

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

2013年2月

平尾 彰子

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

2013年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
電気・情報生命専攻 薬理学研究

平尾 彰子

目次

第一章 序論	6
(1)現代社会と体内時計	
(2)体内時計	
(3)末梢時計	
(4)概日時計の三要素	
(5)食餌と同調	
(6)時間薬理学	
(7)時間栄養学	
(8)研究目的	
第二章 末梢時計の食餌同調における食餌内容	14
I 食餌内容の検討	
【1】緒言	
【2】材料と方法	
(1)実験動物	
(2)Per2:LUC ノックインマウスを用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ発光リ ズム解析	
(3)制限給餌(RF)	
(4)餌の組成とタブレット調合方法	
(5)赤外線行動センサー	
(6)血糖値とGI値	
(7)Area Under the blood concentration time Curve (AUC)	
(8)血糖値測定	
(9)統計処理	
【3】実験スケジュール	
(1)実験 1. 制限給餌性リズム形成(PAA)の条件検討	
(2)実験 2. AIN-93M 食における、各栄養成分の完全置換効果	

- (3)実験 3. 100%グルコース置換+栄養成分添加食の効果
- (4)実験 4. AIN-93M 食における、コーンスターチとシュークロースの部分置換効果
- (5)実験 5. アミロース含量の異なるコーンスターチの効果
- (6)実験 6. 制限給餌性予期行動(FAA)の効果

【4】実験結果

- (1)実験 1. 制限給餌性リズム形成(PAA)の条件検討
- (2)実験 2. AIN-93M 食における、各栄養成分の完全置換効果
- (3)実験 3. 100%グルコース置換+栄養成分添加食の効果
- (4)実験 4. AIN-93M 食における、コーンスターチとシュークロースの部分置換効果
- (5)実験 5. アミロース含量の異なるコーンスターチの効果
- (6)実験 6. 制限給餌性予期行動(FAA)の効果

【5】小括

II 油脂置換食による末梢体内時計への同調効果

【1】緒言

【2】材料と方法

- (1)実験動物
- (2)Per2:LUC ノックインマウスを用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ発光リズム解析
- (3)MEF 細胞とインシュリン刺激実験
- (4)インシュリン濃度測定
- (5)RNA の分離とリアルタイム RT-PCR 測定法
- (6)魚油、薬物投与方法
- (7)統計処理
- (8)回腸下部及び大腸上部に含有する腸内内容物量の測定

【3】結果

- (1) 各種油置換 AIN-93M 餌の制限給餌(RF)が引き起こす肝臓時計の位相変動
- (2)魚油含有食が SCN および肝臓時計の位相変動に与える影響

- (3) AIN93-M に含まれる油脂置換によるインシュリン濃度の差異
- (4) ストレプトゾトシン(STZ)投与糖尿病モデルマウスを用いた魚油含有餌の位相変動への作用
- (5) 魚油を含んだ餌が Per2 と Dec1 の mRNA 発現量に与える影響
- (6) エキセナチド投与が肝臓時計の位相変動、血中インシュリン濃度、時計遺伝子発現量に及ぼす影響
- (7) 自由給餌下の魚油、DHA、EPA の経口投与の効果または位相変動、インシュリン濃度と時計遺伝子発現に関する作用
- (8) インシュリン非生産的な MEF 細胞を使用して魚油のインシュリン反応の感受性に対する効果の検証

【4】小括

第三章 食餌同調における食餌のタイミング 68

【1】緒言

【2】材料と方法

- (1) 実験動物
- (2) 行動解析
- (3) 固形試料の給餌と実験スケジュールとプロトコル
- (4) MBH 破壊マウス
- (5) 脳の染色と損傷位置の確認
- (6) Per2::luciferase ノックインマウスを用いた生物発光リズム測定
- (7) RNA の分離とリアルタイム RT-PCR
- (8) 急性の再給餌によって誘発される肝臓時計の位相変動作用
- (9) 統計解析

