 1 食の食習慣は、絶食によるエネルギー不足がやや解消され適応反応の必要性がなくなる
- ・ *Srebp-1c*、*Acc*、*Fas* の遺伝子発現は絶食によって減少し、*Ppara*、*Cpt1*、*Pgc-1 α* など β 酸化系遺伝子発現は増加する
- ・ 24 時間絶食による遺伝子発現への影響は、エネルギー不足への適応応答の可能性はある
- ・ 朝 1 食、夕 1 食の食習慣は、エネルギー不足が習慣になっているため、エネルギー耐性があり、エネルギー不足への適応応答が減弱する

第2節 時計遺伝子変異マウス *Clock(-/-)*マウスの肝臓 TG 蓄積

2-1 低タンパク質食による影響

時計遺伝子変異マウス *Clock(-/-)*を用いて、低タンパク質食による肝臓 TG 蓄積を検討した。WT マウス同様に *Clock(-/-)*マウスでも 20%カゼイン食と比較して 6%カゼイン食は有意に TG 蓄積が高くなった($P < 0.05$, Fig.26)。低タンパク質食では WT マウス同様に *Clock(-/-)*マウスでも肝臓 TG 蓄積が増加する。

Fig.26 時計遺伝子変異マウス *Clock(-/-)*マウスの肝臓 TG 蓄積

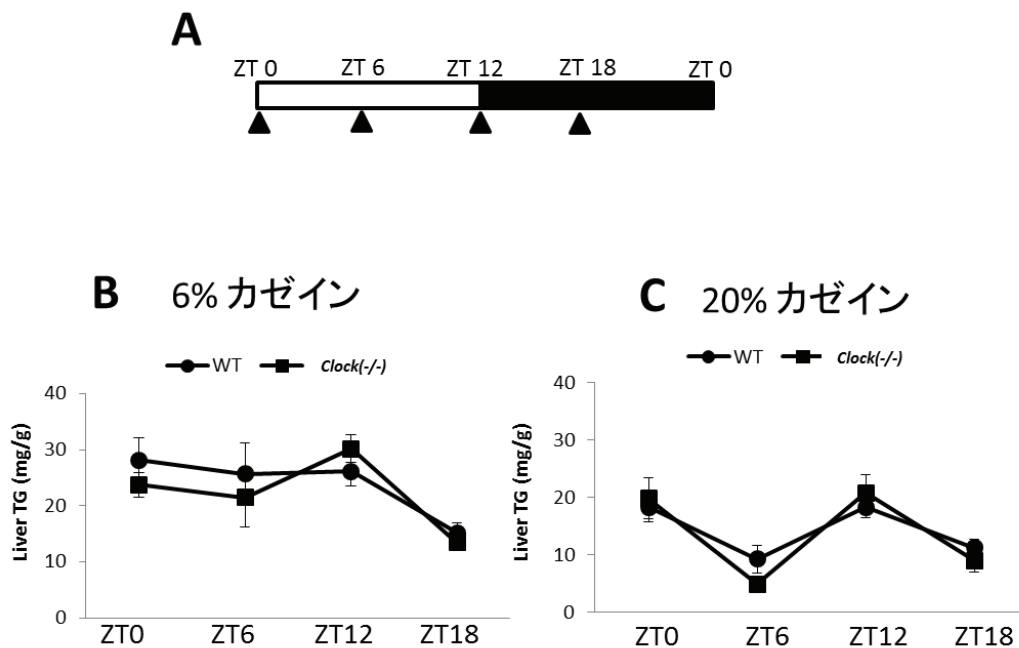


N=4。ZT6でサンプリング。FF:自由摂食、X軸:2週間飼育した餌
X軸:20Cは、20%カゼイン食(オレンジ)、6Cは、6%カゼイン食(ピンク)
Y軸:肝臓TG蓄積
(A):実験スケジュール、(B):肝臓TG蓄積[mg/g]
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。
* $P < 0.05$ vs.それぞれの20%カゼイン食群(Tukey-Kramer test)

2-2 サンプルング時間による影響

サンプルング時間を ZT0,ZT6,ZT12,ZT18 と 4 ポイントで肝臓 TG 蓄積を検討した (Fig.27A)。また、6%カゼイン食、20%カゼイン食、両方で検証を行った (Fig.27B、C)。6%カゼイン食のほうがサンプルング時間による影響を強く受ける傾向にあった。また、6%カゼイン食群、20%カゼイン食群ともに、*Clock(-/-)*マウス群が、WT マウス群と比較して、肝臓 TG 蓄積が小さい傾向にあった。

Fig.27 サンプルング時刻による肝臓 TG 蓄積



N=4。2週間の自由摂食後サンプルング。

Y軸: 肝臓TG蓄積[mg/g]、X軸: サンプルングポイントのZT0、ZT6、ZT12、ZT18

(A): 実験スケジュール、▲ サンプルング、ZT0: light on, ZT12: light off

(B): 6%カゼイン食群、(C): 20%カゼイン食群、WTマウス(●)、*Clock(-/-)*マウス(■)
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

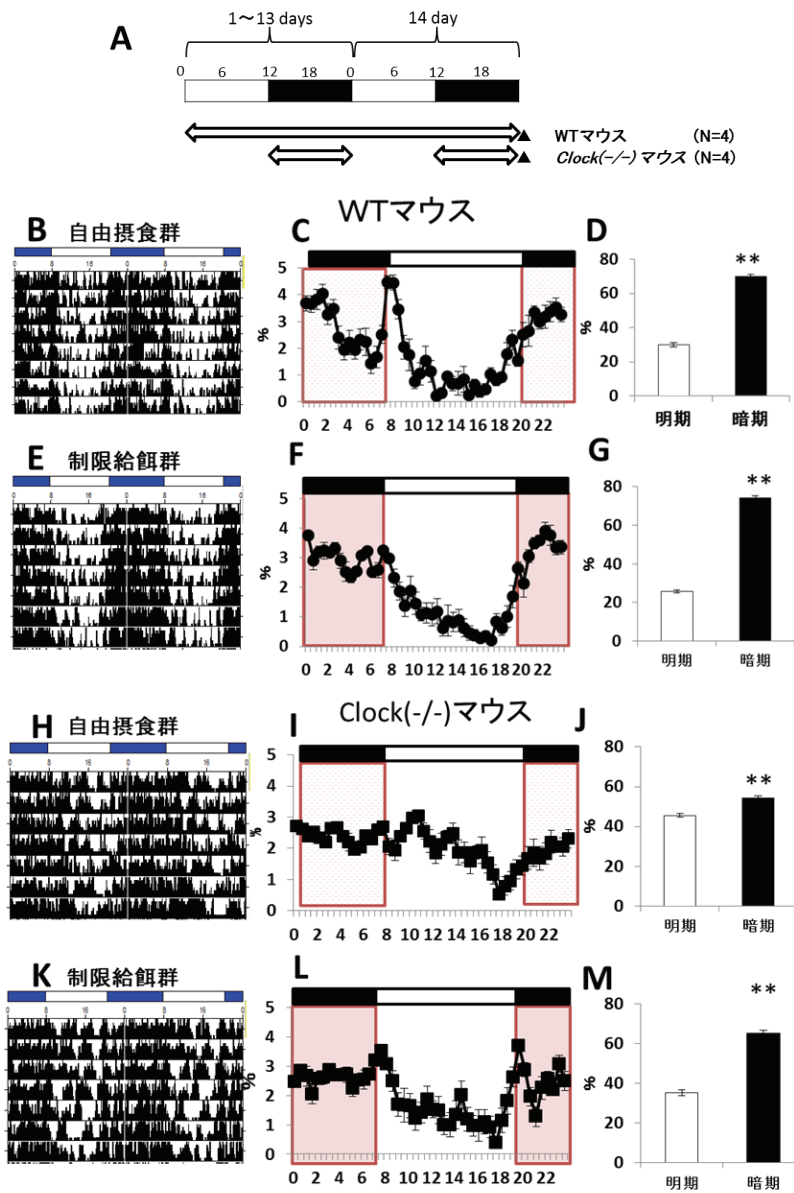
2-3 制限給餌による影響

2-3-1 6%カゼイン食による影響

Clock(-/-)マウスを用いてマウスの活動期である暗期に12時間制限給餌を行いその効果を検証した(Fig. 28A)。*Clock*(-/-)マウスがWTマウスと比較して肝臓TG蓄積が抑制されることに関して、*Clock*(-/-)マウスの食行動と関連があると仮説のもと、*Clock*(-/-)マウスに、マウスの非活動期である明期に摂食できないようにし、暗期12時間のみ摂食するように制限給餌をした。すると、まず、6%カゼイン食群で、行動の観察を行った。WTマウスに自由摂食を施すと、暗期に活動が集中し、明期は活動量が減弱していることが観察された(Fig.28B-D)。さらに制限給餌を施すと、給餌した時間により活動し、明期と暗期の活動量が有意に増加する($P<0.01$ 、Fig.28E,G)。一方で、*Clock*(-/-)マウスに自由摂食させると、活動期の暗期と非活動期の明期にともに50%前後といった同程度の活動量が観察された(Fig.28H-J)。しかし、制限給餌を施すと、給餌した時間の暗期により活動し、明期の活動が減弱し、活動量に明期と暗期で有意な差がWT同様に強くみられた($P<0.01$ 、Fig.28K-M)。肝臓のTG蓄積は、WTマウスでは、FF群、12時間暗期制限給餌群ともに同程度の蓄積を示したのに対して*Clock*(-/-)マウスでは、FF群でWTマウスよりTG蓄積が抑制されているが、12時間暗期制限給餌することで、制限給餌の影響は弱いWTマウスと同程度のTG蓄積がみられた(Fig.29)。

以上の結果より、WTマウスは、暗期に活動し明期に非活動で、活動期と非活動期が明確である。*Clock*(-/-)マウスは、行動リズムがランダムで1日中活動しているが制限給餌によって、活動期と非活動期が明確になった。

Fig.28 6%カゼイン食による制限給餌行動観察



N=4。WTマウス(●)、*Clock(-/-)*マウス(■)

(A):実験スケジュール、 \longleftrightarrow 給餌

自由摂食群(WTマウス: B,C,D、*Clock(-/-)*: H,I,J)

制限給餌群(WTマウス: E,F,G、*Clock(-/-)*: K,L,M)、マウスの活動期の12時間給餌した。

(B,E): WTマウスのアクトグラム、(C,F): WTマウスの活動量(%)の日内変動、

Y軸: 時刻の活動量/1日の活動量 $\times 100$ 、X軸: 実時刻、網掛け部分は、給餌を表す。

(D,G): WTマウスの活動量(%)の昼夜差、ZT0-ZT12を明期(白)、ZT12-ZT24を暗期(黒)、

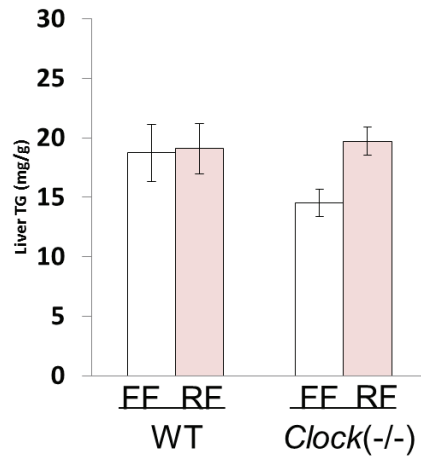
Y軸: 明期もしくは暗期の活動量/1日の活動量 $\times 100$

(H,K): *Clock(-/-)*マウスのアクトグラム、(I,L):*Clock(-/-)*マウスの活動量(%)の日内変動、

(J,M): *Clock(-/-)*マウスの活動量(%)の昼夜差

それぞれの結果は、平均値 \pm SEMで表した。** $P < 0.01$ vs. 明期(Tukey-Kramer test)

Fig.29 6%カゼイン食による制限給餌の肝臓 TG 蓄積



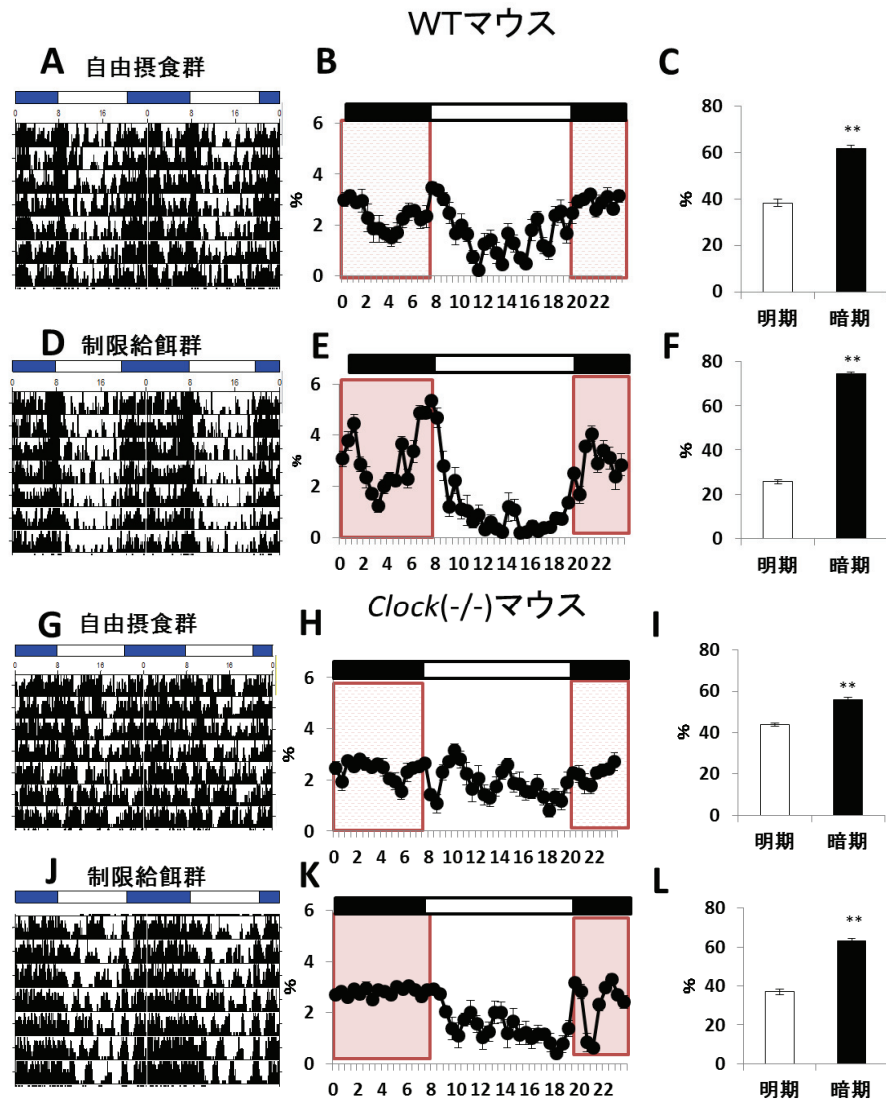
N=4。ZT0でサンプリング。Y軸: 肝臓TG蓄積[mg/g]
FF:自由摂食(白)、RF:制限給餌(ピンク)、マウスの活動期の12時間給餌
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

2-3-2 20%カゼイン食による影響

6%カゼイン食で行った、制限給餌による *Clock(-/-)*マウスの肝臓 TG 蓄積への影響について 20%カゼイン食を与えて同様行った。すると、行動観察では、WT マウスに自由摂食を施すと、6%カゼイン食群と比較すると少し暗期と明期の活動の差が弱まるが、暗期に活動し、明期は活動量が弱いことが観察された(Fig.29A-C)。さらに制限給餌を施すと、給餌した時間により活動し、明期と暗期の活動量が有意に増加する($P<0.01$ 、Fig.29D-F)。一方で、*Clock(-/-)*マウスに自由摂食させると、6%カゼイン食群同様に活動期の暗期だけでなく非活動期の明期にも同程度の活動量が観察された(Fig.29G-I)。活動量に明期と暗期では、暗期のほうが有意に活動量の割合が高いが、WT マウスの活動量の昼夜差ほど明確ではなく明期は 45%前後、暗期は 55%前後を観察した。しかし、制限給餌を施すと、給餌した時間の暗期により活動し 65%前後になり、明期の活動がやや減弱し 35%前後で、活動量に明期と暗期で有意な差がみられた($P<0.01$ 、Fig.29J-L)。肝臓の TG 蓄積は、WT マウス、*Clock(-/-)*マウスともに、FF 群に比べて、12 時間暗期制限給餌群で TG 蓄積が有意に増加を示したが($P<0.01$)、制限給餌の影響は、WT マウス、*Clock(-/-)*マウス両方とも顕著にあらわれた(Fig.30)。

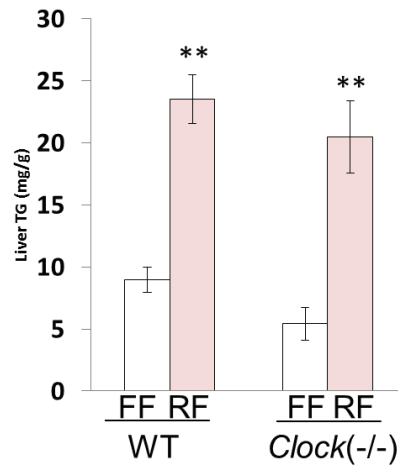
以上の結果より、6%カゼイン食群でみられたように、WT マウスでは、活動期、非活動期が明確である。*Clock(-/-)*マウスでは、活動期、非活動期の差があまりないが、制限給餌により、活動に明確な差がみられ、20%カゼイン食の方が制限給餌の影響が強くあらわれる。しかし、制限給餌の影響は、WT マウスとあまり変わらない。

Fig.29 20%カゼイン食の制限給餌による行動への影響



N=4。WTマウス(●)、Clock(-/-)マウス(■)
 自由摂食群(WTマウス: A,B,C、Clock(-/-): G,H,I)
 制限給餌群(WTマウス: D,E,F、Clock(-/-): J,K,L)、マウスの活動期の12時間給餌した。
 (A,D): WTマウスのアクトグラム、(B,E): WTマウスの活動量(%)の日内変動、
 Y軸: 時刻の活動量/1日の活動量×100、X軸: 実時刻、網掛け部分は、給餌を表す。
 (C,F): WTマウスの活動量(%)の昼夜差、ZT0-ZT12を明期(白)、ZT12-ZT24を暗期(黒)、
 Y軸: 明期もしくは暗期の活動量/1日の活動量×100
 (G,K): Clock(-/-)マウスのアクトグラム、(H,L):Clock(-/-)マウスの活動量(%)の日内変動、
 (I,J): Clock(-/-)マウスの活動量(%)の昼夜差
 それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。**P<0.01vs.明期(Tukey-Kramer test)

