

博士論文概要

論文題目

マウス末梢体内時計への給餌性同調の栄養学的解明

Nutritional studies of food entrainment on mouse peripheral clock

申請者

平尾	彰子
Akiko	Hirao

電気・情報生命専攻 薬理学研究

2012年12月

本論文は四章で構成される。第一章は序論であり、体内時計、末梢時計、時間栄養学についてこれまでの研究報告に基づいて詳述する。更に、本研究の背景と概要について述べ、当該分野における本論文の意義を示す。第二章は末梢時計の食餌同調における食餌内容について、第三章は食餌同調における食餌のタイミングについて報告する。

地球に存在する我々の生活は、24時間という周期で一日が刻まれている。しかし、人間の本来持っている1日の周期はおよそ24.5時間。このような周期を持った事象・性質をサーカディアンリズム(概日リズム)と呼び、我々の生理機能(睡眠-覚醒、体温、摂食-排泄、ホルモンの分泌など)の多くにこのリズム現象が存在する。臨床上、種々の疾病の症状にも日内リズムが存在し、早朝高血圧や、ぜん息の治療には朝方の投薬、またコレステロールの合成酵素活性は夜間に高いことから、スタチン系の抗高脂血症薬は夕方に投薬する。

人間以外の生物も同様にサーカディアンリズムに沿った1日の周期を示しており、個々のサーカディアンリズムが存在する。このような生命活動におけるサーカディアンリズムを持つ機構を「体内時計」と呼び、様々な生理現象が体内時計にコントロールされて昼夜変動を繰り返している。サーカディアンリズムの昼夜周期への同調は、特定時刻の光が体内時計をリセット(位相変位)することで生じる。マウスやラットは本来夜行性であるが、昼の短い時間だけ食餌を与える制限給餌(Restricted Feeding; RF)を行うと、食餌の時間が近くなるにつれて夜行性のはずのマウスが活動するようになり(Food Anticipate Activity; FAA)、これを食餌性リズムと呼ぶ。このリズムも24時間周期を示しており、食餌の時間に合わせて覚醒状態、活動量、体温、インシュリン、およびコルチコステロン遊離を含む多数の生理的新陳代謝機能がピークを迎える。

この、食餌性リズムの発振(Food Entrainable Circadian Oscillation; FEO)は中心時計の視交叉上核を失っても肝臓などの末梢臓器や視交叉上核以外の脳部位の時計遺伝子発現リズムとして出現する。つまり、この食餌性同調は光以外の体内時計同調因子として働いていると考えられ、視交叉上核の時計遺伝子発現には影響を与えない。食餌による概日リズム同調機構を引き起こす因子の候補として、グルコース等の糖・ホルモン・味覚等の感覚・温度等が考えられ、現在も様々な議論がなされている最中であり、全貌は未解明である。

また、1997年に初めてマウスやヒトの体内時計遺伝子 *Clock* が見出され、体内時計の分子基盤の研究が盛んに行われてきた。体内時計の応用研究が行われるようになり、薬物治療に時刻を考慮し、薬効拡大と副作用軽減を目指した研究領域「時間薬理学」が台頭してきた。一方、体内時計と食品・栄養の関係を研究するに時間栄養学の考えが生まれつつある。「夜食は太る」、「まとめ食いは太る」といったことは、体内時計が食餌のタイミングに影響を及ぼす例であり、栄養物の吸

収・消化・代謝に関わる酵素の遺伝子発現や活性は体内時計の支配下にあるのが多いので、食物・栄養の働きに体内時計が深く関わっている可能性は十分に考えることができる。一方で、食餌のタイミングや食餌内容が、食餌による概日リズム同調にどのようなかわっているかは、不明のままである。そこで、食餌による末梢時計の同調機構を解明する事を目的として、食餌内容・食事間隔を変化させ、どの栄養成分や食餌タイミングが末梢時計の位相決定に関与しているのかという観点のもと、本研究は行なわれた。

第二章食餌内容について。末梢時計における位相前進はグルコースによって、引き起こされる。インシュリン欠損型の糖尿病ラットでは、心臓の時計遺伝子発現がおよそ3時間前進したことが報告されている。このことから、血中グルコース濃度すなわち血糖値が高いことが、末梢時計の位相前進を引き起こすことが示唆される。また、グルコース負荷された Rat-1 線維芽細胞において *Per1*、*Per2* の遺伝子発現低下が確認された。前述したように、給餌制限下において、FAA などの自発運動活性を引き起こすが、このことの多くは餌の中のグルコースであると考えられる。したがって、グルコースが直接的に起因している炭水化物の末梢時計同調促進効果について調べることにした。マウスには AIN-93M という炭水化物、タンパク質、脂質、およびビタミン、ミネラルを含むコントロール食を摂取させる。AIN-93M 栄養成分をコントロールとし、それぞれの栄養成分の部分的または完全置換してその効果を見ることにした。本研究において、肝臓時計の同調には、栄養のバランスが取れた AIN-93M が一番有効であることがわかった。したがって、バランスのとれた食餌は単にその健康と新陳代謝の維持のためだけではなく位相維持にも大きく関与していると考えられた。炭水化物の種類に着目すると、肝臓の体内時計遺伝子発現リズムが、血糖値を上げやすい消化の良いでん粉質で同調されやすいことがわかった。また、ブドウ糖単独よりもブドウ糖とカゼインなどのタンパク質組み合わせが良いことも明らかになった。