【3】結果

- (1) 無傷マウスと MBH 損傷マウスにおける RF 条件下での体重及び摂餌リズム
- (2) 無傷マウス群における、1 日 1 食の RF によって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調
- (3) 無傷マウス群における、1 日 2 食の RF によって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調
- (4) MBH 損傷マウスにおける、1 日 2 食の RF によって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調
- (5) MBH 損傷マウスにおける、RF によって誘導された肝臓の生物発光リズムの同調に及ぼす絶食間隔の効果
- (6) MBH 損傷マウスにおける、RF によって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調に対する食餌の量と絶食間隔の複合効果
- (7) MBH 損傷マウスの肝臓における、食餌によって誘発された Per2、Dec1 及び Bmal1mRNA の発現増大に対する 8 時間又は 16 時間の絶食間隔効果

【4】小括

第四章 総括.....	97
参考文献	99
謝辞.....	105
研究業績.....	106

第一章 序論

(1)現代社会と体内時計

日照時間を無視するがごとく、現代社会は 24 時間フル稼働している。幼いころから塾通いをする受験生、オールナイトで営業するコンビニエンスストアやカラオケに集まる若者もいれば、国際化に伴って昼夜の区別なくパソコンや通信機器と向かい合っているビジネスマンも、交替制で夜間勤務を余儀なくされている医師や看護師も少なくない。また、同時に飽食の時代と謳われるほどに、我々の身近にはたくさんの食べ物や飲み物が溢れているため、決まった時間に食事をとるという習慣が作られにくい状態にあるともいえる。そのため、近年、肥満やメタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群) が大きな社会問題になっている。

1 日くらい夜更かしや徹夜、やけ食いをしてもさほど大きな問題にはならないように思いがちであるが、あまりにも生活のリズムが乱れると、現実と身体が認識する時間との間に差が生じるようになり、我々の体内にある時計遺伝子の働きに悪影響を与え、結果、生活習慣病などの動脈硬化、心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な病気になりやすくなるという報告もされている。

(2)体内時計

地球に存在する我々の生活は、24 時間という周期で1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 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、人間の生理機能(睡眠-覚醒、体温、摂餌-排泄、ホルモンの分泌など)の多くにこのリズムが存在する (King *et.al*, 2000)。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、様々な生理現象が時計遺伝子の発現にコントロールされて昼夜変動を繰り返している。

哺乳類が有する体内時計は、左右の眼の網膜から伸びた視神経が、脳内の視床下部で交叉している視神経交叉部位(視交叉)上に存在する直径わずか 1 ミリほどの小さな神経核である視交叉上核(suprachiasmatic nucleus ; SCN)が制御の中心となっている(Abe *et.al*, 2002)。

SCN が作り出しているサーカディアンリズム、体内時計は時計遺伝子という遺伝子群により形成されている。代表的な時計遺伝子として Clock、Bmal1、Per(Period)、Cry などが挙げられる。これらの時計遺伝子は、自身の発現自体にリズムを持ち、転写制御タンパク質として、時計遺伝子や他の遺伝子の転写の促進-抑制のフィードバック機構をほぼ全身の細胞において実現させており(Fig.1)、それらは中枢から切り離されても自立した mRNA 発現レベルのリズムを維持

し続けられることが知られている。また、転写制御因子としての時計遺伝子は、他の様々な遺伝子発現をも制御する。この時計制御遺伝子により体内時計機構の出力としてサーカディアンリズムを示すものは多く、最終的に神経活動、ホルモン分泌といったマクロな生理現象のサーカディアンリズムを形成している。