Fig.30 20%カゼイン食の制限給餌による肝臓 TG 蓄積への影響



N=4。ZT0でサンプリング Y軸: 肝臓TG蓄積[mg/g]

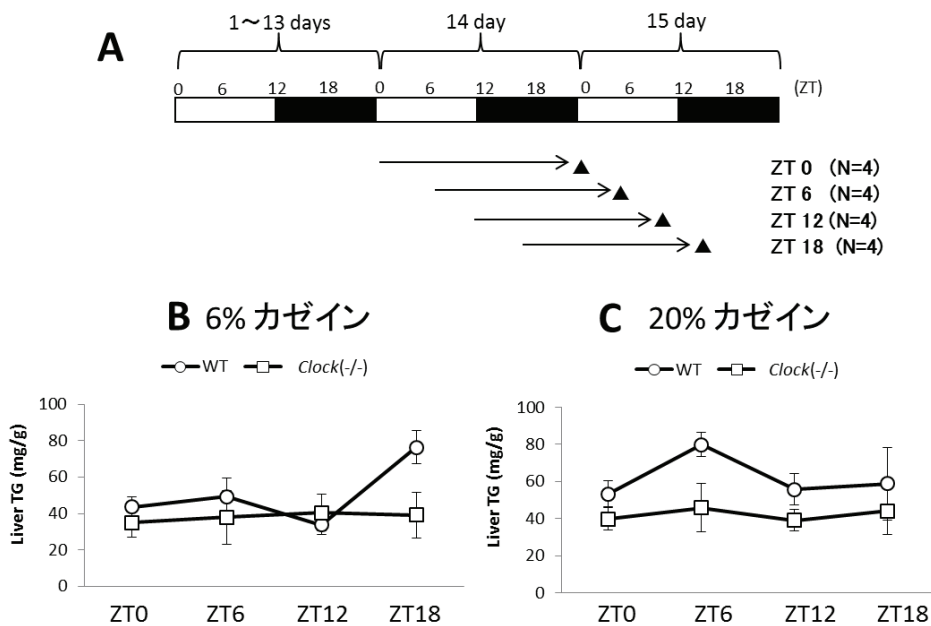
FF:自由摂食(白)、RF:制限給餌(ピンク)、マウスの活動期の12時間給餌
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

**P<0.01vs.FF群(Tukey-Kramer test)

2-4 絶食による影響

タンパク質含有量を変化させかつ24時間の絶食を加えることで時計遺伝子変異マウスの *Clock(-/-)* で、肝臓 TG 蓄積に与える影響について、6%カゼイン含有食、20%カゼイン食を2週間摂食させ、24時間絶食をしサンプリングを行い検証した(Fig.31A)。WTマウスでは、6%カゼイン食で、ZT18により絶食性が強く影響しTG蓄積を増加させた(Fig.31B)。しかし、20%カゼイン食では、サンプリング時間によらず絶食の影響を受け、ZT6では特にTG蓄積が増加することがわかった(Fig.31C)。一方で、*Clock(-/-)*マウスでは、6%カゼイン食群、20%カゼイン食群のどちらもサンプリング時間や絶食の影響をほとんど受けず、さらに、WTマウスと比較するとTG蓄積抑制傾向がみられた。

Fig.31 低タンパク質食で絶食した肝臓 TG 蓄積



N=4。2週間の自由摂食後24時間絶食しサンプリング

(A): 実験スケジュール: →絶食、▲サンプリング、ZT0:light on、ZT12: light off
X軸:サンプリングポイントZT0、ZT6、ZT12、ZT18、Y軸:肝臓TG蓄積[mg/g]

(B):6%カゼイン食群、(C):20%カゼイン食群、WTマウス(○)、*Clock(-/-)*マウス(□)
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した。

小括：第2節 時計遺伝子変異マウス *Clock(-/-)*マウスの

肝臓 TG 蓄積

- WT マウス同様に、低タンパク質食(6%カゼイン食)で肝臓 TG 蓄積は増加する
 - WT マウスより肝臓 TG 蓄積をタンパク質含有量によらず抑制する
 - サンプルング時間の影響は、低タンパク質食が受けやすい
 - 自由摂食条件下では、1日中活動し、活動に昼夜の差がほとんどないが、制限給餌条件下では、活動に昼夜の差が明確になる
 - 制限給餌により、肝臓 TG 蓄積抑制効果が減弱する
 - 制限給餌の影響は、20%カゼイン食の方が受けやすい
- ランダムに摂食することが肝臓 TG 蓄積抑制効果の要因と考えられる

4. 第2章 考察

実験1で行った自由摂食群と24時間絶食群の比較では、明らかに絶食群が肝臓のTG蓄積の増加につながった。しかし、絶食のタイミングつまりどの時刻から24時間の絶食を施しても肝臓TG蓄積への影響はほとんどみられなかった。絶食はタイミングから独立して肝臓TG蓄積を増加する。したがって、概日時計システムは、絶食により誘発される肝臓TG蓄積を制御する可能性はないことが示唆された。実験3で、夕食のみ及び朝食のみの摂食パターンが24時間絶食の誘発する肝臓へのTG蓄積増加を減弱することを本研究で証明した。マウスは通常、覚醒期の始めごろの食餌は、覚醒期の終わりの食餌と比べて、覚醒期の終わりで制限給餌を行うと、活動リズムや時計遺伝子発現を変化させることが知られている(Shibata S et al., 2010)、また、近年では、覚醒期の始めに高脂肪食を与えられたマウスが、覚醒期の終わりの食餌に対して柔軟な代謝を保持すること(Bray MS et al., 2010)が報告されている。さらに、覚醒期後半の1日2食の食餌群が、覚醒期の前半に2食の食餌群や覚醒期に3食食餌群と比較して高い脂肪蓄積を示すことがラットを用いた研究で明らかにされている(Turkish AR. 2008)。加えて、マウスで覚醒期の終わりでの乳脂肪の摂取は、脂肪肝に繋がり、血清TGとFFAを増加させた(Wang X et al., 2013)。これらの報告と本研究で得られて結果から、食餌のタイミングは、絶食が誘因する脂肪肝ではなく高脂肪食で影響を及ぼすということを示した。一方で、給餌時間の制限は、自由摂食群と比較すると、絶食が誘発する肝臓TG蓄積を軽減した。3時間の制限給餌群の摂食量は、実験中の1週目では、その給餌パターンに慣れていないためか少なかったが、2週目で自由摂食群同様レベルまで増加した。また、体重は、自由摂食群の約86-92%であった。体重と肝臓TGの間の相関は、全実験マウスで有意な差はみられなかった。近年、覚醒期の後半に普通食を与えると覚醒期の前半に与えた群と比較して肝臓TG蓄積が増加したことが報告されている(Yoshida C

et al., 2012)。これらの報告から高脂肪食、絶食に関係なく、食餌パターンそのものが肝臓 TG 蓄積に影響を及ぼす可能性があることが示唆される。また、一方で、制限給餌が、絶食で誘因される肝臓 TG 蓄積を軽減する機序はわかっていない。3 時間の制限給餌が自由摂食群、12 時間及び 6 時間の制限給餌群より肝臓 TG 蓄積が抑制されていることから制限給餌が、24 時間の絶食に適応する効果があるのかもしれない。肝臓脂質は、肝臓への脂肪酸供給と内在性脂質合成、 β 酸化の割合や肝臓への脂質輸送のバランスによって決められる(Roden M. 2006)。 *Srebp-1c*、 *Acc*、 *Fas*、 *Ppar- α* 、 *Pgc-1 α* 、 *Pepck* の遺伝子発現は、概日時計だけでなく、エネルギーバランスによっても制御され、絶食のサイクルによって変えられる。24 時間の絶食は、脂質合成遺伝子の *Srebp-1c*、 *Acc*、 *Fas* を減少させ、糖新生遺伝子 *Pepck* と β 酸化遺伝子 *Ppar- α* 、 *Pgc-1 α* 、 *Cpt1* を増加させた報告がマウスである(Le Martelot G et al., 2009, Sharara-Chami RI et al., 2012)。実際に、本研究において、24 時間の絶食は、 *Srebp-1c*、 *Acc*、 *Fas* の遺伝子発現を減少させ、 *Ppar- α* 、 *Pgc-1 α* 、 *Cpt1* と *Pepck* の遺伝子発現を増加させた。このように、 *Srebp-1c*、 *Acc*、 *Fas* の肝臓での発現減少は、体のエネルギー不足に対する適応応答かもしれない。 *Fatp1* 遺伝子発現は、24 時間絶食で増加し、この増加は、3 時間の制限給餌によって減弱された。絶食マウスにおける肝臓の TG 蓄積が多いことは、肝臓に FFA の流入増加による可能性があり、3 時間制限給餌では FFA 流入能力が減弱される可能性がある。時計遺伝子変異マウスの *Bmal1*、 *Per2*、 *Rev-erb α* ノックアウトマウス、 *Clock* ミュータントマウスは、異常な脂質代謝が報告されている(Grimaldi B et al., 2010, Kudo T et al., 2009, Le Martelot G 2009, Shimba S et al., 2011)。最近、 *Per1* の欠損が、エタノールによって誘発された脂肪肝を軽減する(Wong T et al., 2013)といった報告もある。本研究では、 *Clock* ミュータントマウスを用いて肝臓の TG 蓄積への影響を検証し、WT マウスと比較し TG 蓄積を軽減することが示された。これは、 *Clock* ミュータントマウスの食行動がランダムであり、絶食期間が少ないことも原因の一つと

考えられるが遺伝子発現レベルでの検証は行っていない。また、肝臓の *Per2* の発現は、自由摂食群、絶食群の ZT12 で高く、ZT0 で低く、*Bmal1* の発現は、その反対を示した。制限給餌群において、*Per2* と *Bmal1* の発現は、ZT12 で、絶食群と同様であった。これは、摂食パターンが似ているからだと推察される。一方で、制限給餌群の ZT0 では、*Per2* と *Bmal1* の遺伝子発現は、摂食パターンから考えると絶食群 ZT12 と同様でなくてはならない。制限給餌群の ZT0 は、概日リズムの異常を呈する可能性があるにもかかわらず、RF 群において ZT0 と ZT12 の間で TG の違いは観察されなかった。絶食が誘発する脂肪肝において、概日時計は、あまり影響を与えないことを示唆した。非アルコール性脂肪肝(NAFLD)は、全般的に有病率が増加し、肝硬変だけでなく糖尿病、心血管疾患の危険因子である(Angulo P 2002, Targher G et al., 2007)。NAFLD は、インスリン抵抗性と炎症により肝臓の脂質生成の増加に起因する(Day CP et al., 1998)。ヒトの摂食妨害によって誘発された脂肪肝の増加は、体重減少や肥満者の肝臓の炎症や線維形成を加速することはなぜかについて説明する可能性がある(Grimm IS et al., 1992, McFarland RJ et al., 1985)。これらの報告と本研究を通して、24 時間から 36 時間の絶食は、末梢脂肪組織で脂肪分解を誘発し、肝臓での異常な TG 蓄積を生じる。本研究では、絶食が誘因する TG 蓄積では、1 日 1 回の短い食餌が TG 蓄積を減弱することを示した。また、合わせて時計遺伝子変異マウスの *Clock* ミュータントマウスの食行動からも推察すると、食習慣が肝臓での TG 蓄積に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

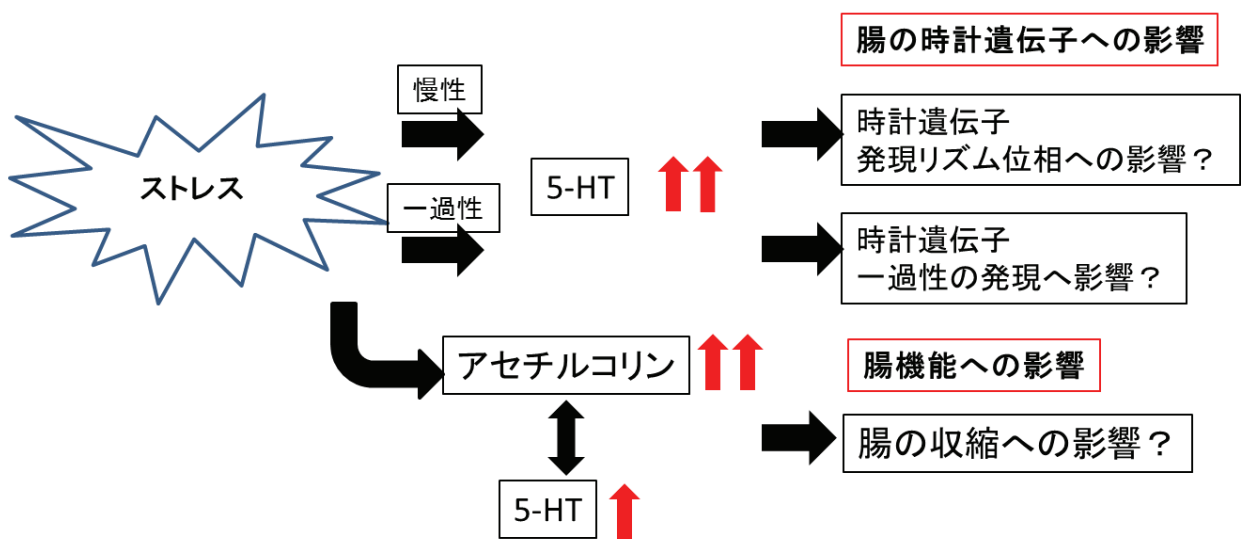
第3章 腸と体内時計の関係

1. 序論

時計遺伝子 *Per1* と *Per2* の発現は、*Bmal1* の発現と 12 時間異なる (King DP et al., 2000, Kudo T et al., 2007)。 *Per1* や *Per2* の日周発現リズムは、視交叉上核 (SCN) のみならず肝臓、肺、腸を含む末梢臓器で観察されている (Kudo T et al., 2007, Partch CL et al., 2013)。腸の時計システムは、栄養吸収や腹部運動と排便排出の原因となる (Buijs R et al., 2013, Stenvers DJ et al., 2012, Cagampang FR et al., 2012) ことが報告されている。SCN ペースメーカーは、主観的な夜間に網膜から送られる光信号を受けることによって外環境に同調し維持している (Inouye ST et al., 1994)。光刺激により SCN では、*Per1* と *Per2* の発現を急激に増加させる (Shigeyoshi Y et al., 1997)。ある一定の決められた運動または睡眠遮断のような非光刺激は、日周期ペースメーカーをリセットすることもできる (Marchant EG et al., 1997, Grossman GH et al., 2000)。主観的な日中に光を与えないと、中脳の縫線核と外側膝状体中間小葉 (IGL) は、5-HT 活性依存的に非光情報を SCN に伝え、概日時計リズムの移相に至る (Glass JD et al., 2003, Schuhler S et al., 1999)。5-HT 時計リセットは、5-HT₇ 及び 5-HT_{1A} の受容体の活動に依存している (Lovenberg TW et al., 1993, Horikawa K et al., 2000, Moriya T et al., 1998)。さらに、非光位相シフトは、5-HT₇ 及び 5-HT_{1A} の受容体アゴニストによって SCN で *Per1*, *Per2* 遺伝子発現の減少を伴う (Horikawa K et al., 2000, Moriya T et al., 1998, Takahashi S et al., 2002)。5-HT は、ヒトの場合、体内で約 10mg あり、腸で 90%、血小板で 8-9%、脳で 1-2% を占めている。5-HT 系が脳の日周期システムにおいて重要な役割を果たすと考えれば、多くの 5-HT が腸で生産されることは、腸で概日時計に貢献することを示

唆している。過敏性腸症候群(Irritable Bowel Syndrome: IBS)の原因として、食事、薬物、ホルモンに加えストレスによる感情的葛藤が消化管症状を誘発し悪化させるとも考えられるが、はっきりしたことはわかっていない。概日リズムの障害が IBS を悪化させるということも知られている(Konturek PC et al., 2011, Nojkov B et al., 2010, Kim HI et al., 2013)。5-HT₃受容体アンタゴニストと5-HT₄アゴニストが IBS の臨床治療に使われている(Ford AC et al., 2009, Manabe N et al., 2010, Spiller RC 2011)。これは、5-HT系が概日時計システムを通して IBS に関与する可能性を示唆する。そこで、本研究では、ストレス負荷を行い、概日時計に与える影響について時計遺伝子 *Per1*、*Per2*、*Bmal1* の発現を調べた。さらに、セロトニン合成阻害薬の PCPA によって全身の5-HTを減少させた時とセロトニンを投与した時、腸に発現しているセロトニン受容体刺激した時に時計遺伝子 *Per1*、*Per2*、*Bmal1* の発現を調べ、末梢セロトニンと時計遺伝子発現の影響を明らかにする。また、ストレス負荷が体内に及ぼす主要経路のなかに、副交感神経系の経路があり、腸の機能への影響として、アセチルコリン刺激に対する反応性を調べた(Fig.32)。

Fig.32 腸と体内時計の関係の仮説概略図



2. 実験材料及び方法

(1) 実験動物

6 週齢から 9 週齢のオス ICR マウス(30g~40g) (東京実験動物株式会社)、6 週齢のオス *Clock* ミュータントマウスを用いた実験を行った。*Clock* ミュータントマウスは、ICR 系統のものを使用し、当研究室で繁殖させたものを使用した。

(2) 飼育環境

マウスは、 22 ± 2 度、湿度 $60 \pm 5\%$ 、明期 : 暗期 = 12 時間 : 12 時間 (午前 8 時から午後 20 時までが明期) の環境で集団飼育した。なお、以降この明暗時間を基準とし、点灯開始時刻の 8:00 = ZT0 (ZT: Zeitgeber time)、消灯時刻の 20:00 = ZT 12 と表記する。自由飲水下で飼育し、餌は実験動物用飼料 (MF、オリエンタル酵母 株式会社) を用い、自由摂食させた。実験動物の取り扱いは早稲田大学の実験動物倫理委員会の許可に基づいて行った。

(3) 使用薬物

セロトニン (5-hydroxytryptamine)

神経伝達物質の 1 つで、トリプトファンから 5-ヒドロキシトリプトファンを経て合成される

PCPA (p-chlorophenylalanine)

- ・セロトニンの合成阻害薬であり、全身のセロトニン量を減少させる
- ・トリプトファンと競合し酵素に不可逆的に結合し、トリプトファンから 5-ヒドロキシトリプトファンの合成を阻害する