ところで、血糖値を上げやすいということは同時にインシュリンを分泌している可能性がある。仮説を立てて、次の実験に移ることにした。そこで着目したのが DHA、EPA を豊富に含む魚油である。*GPR120* 受容体は下部小腸や大腸で発現しており、DHA、EPA などの不飽和脂肪酸をリガンドとして GLP-1 を上昇させインスリン分泌を促すことが分かっている。そこで、このパスウェイが、肝臓における時計遺伝子発現の位相同調をもたらすのかどうかを調べた。その結果、やはり魚油の中でも、マグロなどの DHA/EPA 比率の高い油の方が位相同調作用、インシュリンの分泌いずれ強力であった。また、この作用は *GPR120* の遺伝子変異マウスでは拮抗されることがわかった。

第三章の食事間隔について。ラットの FAA リズムは食餌の量に依存して位相シフトをもたらす可能性が調べられ、食餌を栄養価のない食物繊維又は脂質に置き換えると位相シフトは生じないことが報告された。以上のことから、1日1回の食餌を与える条件において、肝臓体内時計の位相をリセットには食餌の量が重要な因子であることがわかった。そこで、本章では1日2食によって同調される肝臓体内時計の位相が、食餌の量と給餌間隔との組み合わせに依存している可能性について調べた。

マウスに8時間：16時間、12時間：12時間及び16時間：8時間の間隔で1日2食与えた場合、肝臓体内時計の位相は、長い方の絶食間隔で給餌されたときの肝臓体内時計の位相と合っていた。そのため、「絶食後に最初に摂る」食事が肝臓体内時計をリセットするのに有効な信号であると考えた。また、この同調果を「朝食効果」と呼ぶことにした。16時間：8時間で、餌の量比を変えた場合、朝食効果側の働きで16時間側では、餌が少なめでも位相を引っ張ってくる効果が見られた。しかし、朝食効果の機序は複雑で、多くの要因を伴う可能性もある。例えば、食物の消化と栄養吸収そして代謝は、軽度の絶食条件よりも重度の絶食条件下の方が活発となることがある。マウス肝臓内の *Per2*、*Dec1* 及び *Bmal1* 遺伝子発現が絶食によって上昇するので、8時間又は16時間の絶食間隔後の *Per2*、*Dec1* 及び *Bmal1* 遺伝子発現を比較した。これら遺伝子の発現は、8時間絶食に比較して16時間絶食後に増大した。この結果から、これら時計遺伝子の発現増大は、長い絶食後の肝臓体内時計の同調にとっての重要な信号であり得ると考えられる。本研究では、24時間又は48時間絶食後、マウスに餌を経口注入すると、24時間絶食群よりも48時間絶食群で血中グルコース濃度が増大することも分かった。要するに、複数回に分けて制限給餌する条件下では、肝臓体内時計の位相は、食餌の量、絶食間隔といった要因の組み合わせによって決まる。人のライフスタイルを考えると、適切な量の朝食は、肝臓体内時計の位相位置を維持するのに大切なことである。逆に、異常な食習慣は、肝臓体内時計の位相を望ましくないものにする原因となり得る。

第四章は総括として第二章、第三章のまとめと考察事項を記述するとともに食育に結びつく食事メニューの考案やシフトワーカーの食事などの臨床応用に基づいた今後の展望について記述する。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 平尾 彰子 印

(2011年 11月 現在)