セロトニン受容体アゴニスト

フェニルビグアニド (1-(3-chlorophenyl)biguanide) 分子量 248.11

- ・5-HT₃受容体アゴニスト
- ・他の 5-HT 受容体には有意な影響を持たない(Kilpatrick GJ et al., 1990)

5-Met (5-Methoxytryptamine) 分子量 190.24

- ・5-HT₄受容体アゴニスト
- ・5-HT₄受容体に対して高親和性を持つ(Yamada J et al., 1997)
- ・5-HT₃受容体には結合しない(Hegde SS et al., 1996)

セロトニン受容体アンタゴニスト

オンダンセトロン (ondansetron) 分子量 365.85

- ・5-HT₃受容体アンタゴニスト
- ・嘔吐などを抑制し、制吐薬として使用される

GR113808 分子量 393.50

- ・ 5-HT₄受容体アンタゴニスト
- ・ 5-HT₁、5-HT₂、5-HT₃の受容体に比べ、5-HT₄に対しては約 3000 倍の選択性があり、他のドーパミンやヒスタミンなどの受容体においては約 10000 倍の選択性がある(Gale JD et al., 1994)

抗うつ薬

クロミプラミン (clomipramine)

- ・ 三環系抗うつ薬であり、うつ病治療や遺尿症治療に使われる
- ・ セロトニン輸送体、ノルアドレナリン輸送体を阻害する
- ・ 副作用として口渇、眠気などを引き起こす

フルボキサミン (fluvoxamine)

- ・ 選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI)
- ・ セロトニン以外の各種神経伝達物質受容体に対する親和性は低く、MAO阻害作用も

持たない

- ・ ノルアドレナリン、アドレナリンの再取り込み阻害をほとんどしないため、循環器に対する影響が少ない
- ・ 副作用として嘔気や口渇、消化器障害などを引き起こす

アセチルコリン(Acetylcholine, ACh)

- ・ 神経伝達物質で、副交感神経や運動神経の末端から放出され神経刺激をつたえる
- ・ コリンの酢酸エステル化合物
- ・ 骨格筋や心筋、内臓の筋繊維にあるアセチルコリン受容体に作用して収縮を促進する
- ・ 消化管の働きにも関与している

(4) RNA 抽出と Real-Time RT - PCR 法

III. 組織の抽出方法

採取した腸組織はすばやく RNA 抽出液 (RNA-Solv Reagent, Omega Bio-tek) 1000 μL に入れ、ホモジナイズした。ホモジナイズされたサンプルに、RNA 抽出液量の 1/5 量 (200 μL) のクロロホルムを加え、ボルテックス後 15000 rpm、10 min、20 $^{\circ}\text{C}$ の条件下にて遠心分離機にかけた。三層に分かれた層のうち、上清の水層約 360 μL を別のチューブに移し、CIA (クロロホルム : イソアミルアルコール=49 : 1) 120 μL を加え、ボルテックスの後、11500 rpm、10 min、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件下にて遠心分離機にかけた。上層を別のチューブに 200 μL 移し、同量 (200 μL) のイソプロパノールと 3 M 酢酸ナトリウム 20 μL を加え、20 分常温静置した。その後 11500 rpm、20 min、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件下にて遠心分離機にかけた。沈殿があることを確認後、上清を取り除き 70 %エタノール 200 μL を加え、転倒攪拌後、8000 rpm、5 min、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件下にて遠心分離機にかけた。上清を取り除き、室温で風乾させ、60 μL DEPC 処理水を加えて沈殿を溶解させ、ボルテックスした。分光光度計 (NanoVue, GE Healthcare) を用いて各サンプルの RNA 濃度を測定した後、DEPC 処理水を使用し、濃度が 50 ng/ μL になるように調整した。

IV. mRNA 定量

リアルタイム PCR (Real-time PCR) は定量 PCR (Q-PCR) のひとつであり、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅を経時的に測定することで増幅率に基づいて鋳型となる DNA の定量を行なうものである。本研究では二本鎖 DNA に特異的に挿入 (インターカレート) して蛍光を発する色素 (SYBR green) を用いる方法を用いた。あらゆる配列に対して同じ試薬を用いることができ汎用性が高いが、プライマー二量体のような非特異的な二本鎖 DNA も計測してしまう欠点がある。また、逆転写ポリメラーゼ

連鎖反応 (RT-PCR) と組み合わせて少量の mRNA の定量へ使われ、これにより特定の時間、細胞、組織での遺伝子の発現をみることができる。

One-Step SYBR RT-PCR kit (TaKaRa, Otsu, Japan) in a PIKO REAL 96 Real – Time PCR System (Thermo Scientific Japan, Yokohama, Japan).

抽出の終わったサンプルはリアルタイム PCR 解析システムを用いてその mRNA 量を定量した。プライマーの配列を Table 2A に示し、RT-PCR の設定条件は以下に示した。

<RT-PCR の設定条件>

④ 逆転写反応 (1 repeat)

reverse transcript (40 °C、5 分)

pre-PCR (95 °C、10 秒)

⑤ PCR 反応 (40 repeat)

Denaturing (95 °C、5 秒)

primer annealing, extension (60 °C、34 秒)

⑥ Dissociation Protocol (1 repeat)

95 °C、15 秒

60 °C、1 分

0.3 °C/秒の温度勾配で 95 °Cまで上昇

95 °C、15 秒

Sequences of primers used in RT-PCR.

Gene	Primer Sequence	Reverse
<i>18s</i> rRNA	5'-GGGGAGTATGGTTGCAAAGC-3'	5'-TGTCAATCCTGTCCGTGTCC-3'
<i>Per1</i>	5'-CAAGTGGCAATGAGTCCAACG-3'	5'-CGAAGTTTGAGCTCCCGAAGTG-3'
<i>Per2</i>	5'-TGTGTGCTTACACGGGTGTCCTA-3'	5'-ACGTTTGGTTTGCGCATGAA-3'
<i>Bmal1</i>	5'-CCACCTCAGAGCCATTGATACA-3'	5'-GAGCAGGTTTAGTTCCACTTTGTCT-3'

(5) 拘束ストレスの方法

ストレスとして拘束ストレスを用いた。マウスを縦 10 cm、よこ 5.5 cm の金網の筒の中にマウスを閉じ込め、マウスが動けないようにする。本研究では、2 時間の拘束を施した。時計遺伝子の発現の時刻依存性はコサイナー法により決定した (Acro.exe, by Dr. Refinetti) (Refinetti R et al., 2007)。解析時の周期設定は 24 時間に固定して行った。

(6) HPLC によるセロトニン測定

摘出した腸管 30mg を 0.2M の PCA200 μ l に入れ、ホモジナイズする。イソプロテノール(100ng/ μ l を 0.1N 塩酸で 10 倍希釈したもの)を 2 μ l 入れ、15000rpm10 分 4°C で遠心分離し、1ml のシリンジで上澄み液を取り 0.45 μ m のフィルターに通し、この液を HPLC(ECD-300、Eicom)を用いてセロトニン量を測定する。0.1M のモノクロロ酢酸 (pH3.5、850ml)、メタノール(150ml)、オクタンスルホン酸ナトリウム 100mg/ml(1.7ml)、EDTA・2Na 5mg/ml(1.0ml)からなる移動相を用いた。HPLC に直接 30 μ l 挿入し、Power Chrom(EPC-500、Eicom)で解析した。5-HT 量は、組織 g 当たり ng で示した(Kojima S et al., 2005)。

(7)セロトニン測定用 ELISA 法

血清セロトニンをより正確に測定するために、HPLC 測定より高感度な Serotonin ELISA(Enabling Discovery in Life Science)を用いた。マウスに軽くエーテル麻酔をかけ、死ぬ前に眼の静脈から 0.5ml 採取した。採取した血から血清を得るために、1 時間常温(22°C \pm 2°C)で静置し、3000rpm、20 分、4°C で遠心分離機にかけた。血清のサンプルは、1 : 30 で付属のアッセイバッファーで希釈し使用する。100 μ l ずつ付属の 96

穴プレートにサンプルを入れ、付属の conjugate と抗体をそれぞれ $50\mu\text{l}$ ずつ入れ、2 時間、室温で 500rpm で揺らす。付属のウォッシュバッファーで 3 回洗い、 $200\mu\text{l}$ の substrate solution をそれぞれのウェルに入れ、1 時間室温で 500rpm で揺らす。 $50\mu\text{l}$ の停止液を入れ 405nm で吸光度測定をする。検出された値を基準液の値との比率によって算出している。

(8) 小腸のアセチルコリンによる収縮作用の測定

アセチルコリン刺激の反応性を腸の自動運動の変化で検証するために、マグヌス氏管を用いて測定した。マウスの回腸を摘出し、2cm の腸片にして、両側の切り口を開放した状態で結紮する。この腸管を 10ml のクレブスリンガー液を入れたマグヌス氏管に懸垂しヘーベルにつなぐ。クレブスリンガー液は、 37°C に保つ。クレブスリンガー液には常に空気を送る。懸垂後、5 分後から実験を開始した。各濃度のアセチルコリンを注射筒で 0.1ml 加え収縮反応を濃度依存的に調べた。摘出腸管の収縮の記録は、PowerLab 4/26 データ収録システム(ML846 : AD Instruments, Japan)を用いて、Quad Bridge Amp (ML224: AD Instruments, Japan)を介して、トランスジューサ(MLT050/D : AD Instruments, Japan)に摘出した腸管の収縮が伝わり、力が加わると歪ゲージ素子の抵抗値が変化し、それによる出力信号電圧に変化が生じこの変化を秒ごとに記録する。この PowerLab の信号を記録し解析するソフトウェアとして LabChart6 Pro (AD Instruments, Japan)を用いた。

クレブスリンガー液の組成

精製水 2000ml に以下の試薬を溶かす。pH7.4 に調整する。

試薬	[g]
NaCl	13.5
KCl	0.69
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.63
KH ₂ PO ₄	0.32
CaCl ₂	0.26
Glucose	2.0
NaHCO ₃	4.07

(8) 統計処理

解析には統計解析ソフト StatView for Windows (SAS Institute Inc.) を用いた。2 群間の比較には Student's t-test を、多群間の比較には Tukey-Kramer 法を用いた。1 要因によるリズムの有意差検定は One-way ANOVA を、2 要因によるリズムの有意差検定は Two-way ANOVA を用いて検定した。P<0.05 の場合に有意差ありとし、* または # で表す。また、P<0.01 の場合には ** または ##、グラフは平均値±標準誤差で表した。

(9) 実験スケジュール

第1節 ストレスが時計遺伝子発現に与える影響

1-1 慢性拘束ストレスによる影響

慢性的に拘束ストレスを負荷し時計遺伝子発現に与える影響について検証した。

拘束ストレスを ZT4 から ZT6 の 2 時間 3 日間連続でかける。拘束ストレス後、ZT7、ZT11、ZT15、ZT19、ZT23、ZT3 の 6 ポイントでサンプリングした。

1-2 慢性拘束ストレスによるセロトニン分泌

ストレスを与えることで、セロトニン分泌への影響について ELISA を用いて検証。拘束ストレスを 2 時間 3 日間連続でかけたマウスの血清中のセロトニンを測定した。血清は、30 倍に希釈したものを使用し、ZT6 で計測した。

1-3 一過性拘束ストレスによる影響

拘束ストレスを ZT4 から ZT6 の 2 時間 1 日だけかけて ZT6 にすぐにサンプリング RT-PCR 法を用いて時計遺伝子の発現を調べた。

第2節 末梢セロトニンと小腸の時計遺伝子発現への影響

2-1-1 PCPA 投与

①PCPA 投与用量検討

セロトニン合成阻害薬である PCPA を 250mg/kg, 375mg/kg それぞれ体重あたり 0.1ml、4 日間、1 日 2 回腹腔内投与し空腸でのセロトニンを HPLC を用いて計測した。

②PCPA 投与での時計遺伝子発現リズム

ZT14/ZT22、ZT4/ZT20、ZT2/ZT10、ZT8/ZT16 で PCPA 投与処置を施したマウスを ZT0,ZT6,ZT12,ZT18 でサンプリングし、時刻依存的な時計遺伝子の変化を RT-PCR 法を用いて定量化した。サンプリングの前日から 24 時間絶食したマウスを使用した。

2-1-2 セロトニン投与

セロトニンが増えることで時計遺伝子の発現が変化するかについて ZT0, ZT6, ZT12, ZT18 の 4 ポイントで RT-PCR を用いて mRNA を定量化した。各サンプリングポイントの 1 時間前にセロトニンを 10mg/kg で体重 10g あたり 0.1ml 腹腔内投与した。サンプリング前日に 24 時間絶食したマウスを使用した。

2-1-3 セロトニン投与用量の検討

セロトニン投与用量によって、時計遺伝子の発現に変化があるのかについて検証した。セロトニン用量を 3mg/kg, 10mg/kg, 30mg/kg、コントロールとして、saline を ZT5 に投与し ZT6 でサンプリングした。RT-PCR 法を用いて時計遺伝子発現の定量化をした。サンプリング前日に 24 時間絶食したマウスを使用した。

2-2 5-HT₃, 5-HT₄ 受容体刺激による影響

①セロトニンアゴニスト単独投与

腸管に存在するセロトニン受容体の 5-HT₃,5-HT₄ のアゴニストを投与すると時計遺伝子の発現は変化するかについて検証した。ZT5 に 5-HT₃ のアゴニストとしてフェニルピグアニド、5-HT₄ のアゴニストとして 5-Met を腹腔内投与し、それぞれ、1mg/kg,5mg/kg の用量で投与し、ZT6 でサンプリングした。また、両方のアゴニスト同時投与も検討した。サンプリング前日から 24 時間絶食したマウスを使用した。

② セロトニンアンタゴニスト投与のセロトニンによる時計遺伝子発現への影響

セロトニン阻害効果を検証するために、アンタゴニストを ZT4.5 に投与し、セロトニンを ZT5 に腹腔内投与し、ZT6 でサンプリングした。5-HT3 アンタゴニストとしてオンダンセトロン、5-HT4 アンタゴニストとして GR113808 を使用した。セロトニンは、10mg/kg、アンタゴニストは、5mg/kg 投与した。サンプリング前日から 24 時間絶食したマウスを使用した。

③セロトニンアンタゴニスト単独投与

セロトニンアンタゴニストを単独で投与することで、時計遺伝子の発現に変化があるかについて、ZT5 に 5mg/kg 腹腔内投与し ZT6 でサンプリングする。

2-3 抗うつ薬投与(セロトニン再取り込み阻害)による影響

セロトニン再取り込み阻害として、抗うつ薬のクロミプラミンとフルボキサミンを ZT4 に腹腔内投与し、ZT6 で空腸を摘出し、RT-PCR で時計遺伝子の mRNA を測定した。脳内でシナプス間のセロトニン濃度が高まること、末梢の小腸において時計遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかについて検討した。サンプリング前日から 24 時間絶食したマウスを用いた。

腸機能への影響

3. 摘出腸管のアセチルコリン刺激に対する収縮反応

アセチルコリン刺激に対して、腸管の収縮反応がどのように影響するのかについて、ZT6 と ZT18 でマウスより回腸を摘出しマグヌス管の実験装置を用いて検証した。アセチルコリンの濃度を 10^{-8} g/ml、 10^{-7} g/ml、 10^{-6} g/ml、 10^{-5} g/ml と順に注射筒で 0.1ml 滴下し収縮反応を観察した。なお、各濃度で反応をみた後は、クレブスリンガー液で、

よく洗浄し、次の濃度を検討した。マウスは、WT マウス、*Clock*(*-/-*)マウス、PCPA 投与マウスを用いた。PCPA 投与は、直接、小腸の影響を検証するため、50mg/kg(1%CMC)を3日間、1日1回経口投与した。*Clock*(*-/-*)マウスは、時計遺伝子の影響、PCPA 投与マウスは、セロトニンとの相互作用を検証するために用いた。

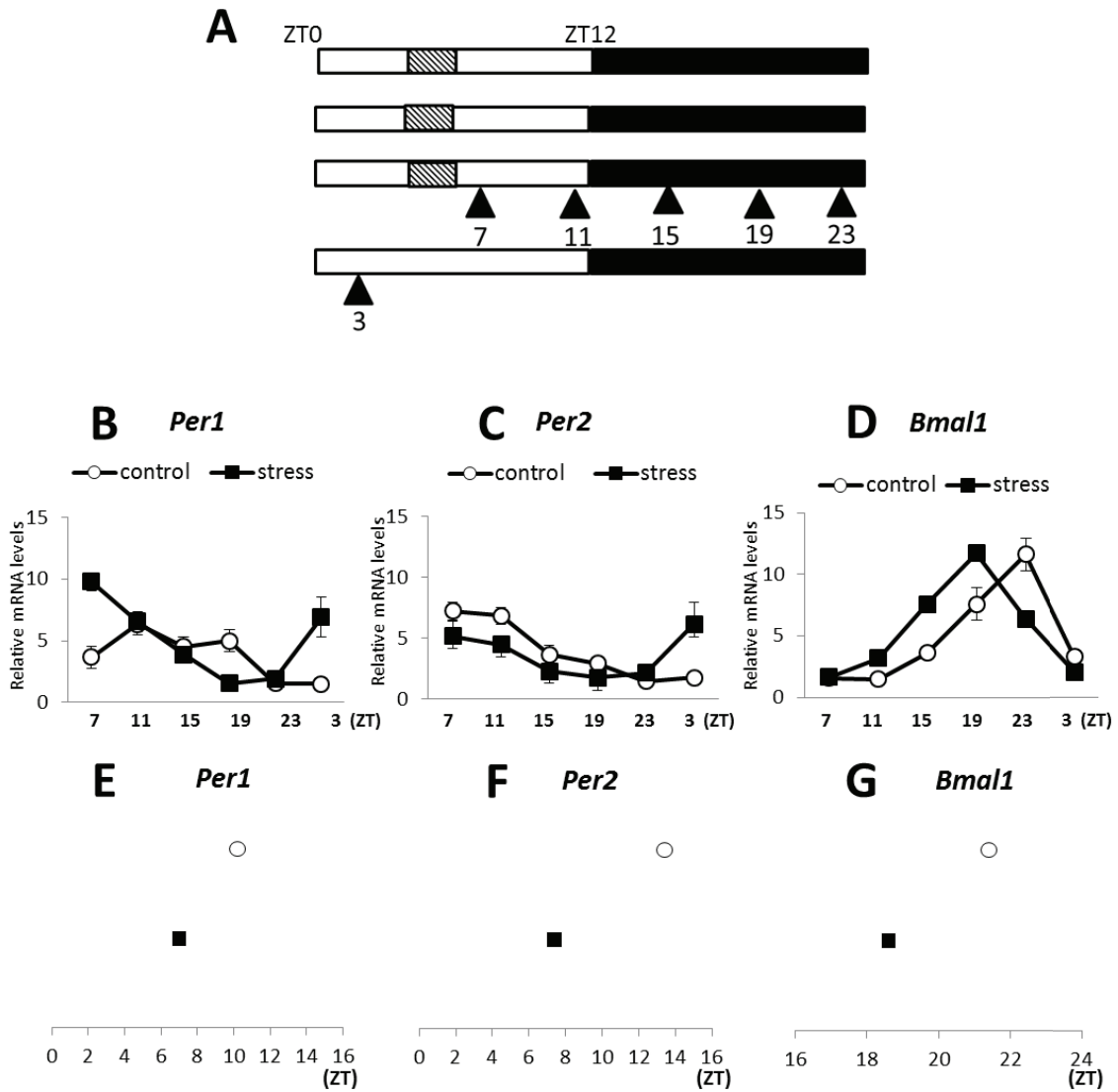
具体的なスケジュールは、各実験結果に示す。

3. 実験結果

1-1 慢性拘束ストレス影響

拘束ストレスを 3 日間かけて慢性ストレスの状態にしてマウスの腸の時計遺伝子への影響を検証した(Fig.33A)。解析は、コサイナー法(Acro.exe, by Dr Refinetti)で行った。コントロールマウスの腸の *Per1*、*Per2*、*Bmal1* の mRNA 発現はともに日内リズムがみられ(P<0.05)、拘束ストレスマウスの腸でも *Per1*、*Per2*(P<0.05)、*Bmal1*(P<0.01)の日内リズムが観察された(Fig.33,B,C,D)。腸の時計遺伝子発現にリズム性があることを確認した。拘束ストレスを負荷することで、時計遺伝子の mRNA 発現の位相が前進することがわかった。Acro 解析によって、*Per1* では、コントロール群で 10.2 にピーク値を示したが、拘束ストレス群では、7 にピーク値を示した(Fig.33E)。また、*Per2* では、コントロール群で 13.4 にピーク値を示し、ストレス群で 7.4 にピーク値を示した(Fig.33F)。*Bmal1* では、コントロール群で 21.4 にピーク値を示し、ストレス群で 18.6 にピーク値を示した(Fig.33G)。慢性的な拘束ストレスは、時計遺伝子発現のリズムの位相を前進させた。

Fig.33 慢性拘束ストレスによる時計遺伝子発現の変化



N=3

ZT0:light on, ZT12:light off、斜線部分:拘束ストレスZT4-ZT6

control(○)、stress(■)

(A):実験スケジュール、(B):*Per1*、(C):*Per2*、(D):*Bmal1*

X軸:サンプリング時刻、Y軸:mRNA発現量

各値は18smRNAで補正した

(E):*Per1*、(F):*Per2*、(G):*Bmal1*

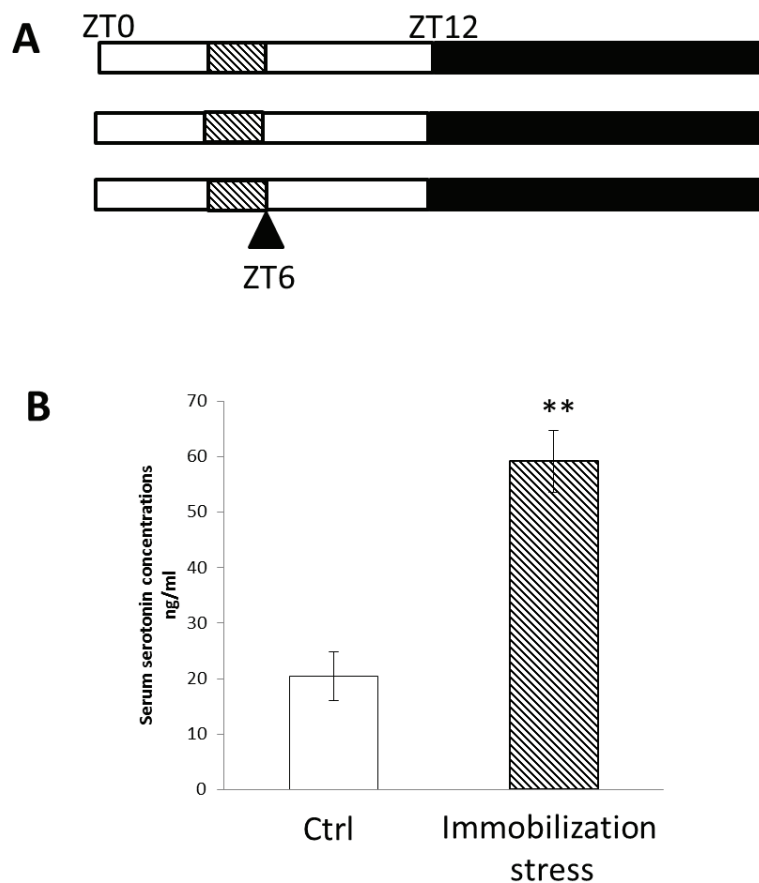
X軸:ピーク時刻(ZT)

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した

1-2 ストレスによるセロトニン分泌

慢性的な拘束ストレスをかけて血清のセロトニン分泌への影響を検証した(Fig.34A)。セロトニン ELISA キットを用いてセロトニン分泌を計測した。血清中のセロトニンは、コントロール群と比較すると拘束ストレスを負荷することで有意に増加した(P<0.01, Fig. 34B)。ストレスにより血清中のセロトニン分泌が増加する。

Fig.34 血清中セロトニン



Ctrl: N=3(白)、immobilization stress:N=6(斜線)

Y軸: 血清中セロトニン濃度[ng/ml]

(A): 実験スケジュール、(B): 血清中セロトニン濃度[ng/ml]

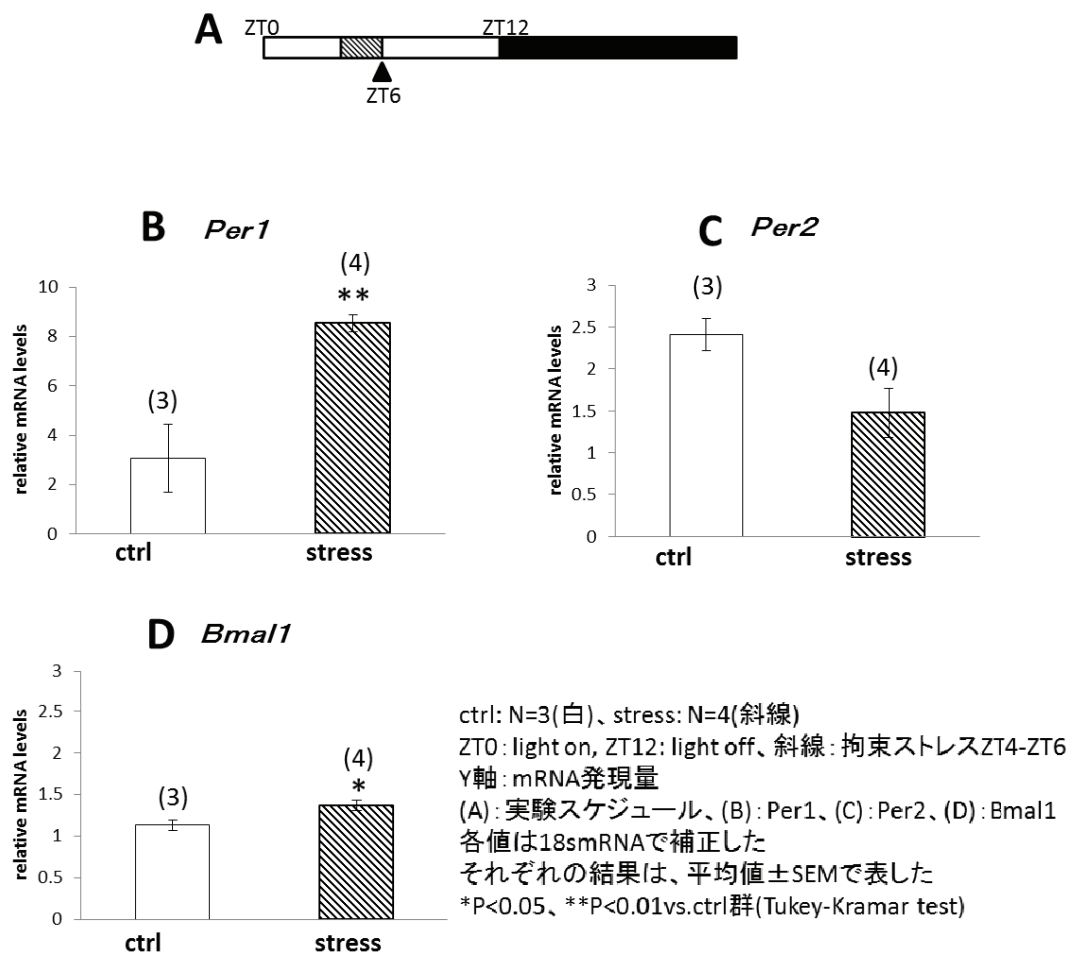
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した

*P<0.05、**P<0.01vs.ctrl群(Tukey-Kramer test)

1-3 一過性拘束ストレスによる影響

拘束ストレスを 1 日かけて急性ストレスによるマウスの小腸の時計遺伝子への影響を検証した(Fig.35A)。*Per1*mRNA は、拘束ストレスにより有意に増加した(P<0.01、Fig.35B)。また、*Per2*mRNA では、減少傾向がみられた(Fig.35C)。*Bmal1* mRNA は、*Per1*mRNA 発現と同様に有意に増加した(P<0.05、Fig.35D)。急性拘束ストレスによって、*Per1*、*Bmal1* の遺伝子発現は増加し、*Per2* の遺伝子発現は減少した。

Fig.35 急性拘束ストレスによる時計遺伝子発現



小括：第1節ストレスとセロトニンについて

- ・慢性ストレスによって時計遺伝子発現リズム位相が前進する。
- ・一過性ストレスにより時計遺伝子発現に影響がある。
- ・慢性ストレスにより血清中セロトニン分泌が増加する。

ストレスとセロトニンに関与が示唆される。

2-1 セロトニン増減による時計遺伝子発現への影響

2-1-1 PCPA 投与

①PCPA 投与用量の検討

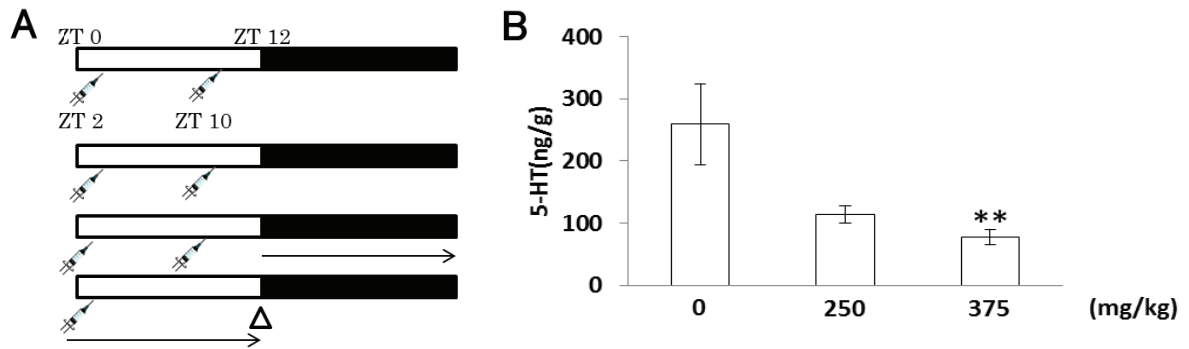
セロトニンを減少させ時計遺伝子発現への影響を検証した。内在性のセロトニンをセロトニン合成阻害剤 PCPA を投与し全身レベルで減少させた。まず、PCPA の用量を 250mg/kg, 375mg/kg で投与しセロトニン分泌量を HPLC で調べた。PCPA を ZT2 と ZT10 で 4 日間 1 日 2 回計 7 回投与し ZT12 でサンプリングし空腸を摘出した(Fig.36A)。375mg/kg で有意にセロトニン量が減少した($P < 0.01$, Fig.36B)。以降、PCPA 投与実験では、375mg/kg の用量で投与し実験を行うことにした。

②PCPA 投与による時計遺伝子発現リズム

ZT14/ZT22、ZT20/ZT4、ZT2/ZT10、ZT8/ZT16 で PCPA 投与処置を施したマウスを ZT0, ZT6, ZT12, ZT18 でそれぞれサンプリングした。実験スケジュールは、①PCPA 投与用量検討と同様に 4 日間 1 日 2 回計 7 回投与し、4 ポイントで時計遺伝子発現への影響を検証した(Fig.36A)。それぞれ、小腸の時計遺伝子発現は、*Per1*mRNA($F_{3,10} = 4.81$, $P < 0.05$, Fig.37A)、*Per2*mRNA($F_{3,10} = 7.30$, $P < 0.01$, Fig.37B)、*Bmal1*mRNA($F_{3,10} = 25.63$, $P < 0.01$, Fig.37C)のすべてにおいて有意な日周リズムがみられた。さらに、*Per1*mRNA と *Per2*mRNA の発現パターンは類似し、*Bmal1*mRNA 発現とは、12 時間間となることがわかった。そして、PCPA 投与によりセロトニンを減少させることで、*Per1*mRNA($F_{3,8} = 2.32$, NS) と *Per2*mRNA($F_{3,8} = 3.75$, NS) で、日周リズムを失い、*Bmal1*mRNA($F_{3,8} = 30.18$, $P < 0.01$)では、わずかに日周リズムが減弱した。

以上の結果より、PCPA 375mg/kg の用量でセロトニン量が減少し、*Per1*、*Per2* の発現は、日周リズムを失い、*Bmal1* は、日周リズムの減弱がみられた

Fig.36 PCPA 投与によるセロトニン減少



N=4

(A): 実験スケジュール (ZT12にサンプリングした場合)、ZT0:light on, ZT12:light off, Δサンプリング、→絶食

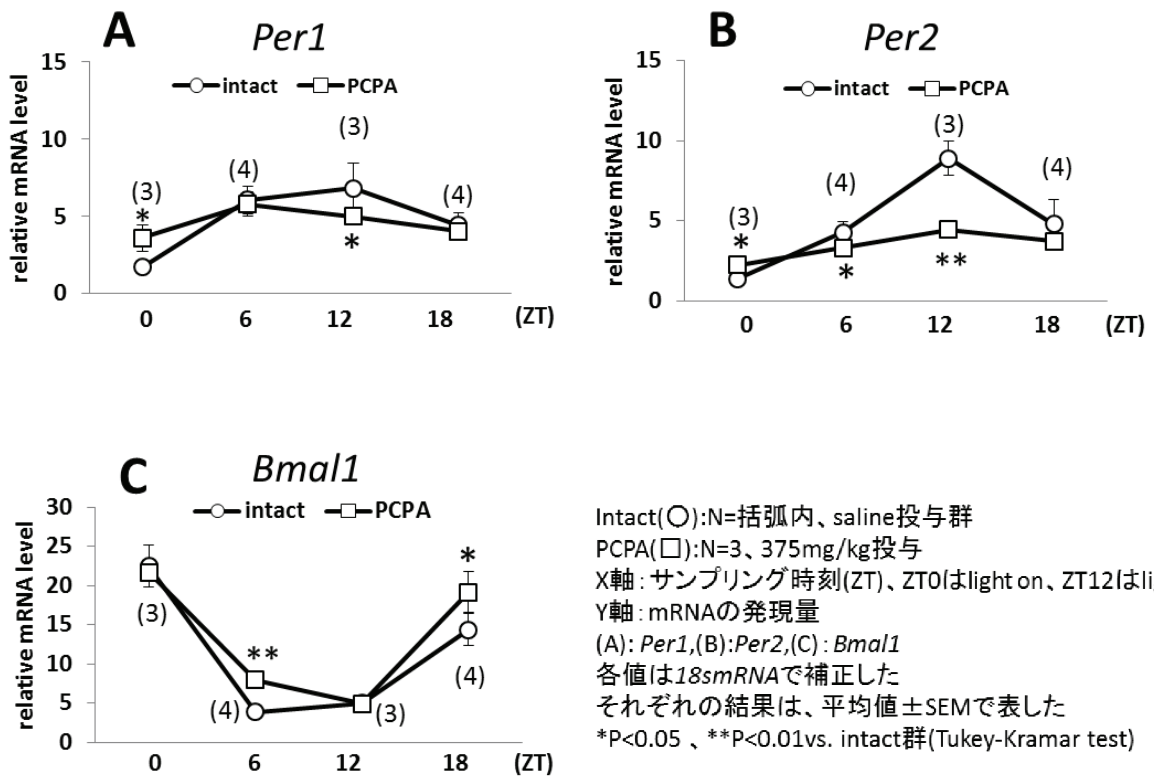
(B): HPLCによるセロトニン濃度[ng/g]

X軸: PCPA投与濃度[mg/kg]、Y軸: セロトニン濃度[ng/g]