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）
①○	Hirao A , Furutani N, Nagahama H, Itokawa M, and Shibata S, The protective and recovery effects of fish oil supplementation on cedar pollen-induced allergic reactions in mice, 2012, Food and Nutrition Sciences 3:40-47.
①	Takita E, Yokota S, Tahara Y, Hirao A , Aoki N, Nakamura Y, Nakao A, Shibata S., Biological clock dysfunction exacerbates contact hypersensitivity in mice., 2012 Br J Dermatol. In press..
①	Kubo Y, Tahara Y, Hirao A , Shibata S., 2,2,2-tribromoethanol phase-shifts the circadian rhythm of the liver clock in per2::luciferase knockin mice: lack of dependence on anesthetic activity., 2012, J Pharmacol Exp Ther. 340(3):698-705
①	Fuse Y & Hirao A , Kuroda H, Otsuka M, Tahara Y, Shibata S., Differential roles of breakfast only (one meal per day) and a bigger breakfast with a small dinner (two meals per day) in mice fed a high-fat diet with regard to induced obesity and lipid metabolism, 2012, J Circadian Rhythms May 15;10(1):4
①	Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Komatsu T, Moriya Y, Okada S, Furutani N, Hirao A , Horikawa K, Kudo T, Shibata S., In Vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse., 2012, Curr Biol. Jun 5;22(11):1029-34.
①	Kuroda H, Tahara Y, Saito K, Ohnishi N, Kubo Y, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Hirao A , Shibata S. Eating habits determine peripheral circadian clocks. Scientific Reports, 2012;2:711
①	Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, Hirao A , Shibata S., Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erba with shifts in the liver clock., 2011, J Biol Rhythms. 26(3):230-40.
①	Okamoto M, Irii H, Tahara Y, Ishii H, Hirao A , Udagawa H, Hiramoto M, Yasuda K, Takanishi A, Shibata S, Shimizu I., Synthesis of a new [6]-gingerol analogue and its protective effect with respect to the development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet., 2011, J Med Chem. 22;54(18):6295-304
①	Tahara Y, Hirao A , Moriya T, Kudo T, Shibata S., Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver Per2 expression in Per2::luc mice., 2010, J Biol Rhythms. 25:9-18
①○	Hirao A , Nagahama H, Tsuboi T, Hirao M, Tahara Y, and 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., 2010, Am J. Physiology 299(5):G1045-53
①○	Hirao A , Tahara Y, Kimura I, Shibata S, A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock., 2009, PLoS One. 4:e6909

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

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）
②	<p>《国際学会》 <u>Akiko Hirao</u>, Breakfast is important for circadian rhythms ?,2012,Auturm Seminar for Introduction of Research Collaborations ,ZAO(Yamagata)</p>
③	<p>《国内学会》 <u>平尾彰子</u>、時間健康科学と肥満、男女共同参画シンポジウム「広がる女性の育成と活躍」、2012、山形大学小石川キャンパス（山形）</p>
②	<p><u>平尾彰子</u>、本当は怖い体内時計の乱れ、山形県立酒田東高等学校創立記念式典記念講演、2012、山形県立酒田東高等学校(山形)</p>
②	<p><u>平尾彰子</u>、体内時計のも誰を改善して理想的な生活を手に入れよう、鶴岡高専地域共同テクノセンター・鶴岡技術振興会主催 市民サロン第一講、2012、庄内産業振興センター(山形)</p>
②	<p><u>平尾彰子</u>、時間栄養学の視点からより良いライフスタイルを考える、日本睡眠学会第37回定期学術集会、2012、パシフィコ横浜(神奈川)</p>
②	<p><u>平尾彰子</u>、柴田重信、マウス体内時計と食・栄養の相互作用、第17回日本時間生物学会学術大会、2009、早稲田大学国際会議場(東京)</p>
②	<p><u>平尾彰子</u>、柴田重信、給餌によるマウス肝臓時計遺伝子発現リズムの影響、早稲田大学TWINS、2009（東京）</p>
	<p><総説></p>
③	<p><u>平尾彰子</u>、～マウス・給餌性同調機構～給餌の時間・量が体内時計に影響、2012、Medical Tribune 本紙、Medical Tribune</p>
③	<p><u>平尾彰子</u>、「健康」とは何か、2012、杉田玄白賞記念冊子、2012、小浜市教育委員会文化課</p>
③	<p><u>平尾彰子</u>、柴田重信、「体内時計を用いた理想的な食生活作りのために」、顕微鏡 第47巻 第2号 83-86、2012</p>
③	<p>Shibata S, <u>Hirao A.</u>, Basic and applied science of chrononutrition., 2011, Nihon Yakurigaku Zasshi. 137(3):110-4. Review.</p>
③	<p>柴田重信、<u>平尾彰子</u>「時間栄養学とはなにか」日本薬理学雑誌、金芳堂、137,109-114, 2011 Shibata S, <u>Hirao A.</u>, Tahara Y., Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm, 2010, Sleep and Biological Rhythms 8, 18-27. review</p>
③	<p><u>平尾彰子</u>、柴田重信、時計遺伝子と栄養、2010、脳2 1,金芳堂,VOL13-4 Shibata S, Tahara Y, <u>Hirao A.</u>, The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs., 2009, Adv Drug Deliv Rev. review</p>
③	<p><u>平尾彰子</u>、柴田重信、時間栄養学、特集;時間薬理学～最適な投与方法を求めて～、2009, 医薬ジャーナル、医薬ジャーナル社</p>
	<p><書籍></p>
③	<p><u>平尾彰子</u>、「かにかくに」、時間栄養学の視点から体内時計を考える(単著)、2012、御食国倶楽部</p>
③	<p><u>平尾彰子</u>、柴田重信、「体内時計の科学と産業応用」第3編食品:第10章食品の体内時計に対する効果(共著),第11章体内時計が栄養・食物摂取に及ぼす効果(単著),2011,シーエムシー出版</p>