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した

**P<0.01vs.0(ctrl)群(Tukey-Kramer test)

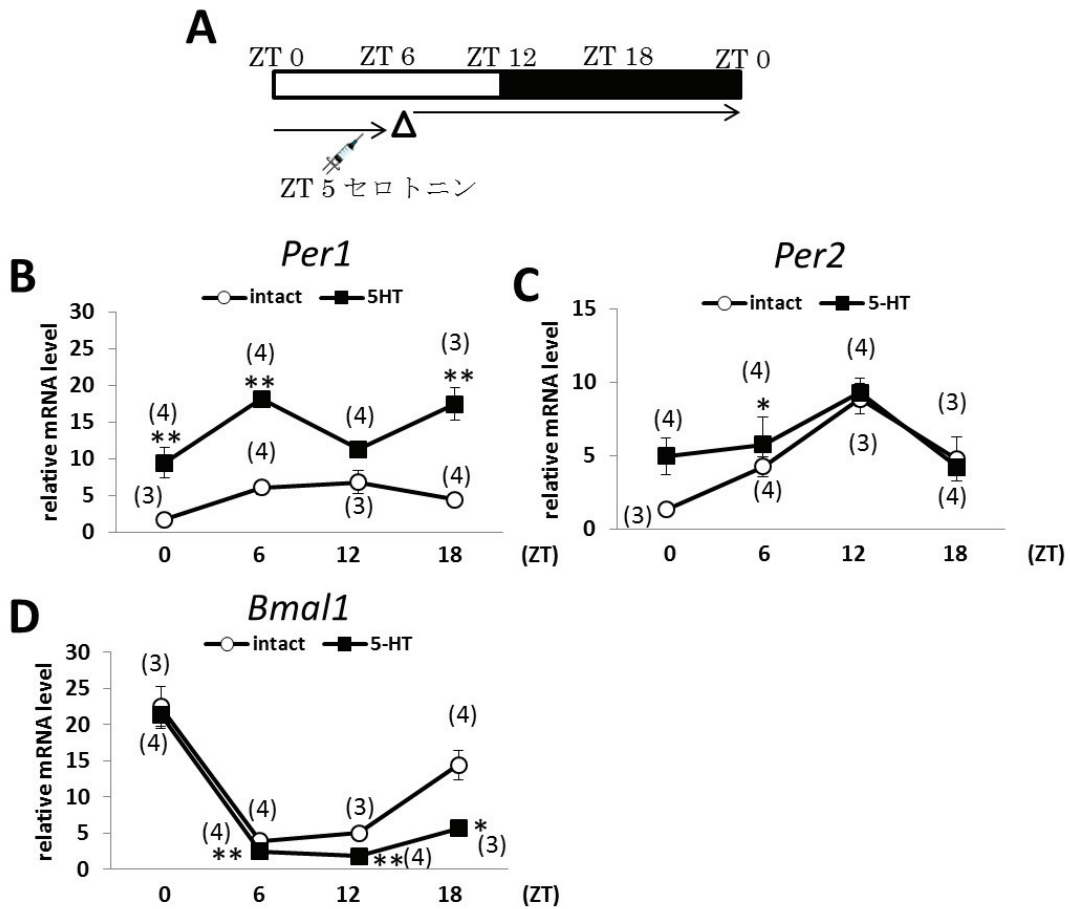
Fig.37 PCPA 投与による時計遺伝子発現リズムの変化



2-1-2 セロトニン投与

セロトニンを投与することで時計遺伝子発現への影響について検証した。まず、セロトニンをサンプリングの1時間前に10mg/kgで投与し、ZT0,ZT6,ZT12,ZT18で時計遺伝子発現を調べた(Fig.38A)。コントロールは、2-2のPCPA投与実験で示したものと同じデータを使用した。ZT0,ZT6,ZT18で、*Per1*、*Per2*の遺伝子発現ともに有意に増加した(Fig.38B、C)。しかし、*Bmal1*は、ZT6,ZT12,ZT18で有意に減少した(Fig. 38D)。以降*Per1*、*Per2*、*Bmal1*遺伝子発現に有意な差が見られたZT6でサンプリングをした。*Per1*、*Per2*の遺伝子発現は、セロトニン投与によって増加し、*Bmal1*遺伝子発現では減少する。

Fig.38 セロトニン投与による時計遺伝子発現への変化

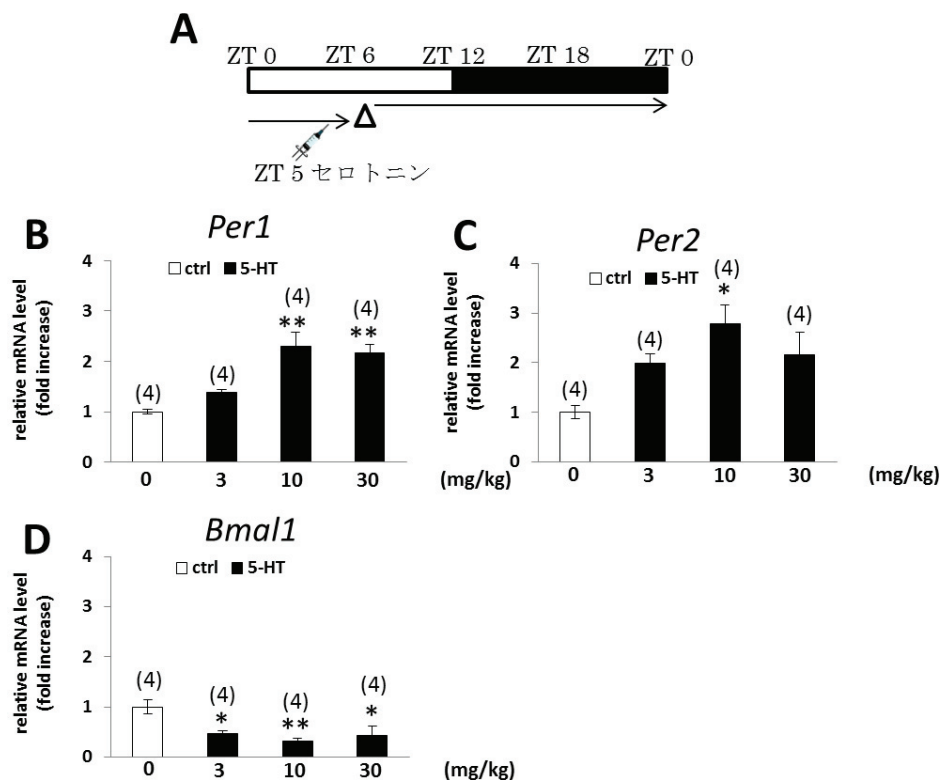


N=括弧内、intact(○) saline投与群、5-HT(■)10mg/kg、△サンプリング、→絶食
 サンプリング1時間前にマウス体重10gあたり0.1ml腹腔内投与
 (A):実験スケジュール(ZT6にサンプリングする場合)
 X軸: サンプリング時刻(ZT)、ZT0はlight on、ZT12はlight off
 Y軸: mRNAの発現量、各値18smRNAで補正した
 (B): *Per1*, (C): *Per2*, (D): *Bmal1*
 それぞれの結果は、平均値±SEMで表した
 *P<0.05、**P<0.01vs. intact群(Tukey-Kramer test)

2-1-3 セロトニン投与用量検討

セロトニン投与によって、時刻依存的に時計遺伝子発現への影響がわかったことから、セロトニン投与用量による時計遺伝子発現への影響を検証した(Fig.39A)。 *Per1*、 *Per2* の発現は、3mg/kg と 10mg/kg で用量依存的に増加し(Fig.39B、 C)、 *Bmal1* の発現は、減少した(Fig.39D)。用量効果としては、全ての遺伝子で 10mg/kg で有意な効果が見られ、30mg/kg でより強い効果は観察されなかった。セロトニン 10mg/kg 用量投与で最も時計遺伝子発現に影響がみられた。

Fig.39 セロトニン投与用量依存性



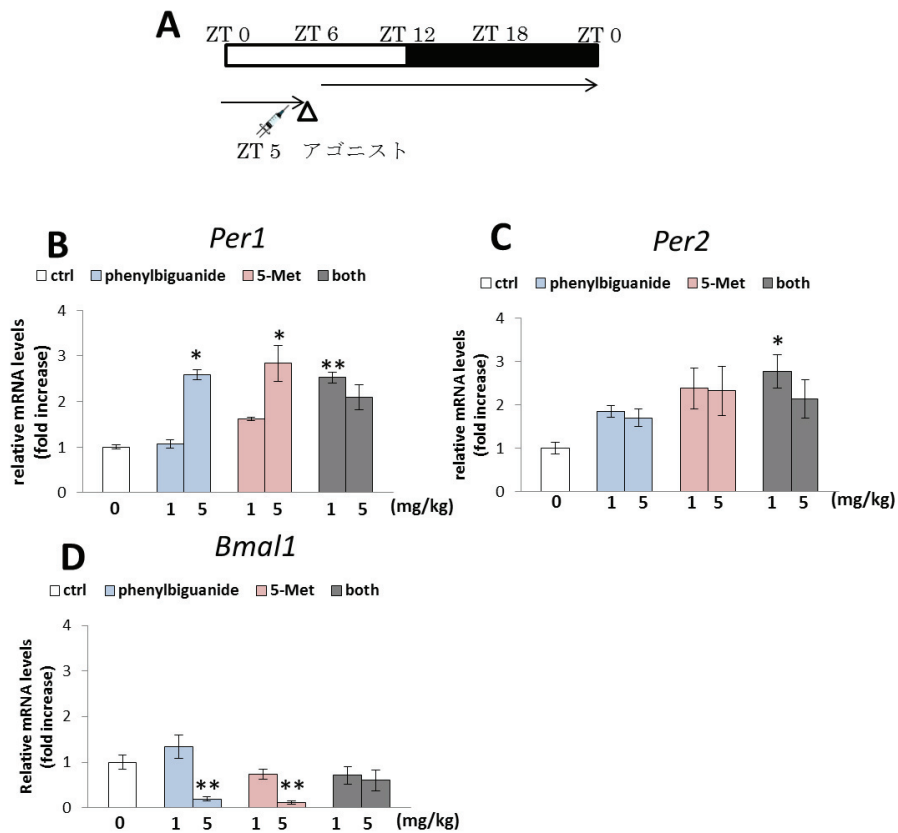
N=括弧内、ctrl(白)saline、5-HT(黒)それぞれ、マウス体重10gあたり0.1ml腹腔内投与
X軸: サンプル時刻(ZT)、ZT0はlight on、ZT12はlight off、Y軸: mRNAの発現量
(A):実験スケジュール、△サンプリング、→絶食、(B): *Per1*、(C): *Per2*、(D): *Bmal1*
各値は、18sRNAで補正し、saline投与の値を1に対しての値で表した
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した
*P<0.05、**P<0.01vs. ctrl群(Tukey-Kramer test)

2-2 5-HT₃、5-HT₄受容体刺激による時計遺伝子発現への影響

2-2-1 セロトニン受容体アゴニスト単独投与

小腸に発現するセロトニン受容体 5-HT₃と 5-HT₄のアゴニストをサンプリング 1 時間前に腹腔内投与し、時計遺伝子発現への影響を検証した(Fig.40A)。5-HT₃受容体アゴニストとしてフェニルピグアニド、5-HT₄受容体のアゴニストとして 5-Met を用いた。*Per1*、*Per2* の時計遺伝子発現は、有意に増加し(Fig.40B,C)、*Bmal1* の時計遺伝子発現は減少した(Fig.40D)。この効果は、セロトニン投与時と同様のものであった。また、用量依存的に効果の影響があらわれた。特に、*Per1* と *Bmal1* の時計遺伝子発現では、5mg/kg 群で 1mg/kg 群と比較すると有意な効果が観察された。反対に、両方のアゴニストを同時投与すると、1mg/kg 群のほうが *Per1,Per2* の時計遺伝子発現で有意な効果がみられた。アゴニスト単独投与による時計遺伝子発現への効果は、10mg/kg の 5-HT 単独投与の効果と類似していた。セロトニン投与と同様に *Per1*、*Per2* で発現増加し、*Bmal1* で発現減少する。

Fig.40 セロトニン受容体アゴニスト単独投与による時計遺伝子発現の変化



N=4、ctrl(白)saline投与、5-HT₃アゴニスト: phenylbiguanide(青)、

5-HT₄アゴニスト: 5-Met(赤)、both(グレー)

それぞれ、マウス体重10gあたり0.1ml投与

X軸: サンプルング時刻(ZT)、ZT0はlight on、ZT12はlight off、Y軸: mRNAの発現量

(A): 実験スケジュール、△サンプルング、→絶食、ZT5にアゴニスト投与

(B): *Per1*、(C): *Per2*、(D): *Bmal1*

各値は、18sRNAで補正し、saline投与の値を1に対しての値で表した

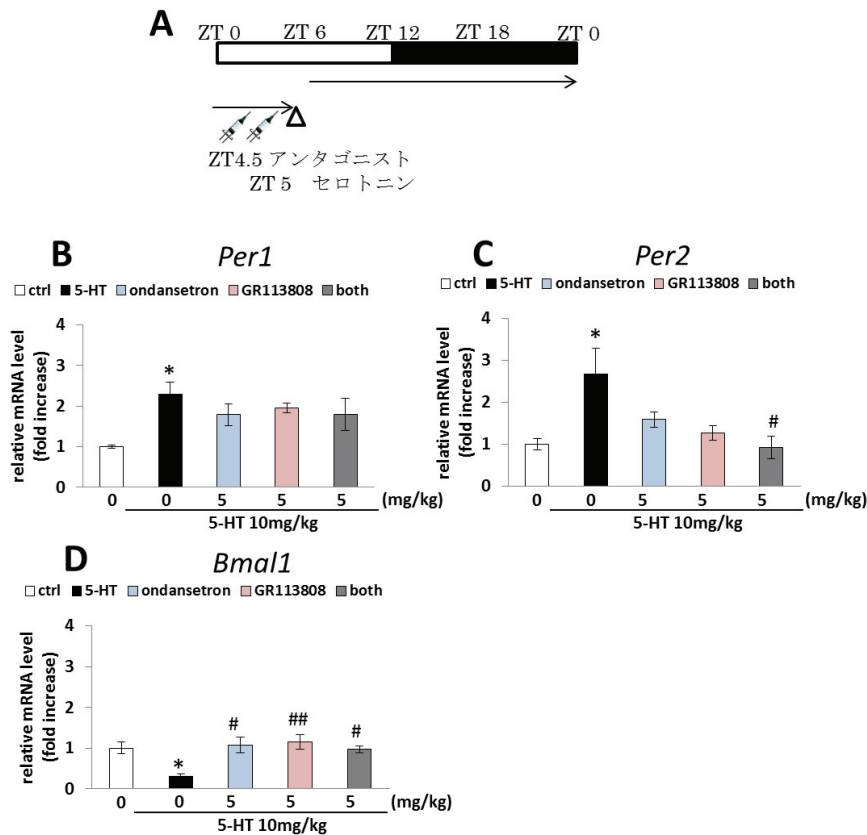
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した

*P<0.05、**P<0.01vs. ctrl群(Tukey-Kramer test)

2-2-2 セロトニン投与による影響の阻害

セロトニンが誘発する *Per1*、*Per2*、*Bmal1* の時計遺伝子への影響がアンタゴニスト投与をすることによる変化について、セロトニンを投与 30 分前にアンタゴニストを投与し検証した(Fig.41A)。5-HT₃受容体のアンタゴニストとしてオンダンセトロン、5-HT₄受容体のアンタゴニストとして GR113808 を用いた。*Per1*では、セロトニン投与による発現増加を 5-HT₃,5-HT₄ の両受容体アンタゴニストともにわずかな阻害効果がみられた(Fig.42B)。両方の受容体アンタゴニストを同時投与しても阻害効果はそれぞれの単独投与群とほとんど変わらなかった。しかし、*Per2* では、セロトニン投与による発現増加を 5-HT₃,5-HT₄ の両受容体アンタゴニストともにわずかな阻害効果がみられ、さらに、両方の受容体アンタゴニストを同時投与すると有意な阻害効果がみられた (P<0.05、Fig.43C)。また、*Bmal1*では、セロトニン投与による発現減少を 5-HT₃受容体のアンタゴニスト(P<0.05)、5-HT₄受容体のアンタゴニスト(P<0.01)、両方の受容体アンタゴニスト同時投与(P<0.05)と有意な阻害効果がみられた (Fig.43D)。

Fig.41 セロトニン阻害効果



N=4, ctrl: saline(白)、5-HT(黒)、5-HT₃アンタゴニスト: ondansetron(青)、5-HT₄アンタゴニスト: GR113808(赤)、both(グレー)

それぞれ、マウス体重10gあたり0.1ml腹腔内投与

X軸: サンプル時刻(ZT)、ZT0はlight on、ZT12はlight off、Y軸: mRNAの発現量

(A): 実験スケジュール、△サンプリング、→絶食、ZT4.5にアンタゴニスト、ZT5にセロトニン

(B): *Per1*、(C): *Per2*、(D): *Bmal1*

各値は、18sRNAで補正し、saline投与の値を1に対しての値で表した

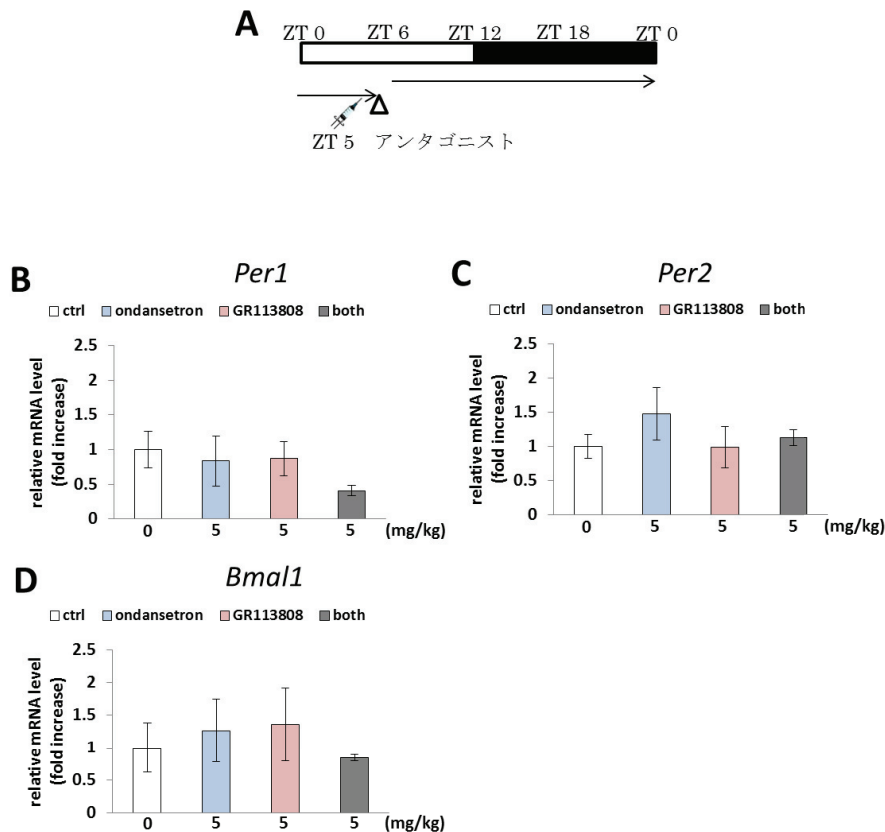
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した

*P<0.05 vs. ctrl群、#P<0.05,##P<0.01 vs. 5-HT群(Tukey-Kramer test)

2-2-3 セロトニン受容体アンタゴニスト単独投与

5-HT₃,5-HT₄の受容体アンタゴニストをそれぞれ投与することで、小腸の時計遺伝子発現への影響を検証した(Fig.42A)。PCPA 処置を施しセロトニンを減少させたマウスにおける時計遺伝子発現変化同様の結果が得られる可能性を考慮し、単独投与および両受容体アンタゴニストの同時投与を行った。しかし、結果は、推測と異なり、*Per1*、*Per2*、*Bmal1*のすべての遺伝子発現において効果を及ぼさなかった(Fig.42B-D)。

Fig.43 セロトニン受容体アンタゴニスト単独投与による
時計遺伝子発現の変化

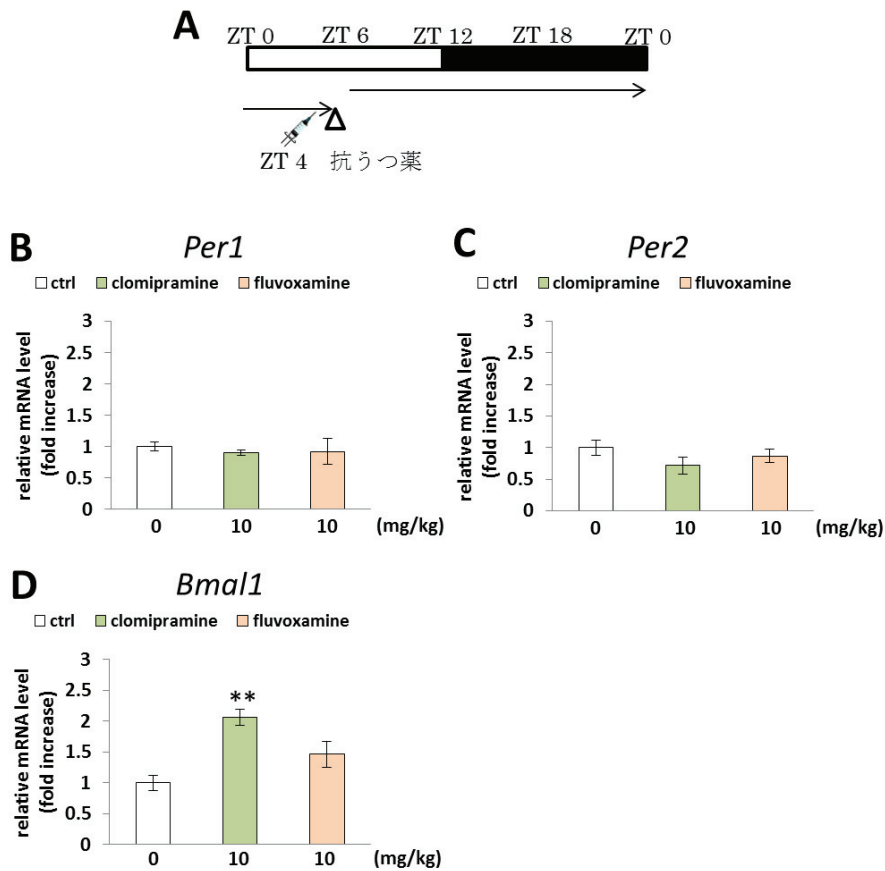


N=4, ctrl: saline(白)、5-HT₃アンタゴニスト: ondansetron(青)、
5-HT₄アンタゴニスト: GR113808(赤)、both(グレー)
それぞれ、マウス体重10gあたり0.1ml投与
X軸: サンプリング時刻(ZT)、ZT0はlight on、ZT12はlight off、Y軸: mRNAの発現量
(A): 実験スケジュール、△サンプリング、→絶食、ZT5にアンタゴニスト投与
(B): *Per1*、(C): *Per2*、(D): *Bmal1*
各値は、18smRNAで補正し、saline投与の値を1に対しての値で表した
それぞれの結果は、平均値±SEMで表した

2-3 抗うつ薬投与(セロトニン再取り込阻害)による時計遺伝子発現への影響

抗うつ薬として用いられる薬の中には、脳内のセロトニン再取り込阻害効果のある薬がある。また、抗うつ薬の副作用として、嘔吐や消化機能異常などがある。このことより、抗うつ薬を投与した場合に、小腸の時計遺伝子発現への影響を検証した。抗うつ薬として、クロミプラミン、フルボキサミンを使用し、*Per1*、*Per2*、*Bmal1*の発現について、セロトニン投与の場合と同様の結果を考慮し、ZT4に抗うつ薬をそれぞれ投与しZT6にサンプリングして調べた。しかし、*Per1*、*Per2*に関してはいずれの抗うつ薬も遺伝子発現への影響を及ぼさなかった(Fig.44B,C)。また、*Bmal1*の発現は、クロミプラミン投与によって有意に増加した(Fig.44D)。

Fig.44 抗うつ薬投与による時計遺伝子発現の変化



N=4、ctrl: saline(白)、clomipramine(緑)、fluvoxamine(オレンジ)
 それぞれ、マウス体重10gあたり0.1ml腹腔内投与
 X軸: サンプルング時刻(ZT)、ZT0はlight on、ZT12はlight off、Y軸: mRNAの発現量
 (A): 実験スケジュール、△サンプルング、→絶食、ZT4に抗うつ薬投与
 (B): *Per1*、(C): *Per2*、(D): *Bmal1*
 各値は、*18sRNA*で補正し、saline投与の値を1に対しての値で表した
 それぞれの結果は、平均値±SEMで表した
 **P<0.01 vs. ctrl群(Tukey-Kramer test)

小括：第2節末梢のセロトニンと時計遺伝子発現

- ・セロトニン増減によって時計遺伝子発現は変化する。
- ・セロトニン受容体刺激によっても時計遺伝子発現に影響があり、腸に発現する 5-HT₃、5-HT₄ 受容体のアゴニストはセロトニン投与と同様の結果になり、両方の刺激で効果がある。
- ・セロトニン受容体アンタゴニストによるセロトニン効果阻害は、*Bmal1* 遺伝子のみで効果がみられた。
- ・セロトニン受容体アンタゴニスト単独投与の効果はみられなかった。
- ・抗うつ薬投与による時計遺伝子への影響はほとんどみられなかった。

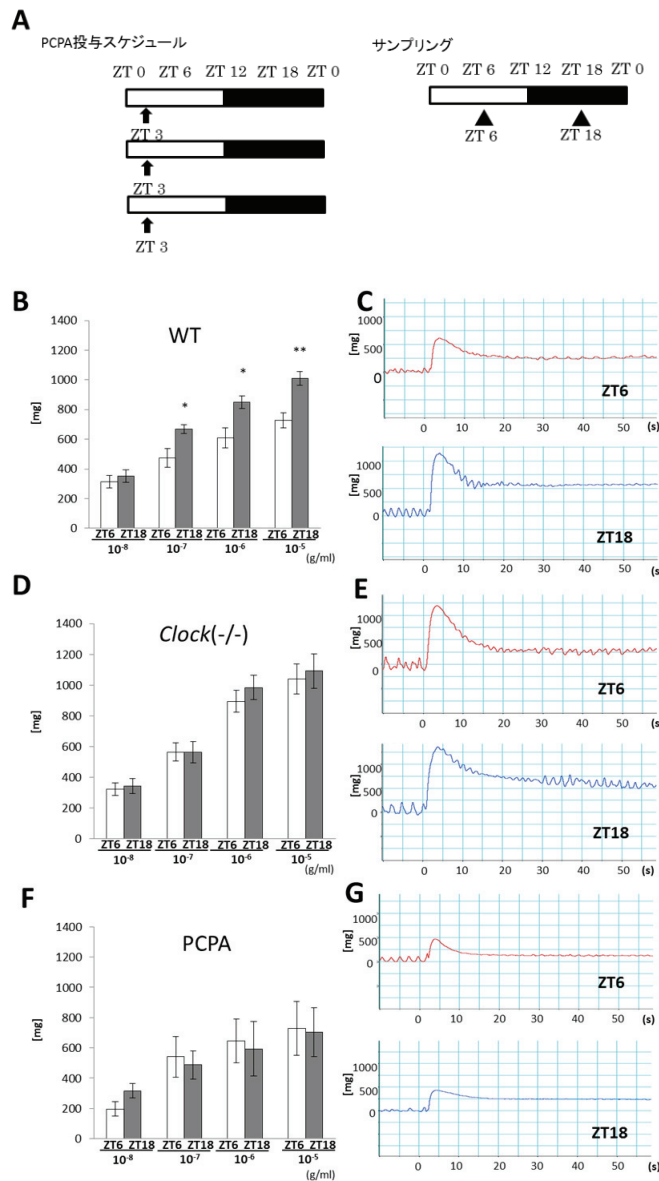
3 摘出腸管のアセチルコリンに対する収縮反応への影響

摘出腸管のアセチルコリン(Ach)に対する収縮反応について、マグヌス管を用いて調べる。ZT6 と ZT18 にマウスの回腸を 2 cm 摘出し、マグヌス管にセットし、つるした摘出腸管を得る。Ach 0.1ml を以下の濃度で適応する。滴下する Ach 濃度を 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} とし ZT6 と ZT18 で検証した(Fig.45A)。摘出腸管の Ach に対する通常の収縮反応として、WT マウス、体内時計との関わりの検証に時計遺伝子変異マウスの *Clock*(-/-)マウス、セロトニンとアセチルコリンの相互作用の検証として、PCPA 投与マウスを用いた。WT マウスでは、昼夜に有意な反応性がみられ、ZT18 の群、つまり、活動期で収縮反応が強くみられ、濃度依存的に効果があらわれる(Fig.45B,C)。次に、*Clock*(-/-)マウスでは、昼夜での反応は WT マウスと同程度もしくはそれ以上だが、昼夜差はなかった(Fig.45D,E)。特に、非活動期の Ach に対する収縮反応が WT マウスに比べて 10^{-6} 、 10^{-5} と濃い濃度の刺激では、強くあらわれた。次に、PCPA 投与を施したマウスでも昼夜の差は観察されず、収縮の大きさは同程度をしめした (Fig.45F,G)。セロトニンがない状態でアセチルコリンを滴下すると反応性でも昼夜のリズムがなくなる可能性が考えられる。

以上の結果より、アセチルコリン刺激に対する反応性は、濃度依存性がみられる。WT マウスで昼夜に差があり、Ach の反応は活動期のほうが強くあらわれた。*Clock*(-/-)マウスで刺激に対する Ach の反応は、WT マウスよりも強くなるが、昼夜の差がなくなり、PCPA 投与マウスで、Ach 刺激に対する反応が減弱し、昼夜の差もなくなる。

セロトニンとアセチルコリンの相互作用により腸の収縮運動に影響する可能性がある。

Fig.45 アセチルコリン滴下による腸管収縮反応



WTマウスN=6、*Clock*(-/-)マウスN=5、PCPAマウスN=4

ZT6(白)、ZT18(黒)、ZT0: light on、ZT12: light off、

(A): 実験スケジュール: ▲ 経口投与(PCPA 50mg/kg), ▲ サンプルング、

アセチルコリンを濃度依存的に滴下し、アセチルコリン刺激に対する収縮反応(最大値-最小値)

(B,D,F)のグラフのX軸: マグナス実験ポイントと滴下アセチルコリン濃度[g/ml]、Y軸: 腸の収縮[mg]

(C,E,G)のグラフのX軸: 時間[秒]、0で滴下した、Y軸: 腸の収縮[mg]

(B) WTマウスのアセチルコリン収縮反応の昼夜差

(B) WTマウスの 1×10^{-5} のアセチルコリン反応マグナスデータ

(D) *Clock*(-/-)マウスのアセチルコリン収縮反応の昼夜差

(E) *Clock*(-/-)マウスの 1×10^{-5} のアセチルコリン反応マグナスデータ

(F) PCPA投与マウスのアセチルコリン収縮反応の昼夜差

(G) PCPA投与マウスの 1×10^{-5} のアセチルコリン反応マグナスデータ

それぞれの結果は、平均値±SEMで表した

*P<0.05、**P<0.01vs. それぞれのZT6の群(Tukey-Kramer test)

小括：第3節腸収縮への影響

- ・アセチルコリン(Ach)刺激に対する収縮反応は、濃度依存性がみられる。
- ・WT マウスでは、反応性に昼夜差がある。
- ・*Clock*(-/-)マウスでは、Ach 刺激に対する反応性は強くなるが、昼夜差はなくなる。
- ・PCPA 投与マウスでは、Ach 刺激に対する反応性も減弱し、昼夜差もなくなる。

Ach 刺激による昼夜差は、正常量のセロトニン、体内時計の正常性が重要であり、腸の自動収縮運動に時計機構、セロトニンとアセチルコリンの相互作用が関与することが示唆される。

4. 第3章 考察

拘束ストレスにより、小腸で時計遺伝子の *Per1*、*Per2*、*Bmal1* の発現リズムの位相が 3 つの遺伝子すべてで前進を示した。また、1 日の拘束ストレスによって ZT6 のポイントで時計遺伝子発現を測定すると、*Per1*、*Bmal1* の発現は増加し、*Per2* は減少した。ストレスが小腸時計遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された。ストレスホルモンとして知られるグルココルチコイドは、副腎皮質から分泌され、その分泌には、顕著な日内リズムがある(Krieger DT et al., 1971)。また、ストレスは、5-HT 分泌を増加させ、動物とヒトで結腸過敏性になることが知られている。実験 1-2 でも、ストレス負荷により血清中のセロトニン量は増加した。ストレスが誘因となる結腸過敏性の症状は、さまざまな 5-HT₃ 受容体のアンタゴニストによって軽減される(Spiller RC. 2011, Hirata T et al., 2008)。さらに、交代制勤務のような概日リズム障害は、近年増加する過敏性腸症候群(Irritable Bowel Syndrome : IBS)を悪化させる(Konturek PC et al., 2011, Nojkov B et al., 2010, Kim HI et al., 2013)。本研究によりストレスがセロトニン放出を増加し、セロトニンが時計遺伝子発現に影響を与えることが示唆された。そして、IBS をさらに悪化させる可能性もある。しかし、IBS と体内時計の関連を検証している報告は未だないため、IBS と体内時計に相互作用が直接的にあるか間接的にあるかはわからない。今後、時計遺伝子変異マウスを用いて検証をする必要性がある。

PCPA 投与処置をしたマウスでは、*Per1* と *Per2* の発現リズムは、平坦化した。これは、5-HT₃、または 5-HT₄ 受容体機能の鋭い遮断が、腸の概日リズムに弱い影響を及ぼすことを示唆するが、慢性的な PCPA による遮断は、腸で概日時計機能を減弱させる。概日リズムが、栄養分の吸収、腹部運動、糞便排出(Buijs R et al., 2013, Stenvers DJ et al., 2012, Cagampang FR et al., 2012)といった腸の概日機能を制御することから、これらの腸の概日機能は、PCPA 投与などによる 5-HT 系の慢性的な抑制によって妨げら

れる可能性がある。腸での 5-HT 含有量の日内リズムを調べている報告はまだないが、脳ではいくつかある(Ferraro JS et al., 1990, Cagampang FR et al., 1993, Nagayama H. 1999)。ハムスターで視床下部での 5-HT 含有量は、ZT3-ZT15 で高く、ZT18-ZT0 で低い(Ferraro JS et al., 1990)。もし、視床下部での 5-HT 含有量の日内変動に腸での 5-HT 含有量の日内変動が似ているならば、ZT3-ZT15 で増加した 5-HT 含有量がこれらの ZT の周辺で *Per1*、*Per2* の遺伝子発現増加に貢献する可能性がある。SCN を含む脳での 5-HT 系は、PCPA 投与によって崩壊する可能性があり、このことが、腸の時計システムに影響を及ぼす可能性がある。しかし、5,7DHT 注射や 5-HT 神経毒薬による 5-HT 系の破壊は、明暗条件下で日内活動リズムに影響はなく、トリアゾラムや光によって位相シフト効果があった(Morin LP et al., 1991, Cutrera RA et al., 1994)。今後さらなる実験として、肝臓や肺など他の臓器で、PCPA 投与による時計機構がどのように変化するかを判断する必要がある。

5-HT 投与は、小腸で濃度依存的に *Per1*、*Per2* の遺伝子発現を増加し、*Bmal1* の発現を減少した。加えて、*Per1*、*Per2* の発現が低い ZT0 と ZT6 に 5-HT 投与群での *Per1*($P<0.01$)、*Per2*($P<0.05$)の遺伝子発現はともに増加した。*Bmal1* の発現は、ZT12 と ZT18 で低く、5-HT 投与群でさらに有意に減少した。したがって、5-HT 投与による *Per1*、*Per2* の発現増加と *Bmal1* の発現減少は、5-HT の作用だと考えられる。時間薬理学の観点から 5-HT は 1 日を通してではなく、ある時点で時計遺伝子リズムに影響を及ぼす。そして 5-HT に類似構造の薬の投与は、概日システム上効能がネガティブに働くことを減らすための考慮が必要であることを示唆するものになった。

5-HT₃ 受容体のアンタゴニストと 5-HT₄ 受容体のアゴニストが IBS 患者に使われるように(Ford AC et al., 2009, Manabe N et al., 2010, Spiller RC. 2011)、類似の効果を期待し、5-HT₃、5-HT₄ 受容体アゴニストとアンタゴニストが 5-HT 同様に時計遺伝子発現へ影響を及ぼすかについて調べた。予測に反して、5-HT₃、5-HT₄ 受容体アゴニストで

は、*Per1*、*Per2*の発現は増加し、*Bmal1*は減少した。これは、5-HTによる時計遺伝子発現への影響が、5-HT₃、5-HT₄受容体の両方の活性化を介している可能性を示唆した。この仮説は、5-HTが引き起こす時計遺伝子発現変化を5-HT₃、5-HT₄受容体のアンタゴニストが妨げることからもよくわかる。5-HT₄受容体のアゴニストが5-HT₃受容体のアゴニストより比較的強い結果を得たことは、本実験のように同量投与すると5-HT₃受容体アゴニストのフェニルピグアニドの分子量248と5-HT₄受容体アゴニストの5Metの分子量190の分子量の差による可能性が考えられる。投薬量の単位として、分子量を考慮することは、受容体占有、相互作用を理解するために容易である。5-HT₄受容体の刺激は、刺激性Gタンパク質の活性化に関与している。また、プロテインキナーゼA (PKA) と cAMP 反応要素結合タンパク質(CREB)活性につながる(Noda M et al., 2004)。*Per1*、*Per2*の遺伝子発現は、CREBの活性化と*Per1*、*Per2*のプロモーター領域におけるCREの結合によって増加する(Lee B et al., 2010)。一方で、5-HT_{1a}による抑制性Gタンパク質活性化は、ハムスターのSCNで*Per1*、*Per2*の発現を減少させる(Horikawa K et al., 2000)。このように、時計遺伝子の発現は、5-HT受容体のサブタイプによって異なって制御されている。5-HT₃受容体の刺激は、受容体作動性のNaイオンチャネル活性化を引き起こす(Noda M et al., 2004)。グルタミン酸受容体刺激によるNaイオンチャネル活性化がSCNの*Per1*と*Per2*の発現を増加させることから(Paul KN et al., 2005)、興奮性効果は、*Per1*と*Per2*の発現を増加させる可能性がある。本実験では5-HT₃、5-HT₄受容体のアンタゴニスト単独、または、両方同時投与のどちらも腸での時計遺伝子発現に影響を及ぼさないことを明らかにした。

三環系抗うつ薬とセロトニン選択再摂取抑制薬などの抗抑うつ薬は、悪心または嘔吐といった消化機能に関して副作用があるということが知られている。これらの副作用は、ミルタザピンによって軽減され、ミルタザピンは5-HT₃の受容体の妨害を生じる(Pae CU et al., 2006, Omori IM et al., 2010)。クロミプラミンとフルボキサミンは両方とも

強いセロトニン再摂取抑制剤であり(Omori IM et al., 2010, Anderson IM. 2001)、フルボキサミンは、摘出されたマウスの回腸でセロトニンを放出する(Minami M et al., 2003)。この2つの薬を使って、時計遺伝子発現について調べた。*Per1*、*Per2*、*Bmal1*の発現に関してほとんど効果が観察されなかった。そして、抗うつ薬の副作用が腸のサーカディアンリズムを経て引き起こされない可能性を示唆した。

本実験では、腸の5-HT系の活性化が、5-HT₃と5-HT₄受容体を経て概日時計遺伝子発現において重要な役割を果たすことが示した。5-HT₃と5-HT₄受容体アンタゴニストは、ストレス、もしくは、5-HTによって誘発される異常な時計遺伝子の発現を減らすことに役立つ場合があることが示された。

ストレスにより副交感神経系が刺激され、アセチルコリンの放出が促進され、消化管活動が活発になることは知られている。アセチルコリンの放出量の調節にセロトニンが関わっている。5-HT₄受容体にセロトニンが結合すると、アセチルコリンの放出が促進され、消化管活動が活発になる。また、大腸の運動は、昼間に起こり、起床後や朝食後に起こりやすい。大腸では体内時計の役割として蠕動運動の調節が考えられる。マウスを用いた実験では、排便行為や排便量に、明確なリズムがみられ、夜間のはじめから夜間の終わりにかけてピークがみられる(Hooqwerf WA et al., 2008, 2010)。さらに、輪走筋収縮でも昼間と比較して夜間の方がアセチルコリンに対する感受性が高まる。また、大腸内圧力も昼間は間欠的な圧力上昇が認められ、夜間は持続的な圧力上昇が認められる。時計遺伝子の*Per1*と*Per2*の両方に変異をもったマウスでは、排便リズム、アセチルコリン感受性リズム、大腸内圧力リズムが消失したが、どちらか片方の変異だけでは、リズム消失は顕著でなかった。このことは、大腸における体内時計リズム性の機能に*Per1*、*Per2*の両方の遺伝子の働きが重要であることを示唆した。ほかにも、輪走筋弛緩を引き起こす一酸化窒素(NO)の産生を止めるために、nNOSノックアウトマウスを用いた実験で、大腸の運動性リズムが消失した。このことは、体内時計の下流

に nNOS 機構があり、体内時計の不調は nNOS を介して体内時計性の制御が消失したと思われ、これが、シフトワークや海外旅行の時差ぼけ時に起こる消化管の不調の原因と考えられる。大腸での時計遺伝子のリズム性発現の研究においては、大腸の壁内神経叢に時計遺伝子が発現し、かつ明瞭なリズムが示されている。マウスでは、*Per2* 時計遺伝子の発現が、肝臓の *Per2* 発現リズムと類似して夜間の真ん中であり、絶食下でも影響を受けず、食餌性同調を受けることがわかっている。

本実験では、摘出腸管のアセチルコリン刺激に対する反応性の昼夜差を比較し、WT マウスでは、昼夜差があり、*Clock(-/-)* マウスではアセチルコリン刺激に対する反応性の強さは大きくなるが、昼夜差はなくなり、また、PCPA 投与マウスでも昼夜差がなくなった。このことから、回腸でも大腸同様に時計遺伝子が関与している可能性やセロトニンとアセチルコリンの相互作用が示唆された。

今後は、ストレスが直接的にアセチルコリンに対する感受性について調べる必要がある。

第4章 総括

第2章では、肝臓へのTG蓄積への体内時計の関与について食餌スタイルと時計遺伝子変異マウス *Clock(-/-)*マウスを用いて調べた。絶食によって、肝臓のTG蓄積が増加し、絶食時間は、24時間が最も蓄積量を増加させることがわかった。しかし、絶食開始時刻は、どのタイミングであっても肝臓TG蓄積へは影響を及ぼさなかった。このことから、概日時計システムは、絶食による肝臓TG蓄積を制御する可能性がないことが示唆された。また、食餌スタイルでは、朝もしくは夕のどちらか1食の食餌スタイルが、絶食によって誘発される肝臓TG蓄積を減弱させることを示した。また、給餌時間を制限すると自由摂食群と比較して、絶食が誘発する肝臓へのTG蓄積を軽減し、その給餌制限時間は、12時間よりも6時間、6時間よりも3時間の給餌群が肝臓TG蓄積を軽減した。さらに、肝臓脂質は、24時間の絶食によって、*Srebp-1c*、*Acc*、*Fas*の遺伝子発現を減少させ、*Ppar α* 、*Pgc-1 α* 、*Cpt1*と*Pepck*の遺伝子発現を増加させた。このように、*Srebp-1c*、*Acc*、*Fas*の肝臓での発現減少は、体のエネルギー不足に対する適応応答かもしれない。*Fatp1*遺伝子発現は、24時間絶食で増加し、この増加は、3時間の制限給餌によって減弱された。絶食マウスにおける肝臓のTG蓄積が多いことは、肝臓にFFAの流入増加による可能性があり、3時間制限給餌ではFFA流入能力が減弱される可能性がある。今後は、制限給餌が肝臓TG蓄積を軽減する機序はまだわかっていないので、肝臓脂質も含めて解明に努めていきたい。また、時計遺伝子変異マウス *Clock(-/-)*マウスでは、肝臓へのTG蓄積がWTマウスと比較して軽減することがわかった。本実験では、WTマウスとの違いとして、*Clock(-/-)*マウスの食行動に注目し食習慣が肝臓でのTG蓄積に影響を及ぼす可能性があることを示唆した。今後は、さらに、*Clock(-/-)*マウスの肝臓脂質を調べてWTマウスとの違いを明らかにしたい。他の時計遺伝子変異マウスやシフト

ワークモデルマウスでの肝臓 TG 蓄積についても検討していく。肝臓 TG 蓄積の機序を検討することは、医療と産業の 2 つの側面に影響を及ぼす。医療面で、さまざまなライフスタイルが食習慣を変化させる中で、健康的に食事をとることの手助けとなり、生活習慣病予防に繋がると考えられる。一方で、産業面では、体内時計との関係や食事パターンによって倫理的にかつ健康的に肝臓に脂肪を蓄積することができ高品質な食材の提供が可能になる。

第 3 章では腸と体内時計の関与について、私たちが日常ストレスを感じた時、腸の異常を訴えることが多いことからストレスを起点に実験を行った。小腸で、拘束ストレスによって時計遺伝子の *Per1*、*Per2*、*Bmal1* の発現リズムの位相が 3 つの遺伝子すべてで前進を示した。また、発現量への影響も確認した。ストレスが、小腸の時計遺伝子発現に影響を及ぼすことがわかった。さらに、ストレスによって血中セロトニンがより分泌されることもわかった。今後は、小腸、大腸の組織でもセロトニン量を計測したいと考えている。PCPA 投与によってセロトニン合成を全身レベルで阻害することで *Per1*、*Per2* の発現は減少し *Bmal1* の発現は増加した。セロトニン投与では、逆の結果を示した。加えて、発現リズムにも影響を及ぼし PCPA 投与を施すとリズム性を減弱させた。このことから、セロトニンが小腸の時計遺伝子発現に影響を及ぼすことがわかった。加えて、5-HT₃ と 5-HT₄ 受容体のアゴニスト、アンタゴニスト刺激による時計遺伝子発現への影響より腸の 5-HT 系の活性化が、5-HT₃ と 5-HT₄ 受容体を経て概日時計遺伝子発現において重要な役割を果たすことが示された。また消化機能を検証するために行った実験では、抗うつ薬であるクロミプラミン、フルボキサミンを投与しても時計遺伝子発現へ影響を及ぼさないことから、抗うつ薬の副作用が腸のサーカディアンリズムを経て引き起こされない可能性を示唆した。また、アセチルコリン刺激の反応性では、WT マウスで昼夜差がみられ、時計遺伝子変異マウス *Clock*(-/-)マウスでも PCPA 投与マウスでも昼夜差がみられなかった。時計遺伝子変異マウス *Clock*(-/-)マウスでは、刺激に対

する反応は強かったが PCPA 投与マウスでは反応性も減弱した。このことから、時計遺伝子が回腸で関与している可能性、そして、セロトニンとアセチルコリンの相互作用による腸への影響が示唆された。今後は、PCPA 投与マウスやシフトワークモデルマウスなどを用いてアセチルコリン刺激の影響やセロトニンとアセチルコリンの相互作用の機序について調べていきたい。さらに、ストレスと腸について、ストレス負荷が脳へ影響して腸に症状が生じるのか、それとも、腸が独立してストレスの影響を受けるのかを体内時計との関連について調べ、そして、過敏性腸症候群(IBS)や炎症性腸疾患(IBD)などの治療につなげたい。

消化器系と体内時計についての研究は、ライフスタイルが日々変化する私たちの社会生活の中で食事、代謝、消化を考えるととても重要であり、生活習慣病の予防や現代が抱えるストレス誘因とされる疾患の治療に役立つものになることを期待し、今後も研究を続けていきたい。

謝辞

本論文の作製にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 柴田重信教授に甚大なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、ご協力頂きました柴田研究室の皆様に心より感謝いたします。

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、早稲田大学大学院先進理工学研究科に提出されたものである。

Natsumi Aoki, Hiroyuki Watanabe, Kazuya Okada, Kazuyuki Aoki, Takuma Imanishi, Daisuke Yoshida, Ryosuke Ishikawa, and Shigenobu Shibata.
Involvement of 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in the regulation of circadian clock gene expression in mouse small intestine.

Journal of Pharmacological Sciences. 2014; 123: 402-406

参考文献

Anderson IM. Meta-analytical studies on new antidepressants. *Br Med Bull.* 2001; 57: 161-178.

Angleton P, Chandler WL, Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation.* 1989; 79: 101-106

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231.

Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell*

Balakrishnan A, Stearns AT, Ashley SW, Tavakkolizadeh A, Rhoads DB. Restricted feeding phase shifts clock gene and sodium glucose cotransporter 1 (SGLT1) expression in rats. *J Nutr.* 2010; 140: 908-914

Balakrishnan A, Stearns AT, Rounds J, Irani J, Giuffrida M, Rhoads DB et al., Diurnal rhythmicity in glucose uptake is mediated by temporal periodicity in the expression of the sodium-glucose cotransporter

Bellamy N, Sothorn RB, Campbell J, Buchanan WW. Circadian rhythm in pain, stiffness, and manual dexterity in rheumatoid arthritis: relation between discomfort and disability. *Ann Rheum Dis.* 1991; 50: 243-24

Bellamy N, Sothorn RB, Campbell J, Buchanan WW. Rhythmic variations in pain, stiffness, and manual dexterity in hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 1075-1080

Bernardi RE, Spanagel R. The Clock Δ 19 mutation in mice fails to alter the primary and secondary reinforcing properties of nicotine. *Drug Alcohol Depend.* 2013; 133: 733-739

Bosler O, Beaudet A. VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytol.* 1985; 14: 749-763

Bosler O. Ultrastructural relationships of serotonin and GABA terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. Evidence for a close interconnection between the two afferent systems. *J Neurocytol.* 1989; 18: 105

Bray MS, Tsai JY, Villeqas-Montoya C, Boland BB, Blasier Z, Eqbejimi O et al., Time-of-day-dependent dietary fat consumption influences multiple cardiometabolic syndrome parameters in mice. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 1589-1598

Buijs R, Salgado R, Sabath E, Escobar C. Peripheral circadian oscillators: time and food. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013; 119: 83-103.

Cagampang FR, Bruce KD. The role of the circadian clock system in nutrition and metabolism. *Br J Nutr* 2012; 8: 1-12.

Cagampang FR, Yamazaki S, Otori Y, Inouye SI. Serotonin in the raphe nucle: regulation by light and an endogenous pacemaker. *Neuroreport.* 1993; 5: 49-52.

Cho K. Chronic 'jet lag' produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nat Neurosci* 2001 ; 4(6) : 567

Ciarleglio CM, Resuehr HE, McMahon DG. Interactions of the serotonin and circadian systems: nature and nurture in rhythms and blues. *Neuroscience.* 2011;197 :8-16

Cutrera RA, Kalsbeek A, Pevet P. Specific destruction of the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei prevents triazolam-induced phase advances of hamster activity rhythms. *Behav Brain Res.* 1994; 62: 21-28

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 2000; 14: 2950-2961

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.

Dos Santos ML, Aragon FF, Padovani CR, Pimenta WP. Daytime variations in glucose tolerance in people with impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 74(3): 257-262.

Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S, et al. Altered Patterns of Sleep and Behavioral Adaptability in NPAS2-Deficient Mice. *Science.* 2003; 301: 379-383.

Duncan WC Circadian rhythms and the pharmacology of affective illness. *Pharmacol Ther.* 1996; 71: 253-312.

Easton A, Arbuzova J, Turek FW. The circadian Clock mutation increases exploratory activity and escape-seeking behavior. *Genes Brain Behav.* 2003; 2: 11-19

Fatima J, Iqbal CW, Houghton SG, Kasperek MS, Duenes JA, Zheng Y et al., Hexose transporter expression and function in mouse small intestine: role of diurnal rhythm. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13: 634-641

Ferraro JS, Steger RW. Diurnal variations in brain serotonin are driven by the photic cycle and are not circadian in nature. *Brain Res.* 1990; 512: 121-124.

Flett J, Colwell CS. Serotonin modulation of calcium transients in cells in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*. 1999; 14: 354-63

Florez JC, Takahashi JS. The circadian clock: from molecules to behaviour. *Ann Med*. 1995; 27: 481-490

Forbes-Robertson S, Dudley E, Vadgama P, Cook C, Drawer S, Kilduff L. Circadian disruption and remedial interventions: effects and interventions for jet lag for athletic peak performance. *Sports Med*. 2012; 42: 185-208

Ford AC, Brandt LJ, Young C, Chey WD, Foxx-Orenstein AE, Moayyedi P. Efficacy of 5-HT₃ antagonists and 5-HT₄ agonists in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104: 1831-1843

Fujimura J, Haruma K, Hata J, Yamanaka H, Sumii K, Kajiyama G. Quantitation of duodenogastric reflux and antral motility by color Doppler ultrasonography. *Scand J gastroenterol*. 1994; 29: 897-902

Fuller PM, Lu J, Saper CB. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science*. 2008; 320: 1074-1077

Gale JD, Grossman CJ, Whitehead JW, Oxford AW, Bunce KT, Humphrey PP, GR113808: a novel, selective antagonist with high affinity at the 5-HT₄ receptor. *Br J Pharmacol*. 1994; 111(1):332-338.

Gan SK, Watts GF. Is adipose tissue lipolysis always an adaptive response to starvation?: implications for non-alcoholic fatty liver disease: Review. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 543-545

Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, DiNardo L. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 2003; 23: 7451-7460

Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, Granneman JG, Piomelli D, Leff T, Sassone-Corsi P. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . *Cell Metab* 2010; 12: 509-505

Grimm IS, Schindler W, Haluszka O. Steatohepatitis and fatal hepatic failure after biliopancreatic diversion. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 775-779.

Grossman GH, Mistlberger RE, Antle MC, Ehlen JC, Glass JD. Sleep deprivation stimulates serotonin release in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport.* 2000; 11: 1929-1932.

Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells.* 2001; 6: 269-278

Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S et al., Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 2012; 15: 848-860

Hegde SS, Eglen RM., Peripheral 5-HT $_4$ receptors. *FASEB J.* 1996; (12):1398-1407

Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, Portaluppi F, Smolensky MH. Chronotherapy of hypertension: administration-time-dependent effects of treatment on the circadian pattern of blood pressure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59: 923-939

Hermida RC, Calvo C, Ayala DE, Fernandez JR, Covelo M, Mojon A, Lopez JE. Treatment of non-dipper hypertension with bedtime administration of valsartan. *J Hypertens.* 2005; 23: 1913-1922

Hirao A, Nagahama H, Tsuboi T, Hirao M, Tahara Y, Shibata S. Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in *Per2::Luc* knock-in mice under two meals per day feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 299: G1045-1053

Hirao A, Tahara Y, Kimura I, Shibata S. A Balanced Diet is Necessary for Proper Entrainment Signals of the Mouse liver Clock. *PLoS One.* 2009; 4: e6909

Hirata T, Keto Y, Nakata M, Takeuchi A, Funatsu T, Akuzawa S et al., Effects of serotonin 5-HT₃ receptor antagonists on stress-induced colonic hyperalgesia and diarrhoea in rats: a comparative study with opioid receptor agonists, a muscarinic receptor antagonist and a synthetic polymer. *Neurogastroenterol Motil.* 2008; 20: 557-565

Hooqerwerf WA, Shahinian VB, Cornelissen G, Halberg F, Bostwick J, Timm J, et al., Rhythmic changes in colonic motility are regulated by period genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298: 143-150

Hooqerwerf, WA, Shnha M, Conesa A, Luxon BA, Shahinian VB, Cornelissen G, et al., Transcriptional Profiling of mRNA Expression in the Mouse Distal Colon. *Gastroenterology.* 2008; 135: 2019-2029

Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H et al., Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonists accompanied by reduced *Per1* and *Per2* mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci.* 2000; 20: 5867-5873

Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5987-5992

Hsieh MC, Yang SC, Tseng HL, Hwang LL, Chen CT, Shieh KR. Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 227-239.

Inouye ST, Shibata S. Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Res.* 1994; 20: 109-130.

Kario K, Schwartz JE, Pickering TG. Changes of nocturnal blood pressure dipping status in hypertensives by nighttime dosing of alpha-adrenergic blocker, doxazosin : results from the HALT study. *Hypertension.* 2000; 35: 787-794

Kilpatrick GJ, Butler A, Burridge J, Oxford AW. ;1-(m-chlorophenyl)-biguanide, a potent high affinity 5-HT₃ receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1990; 21: 182(1):193-197

Kim HI, Jung SA, Choi JY, Kim SE, Jung HK, Shim KN et al., Impact of shiftwork on irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *J Korean Med Sci.* 2013; 28: 431-437

King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 3: 713-742

King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, et al. Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock gene. *Cell.* 1997; 89: 641-653

Kiss J, Leranath C, Halasz B. Serotonergic endings on VIPneurons in the suprachiasmatic nucleus and on ACTH-neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high-resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemistry. *Neurosci Lett.* 1984; 44: 119 –124

Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 2007; 5: 414-421

Koizumi H, Kurabayashi N, Watanabe Y, Sanada K. Increased anxiety in offspring reared by circadian Clock mutant mice. *PLoS One*. 2013; 8: e66021

Kojima S, Ikeda M, Kamikawa Y. Loperamide Inhibits Tachykinin NK3 – Receptor-Triggered serotonin Release Without Affecting NK2 Receptor-Triggered serotonin Release From Guinea Pig Colonic Mucosa. *J Phamacol Sci* 2005; 98: 175 – 180

Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*. 2011; 62: 139-150

Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis : Review. *Clin Mol Hepatol* 2013; 3: 210-215

Kowanko IC, Knapp MS, Pownall R, Swannell AJ. Domiciliary self-measurement in the rheumatoid arthritis and the demonstration of circadian rhythmicity. *Ann Rheum Dis*. 1982; 41: 453-455

Krieger DT, Allen W, Rizzo F, Krieger HP. Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1971; 32: 266-284

Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Watanabe Y et al., Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotatingshift workers, findings from the Japan collaborative cohort study. *Am J Epidemiol*. 2006; 164: 549-555

Kudo T, Horikawa K, Shibata S. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: the circadian clock and hyperlipidemia. *J Pharmacol Sci*. 2007; 103: 139-143.

Kudo T, Kawashima M, Tamagawa T, Shibata S. Clock mutation facilitates accumulation of cholesterol in the liver of mice fed a cholesterol and/or cholic acid diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294: E120-130

Kudo T, Tamagawa T, Kawashima M, Mito N, Shibata S. Attenuating effect of clock mutation on triglyceride contents in the ICR mouse liver under a high-fat diet. *J Biol Rhythms.* 2007; 22: 312-323

Kudo T, Tamagawa T, Shibata S. Effect of chronic ethanol exposure on the liver of Clock-mutant mice. *J Circadian Rhythms* 2009; 7: 4

Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Sasso GL, Moschetta A, Schibler U. REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000181

Lee B, Li A, Hansen KF, Cao R, Yoon JH, Obrietan K. CREB influences timing and entrainment of the SCN circadian clock. *J Biol Rhythms.* 2010; 25: 410-420

Lottenberg AM, Afonso Mda S, Lavrador MS, Machado RM, Nakandakare ER . The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome: Review. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 1027-1040

Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA et al., A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT 7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron.* 1993; 11: 449-458

Lungwitz E, Gannon RL. Serotonin $1A$ -mediated amplification of light-induced phase advances of circadian rhythms in the Syrian hamster: post-light effects. *Brain Res.* 2009; 1250: 157-163

Ma Y, Bertone ER, Stanek EJ 3rd, Reed GW, Hebert JR, Cohen NL et al., Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *Am J Epidemiol.* 2003; 158(1): 85-92

Manabe N, Wong BS, Camilleri M. New-generation 5-HT₄ receptor agonists: potential for treatment of gastrointestinal motility disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010; 19: 765-775

Manrique C, Segu L, Héry F, Héry M, Faudon M, François-Bellan AM. Increase of central 5-HT_{1B} binding sites following 5,7-dihydroxytryptamine axotomy in the adult rat. *Brain Res.* 1993; 623: 345–348

Manrique C, François-Bellan AM, Segu L, Becquet D, Héry M, Faudon M, Héry F. Impairment of serotonergic transmission is followed by adaptive changes in 5HT_{1B} binding sites in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 1994; 663: 93–100

Marchant EG, Watson NV, Mistlberger RE. Both neuropeptide Y and serotonin are necessary for entrainment of circadian rhythms in mice by daily treadmill running schedules. *J Neurosci.* 1997; 17: 7974-7987

McFarland RJ, Gazet JC, Pilkington TR. A 13-year review of jejunoileal bypass. *Br J Surg* 1985; 72: 81-87

Minami M, Taguchi S, Kikuchi T, Endo T, Hamaue N, Hiroshige T et al., Effects of fluvoxamine, a selective serotonin re-uptake inhibitor, on serotonin release from the mouse isolated ileum. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2003; 113-114: 115-131

Moller L, Stodkilde-Jorgensen H, Jensen FT, Jorgensen JO. Fasting in healthy subjects is associated with intrahepatic accumulation of lipids as assessed by 1H-magnetic resonance spectroscopy. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 547-552.

Morin LP, Blanchard J. Depletion of brain serotonin by 5, 7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain Res.* 1991; 566: 173-185.

Moriya T, Yoshinobu Y, Ikeda M, Yokota S, Akiyama M, Shibata S. Potentiating action of MKC-242, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, on the photic entrainment of the circadian activity rhythm in hamsters. *Br J Pharmacol.* 1998; 125: 1281-1287

Murphy BA, Elliott JA, Sessions DR, Vick MM, Kennedy EL, Fitzgerald BP. Rapid phase adjustment of melatonin and core body temperature rhythms following a 6-h advance of the light/dark cycle in the horse. *J Circadian Rhythms.* 2007; 5: 5

Nagayama H. Influences of biological rhythms on the effects of psychotropic drugs. *Psychosom Med.* 1999; 61: 618-629.

Nishimura K, Kato H, Saito M. Effects of cyclic and continuous total enteral nutrition on 24-h rhythms of body temperature and urinary excretions. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1992; 38 : 117-125

Noda M, Higashida H, Aoki S, Wada K. Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol Neurobiol.* 2004; 29: 31-39.

Nojkov B, Rubenstein JH, Chey WD, Hoogerwerf WA. The impact of rotating shift work on the prevalence of irritable bowel syndrome in nurses. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105: 842-847.

Ohdo S, Koyanagi S, Suyama H, Higuchi S, Aramaki H. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nature Med.* 2001; 7: 356-360

Ohdo S, Ogawa N, Nakano S, Higuchi S. Influence of feeding schedule on the chronopharmacological aspects of sodium valproate in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 278: 74-81

Ohdo S. Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics.* 2007; 22: 3-14.

Oishi K, Atsumi G, Sugiyama S, Kodomari I, Kasamatsu M, Machida K et al., Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. *FEBS Lett.* 2006; 580: 127-130

Omori IM, Watanabe N, Nakagawa A, Cipriani A, Barbui C, McGuire H et al., Fluvoxamine versus other anti – depressive agents for depression. *Cochrane Databases Syst Rev.* THE COCHRANE COLLABORATION. WILEY. 2010; Issue 3

Pae CU, Serretti A, Artioli P, Kim TS, Kim JJ, Lee CU et al., Interaction analysis between 5-HTTLPR and TNFA -238/-308 polymorphisms in schizophrenia. *J Neural Transm.* 2006; 113: 887-897.

Pan X, Jiang XC, Hussain MM. Impaired cholesterol metabolism and enhanced atherosclerosis in clock mutant mice. *Circulation.* 2013; 128: 1758-1769.

Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* 2013; S0962-8924.

Paul KN, Fukuhara C, Karom M, Tosini G, Albers HE. AMPA/kainate receptor antagonist DNQX blocks the acute increase of Per2 mRNA levels in most but not all areas of the SCN. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 139: 129-136

Paulus EV, Mintz EM. Developmental disruption of the serotonin system alters circadian rhythms. *Physiol Behav.* 2012; 105: 257-263

Pickard GE, Smith BN, Belenky M, Rea MA, Dudek FE, Sollars PJ. 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 1999; 19: 4034-4045

Portaluppi F, Vergnani L, Manfredini R, degli Uberti EC, Fersini C. Time-dependent effect of isradipine on the nocturnal hypertension in chronic renal failure. *Am J Hypertens.* 1995; 8: 719-726

Prosser RA, Dean RR, Edgar DM, Heller HC, Miller JD. Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *J Biol Rhythms.* 1993; 8: 1-16

Quintero JE, McMahon DG. Serotonin modulates glutamate responses in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurophysiol.* 1999; 82: 533-539

Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. The clockwork of metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27: 219-240

Refinetti R, Lissen GC, Halberg F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biological Rhythm Research.* 2007; 38: 275-325

Reinberg A, Pauchet F, Ruff F, Gervais A, Smolensky MH, Levi F et al., Comparison of once-daily evening versus morning sustained-release theophylline dosing for nocturnal asthma. *Chronobiol Int.* 1987; 4: 40

Roden M. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes pathogenesis and clinical relevance: Review. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 335-348

Schernhammer ES, Kroenke CH, Laden F, Hankinson SE. Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology.* 2006; 17: 108-111

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I et al., Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1563-1568

Schuhler S, Pitrosky B, Saboureau M, Lakhdar-Ghazal N, Pévet P. Role of the thalamic intergeniculate leaflet and its 5-HT afferences in the chronobiological properties of 8-OH-DPAT and triazolam in syrian hamster. *Brain Res.* 1999; 849: 16-24

Sharara-Chami RI, Zhou Y, Ebert S, Pacak K, Ozcan U, Majzoub JA. Epinephrine deficiency results in intact glucose counter-regulation, severe hepatic steatosis and possible defective autophagy in fasting mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 905-913

Shibata S, Hirao A, Tahara Y. Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm. *Sleep and Biological Rhythms. Review.* 2010; 8: 18-27

Shibata S, Tahara Y, Hirao A. The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 918-927

Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H et al., Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell.* 1997; 91: 1043-1053

Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, Tezuka M, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y, Komiyama K, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K, Saito M. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One* 2011; 6: e25231

Smolensky MH, Labrecque G. Chronotherapeutics. *Pharmaceutical News* . 1997; 4 : 10-16

Sokolović M, Sokolović A, van Roomen CP, Gruber A, Ottenhoff R, Scheij S, Hakvoort TB, Lamers WH, Groen AK. Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis--transcriptomic and lipid profiling. *J Hepatol* 2010; 52: 737-744

Spiller RC. Targeting the 5-HT₃ receptor in the treatment of irritable bowel syndrome. *Curr Opin Pharmacol.* 2011; 1: 68-74

Stenvers DJ, Jonkers CF, Fliers E, Bisschop PH, Kalsbeek A. Nutrition and the circadian timing system. *Prog Brain Res.* 2012; 199: 359-376

Takahashi S, Yoshinobu Y, Aida R, Shimomura H, Akiyama M, Moriya T, et al., Extended action of MKC-242, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, on light-induced Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Neurosci Res.* 2002; 68: 470-478

Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, Arcaro G. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 2119-21

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene, *Nature* 1997 ; 389 : 512-516

Turkish AR. Nonalcoholic fatty liver disease: emerging mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab. Care* 2008; 11: 128-133

Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD et al., Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science.* 1994; 264 :719-725

Wang X, Xue J, Yang J, Xie M. Timed high-fat diet in the evening affects the hepatic circadian clock and PPAR α -mediated lipogenic gene expressions in mice. *Genes Nutr* 2013; 8: 457-463

Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci*. 2001; 13: 1190-1196.

Wong T, Yang P, Zhan Y, Xia L, Hua Z, Zhang J. Deletion of circadian gene Per1 alleviates acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology* 2013; 51295: 1-9

Wu X, Wiater, MF, Ritter S. NPAS2 deletion impairs responses to restricted feeding but not to metabolic challenges. *Physiol Behav*. 2010; 99(4): 466-471

Yamada J, Sugimoto Y, Yoshikawa T, Horisaka K., Hyperglycemia induced by the 5-HT receptor agonist, 5-methoxytryptamine, in rats: involvement of the peripheral 5-HT_{2A} receptor. *Eur J Pharmacol*. 1997;4:323(2-3):235-240.

Yoshida C, Shikata N, Seki S, Koyama N, Noguchi Y. Early nocturnal meal skipping alters the peripheral clock and increases lipogenesis in mice. *Nutr Metab (Lond)* 2012; 9: 78-88.

石田直理雄、本間研一 編、2008、時間生物学辞典、朝倉書店、129

研究業績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○<u>Natsumi Aoki</u>, Hiroyuki Watanabe, Kazuya Okada, Kazuyuki Aoki, Takuma Imanishi, Daisuke Yoshida, Ryosuke Ishikawa, and Shigenobu Shibata. Involvement of 5-HT3 and 5-HT4 receptors in the regulation of circadian clock gene expression in mouse small intestine. Journal of Pharmacological Sciences. 2014; 123: 402-406</p>
講演	<p>国内学会(口頭発表)</p> <p>○<u>青木菜摘</u>、濱口雄太郎、中村果愛、石川亮佑、柴田重信 時計遺伝子変異マウスの脂肪肝形成の特徴について 『第 67 回日本栄養・食糧学会』名古屋 2013 年 5 月</p> <p>○<u>青木菜摘</u>、今西拓麻、濱口雄太郎、平尾彰子、柴田重信 時間栄養学の視点から考える含塩食物摂取が代謝機能に及ぼす影響 『減塩サミット』呉 2012 年 5 月</p> <p>○<u>青木菜摘</u>、濱口雄太郎、平尾彰子、柴田重信 Clock 変異マウスの食塩の嗜好性と含塩食物摂取が代謝機能に及ぼす影響 『第 66 回日本栄養・食糧学会』仙台 2012 年 5 月</p> <p>国内学会(ポスター発表)</p> <p>○<u>青木菜摘</u>、石川亮佑、吉田大将、今西拓麻、柴田重信 セロトニン制御による時計遺伝子変化とアセチルコリンとの相互作用による腸の時計遺伝子機能制御 『第 128 回日本薬理学会関東部会』東京 2013 年 7 月</p> <p>○<u>青木菜摘</u>、渡辺博之、今西拓麻、柴田重信 末梢のセロトニンと腸の時計遺伝子発現 『第 127 回日本薬理学会関東部会』東京 2012 年 10 月</p> <p>○<u>青木菜摘</u>、濱口雄太郎、中村果愛、霜田愛美、柴田重信 マウス絶食性の脂肪肝における体内時計遺伝子の関与 『第 19 回時間生物学会』北海道 2012 年 9 月</p> <p>○<u>青木菜摘</u>、渡辺博之、今西拓麻、柴田重信 末梢のセロトニンが腸の時計遺伝子発現に与える影響 『第 14 回応用薬理シンポジウム』山梨 2012 年 9 月</p>

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他	<p>○ <u>Natsumi Aoki</u>, Akiko Hirao, Yuta Fuse, Shigenobu Shibata Influence of circadian clock impairment on discriminative choice of water, sucrose and sucrose/salt contained drinking bottles in mice 『第 89 回日本生理学会大会』松本 2012 年 3 月</p> <p>〈論文〉 E Takita, S Yokota, Y Tahara, A Hirao, <u>N Aoki</u>, S shibata, Biological clock dysfunction exacerbates contact hypersensitivity in mice British Journal of Dermatology, Volume 168, Issue1, 39-46 (2013)</p> <p>〈著書〉 生物時計による生体制御と消化器機能-時間栄養学 - 柴田重信、<u>青木菜摘</u> 『G. I. Reserch』第 20 巻 5 号(2012)</p> <p>〈国内学会〉（ポスター発表）</p> <p>吉田大将、<u>青木菜摘</u>、石川亮佑、柴田重信 マウス大腸上皮細胞の細胞増殖リズム性成因の要素 『第 20 回 時間生物学会』 大阪 2013 年 11 月</p> <p>原口敦嗣、<u>青木菜摘</u>、大津定治、柴田重信 High fat diet feeding duration and time dependent impairment of energy homeostasis and peripheral clock phase 『第 90 回日本生理学会大会』東京 2013 年 3 月</p> <p>原口敦嗣、<u>青木菜摘</u>、大津定治、濱口雄太郎、柴田重信 高脂肪食の摂食時刻・持続時間の体重や脂肪および末梢時計リズムへの影響 『第 19 回日本時間生物学会学術大会』北海道 2012 年 9 月</p> <p>中村果愛、<u>青木菜摘</u>、濱口雄太郎、柴田重信 マウス絶食性の脂肪肝における絶食の内容ならびにタイミングの効果 『第 19 回日本時間生物学会学術大会』北海道 2012 年 9 月</p> <p>濱口雄太郎、黒田大暁、田原優、<u>青木菜摘</u>、柴田重信 シフトワークモデルのマウス体重増加及び行動リズムの乱れに与える効果 『第 19 回日本時間生物学会学術大会』北海道 2012 年 9 月</p>

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>瀧田枝里子、田原優、青木菜摘、成重青等、横田伸一、中尾篤人、柴田重信 マウスにおける概日リズムと接触性過敏症の関係 『第 89 回日本生理学会大会』松本 2012 年 3 月</p> <p>〈国内学会〉（口頭発表）</p> <p>柴田重信、高橋祐輔、大久保理沙、青木菜摘 マウス潰瘍性大腸炎に対する喫煙やニコチンの時間薬理学的作用機構解明 第 27 回平成 23 年度助成研究発表会 東京 2012 年 7 月</p> <p>柴田重信、青木菜摘、濱口雄太郎、原口敦嗣 マウスを用いた時間栄養学視点からの塩分摂取と排泄機構の研究 第 24 回平成 23 年度助成研究発表会 東京 2012 年 7 月</p> <p>霜田愛美、田原優、青木菜摘、平尾彰子、柴田重信 マウスの肝臓脂肪蓄積に対する低アミノ酸食と朝食・夕食の摂餌時刻の効果 『第 66 回日本栄養・食糧大会』仙台 2012 年 5 月</p> <p>大津定治、池田祐子、青木菜摘、大久保理沙、平尾彰子、柴田重信 理想的な 1 週間の生活リズムの追究－マウスの体重及び摂食量による評価 『第 66 回日本栄養・食糧大会』仙台、2012 年 5 月</p>