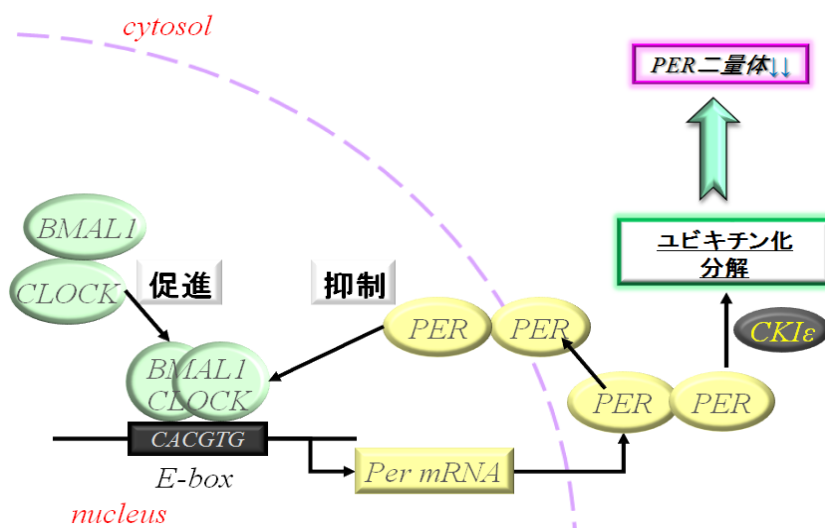


Fig.1時計遺伝子のフィードバック機構概念図

(3)末梢時計

このような時計遺伝子群の働きにより、体内時計は肝臓や筋肉、肺、心臓といった末梢臓器や、脳の中の SCN 以外の場所にも存在している。

末梢臓器に存在している時計、すなわち末梢時計は、各末梢組織の働きを規定・調整するという意味でも重要な意味を持っている(Yamazaki *et.al*, 2000; Damiola *et.al*, 2000)。これらの末梢時計に対し、中枢時計 SCN は様々な組織を介して神経・ホルモンなどによるシグナルを出し、リズムを制御しているとされている。

つまり、末梢時計は自身だけではリズムを維持できないため、普段は主時計である SCN により様々な過程を経てコントロールされて、独自のリズムを保ち、加えて、状況に応じて各末梢時計が独自に働く柔軟性も備えることで、バランスを保っている。この柔軟性により、様々な環境の変化に応じた体内の反応が、絶妙なバランスで形成されている。

しかし、主時計である SCN から末梢時計への制御経路は多様で非常に複雑であり、その作用機序はまだ明らかになっていないことが多い(Fig.2)。この制御経路を解明することが、時間生物学分野における大きな課題でもありと考えられる。

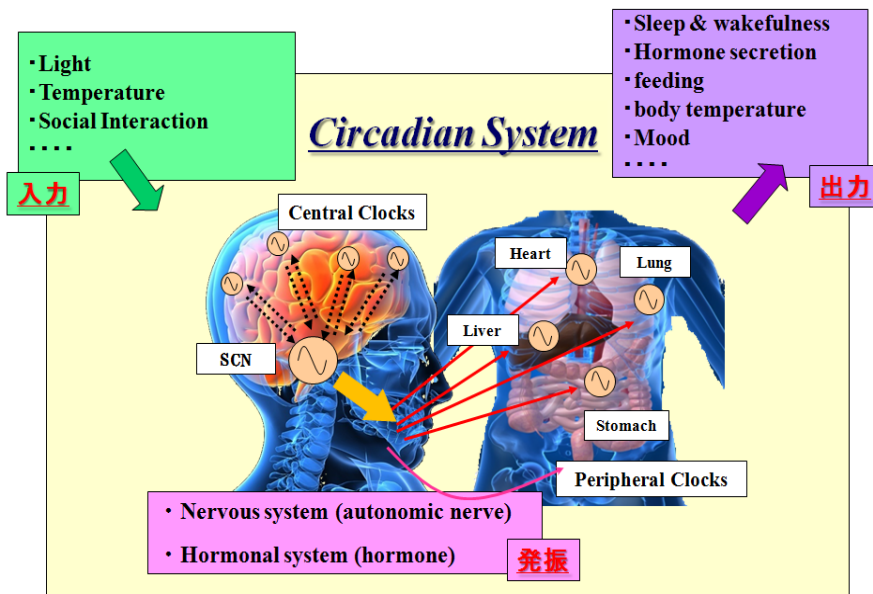


Fig.2 SCN から末梢時計への制御経路

(4)概日時計の三要素

概日時計には、周期、位相、振幅の三要素があり、以下のように定義される(Fig.3)。

1)周期

リズムにおける peak から peak または bottom から bottom までの長さのことで、概日時計ではほぼ24時間である。しかし、時計遺伝子が壊れると長短が変化し、一般的に老化すると短くなる。

2)位相

2つ以上のリズムを重ねた時のずれの長さのこと。グリニッジを標準時として、運用時刻の差異を決めるように、概日時計も SCN を標準時として運用時刻の差異を決める。

3)振幅

リズムにおける peak から bottom までの長さ、すなわち振動の大きさであり、体温の日内リズム変動の大きさ、肝臓にある酵素の変動量を決める。体温の変動は小さいが、血中メラトニン量・肝臓酵素は、数倍に変化するものもある。老化により、振幅が小さくなる。

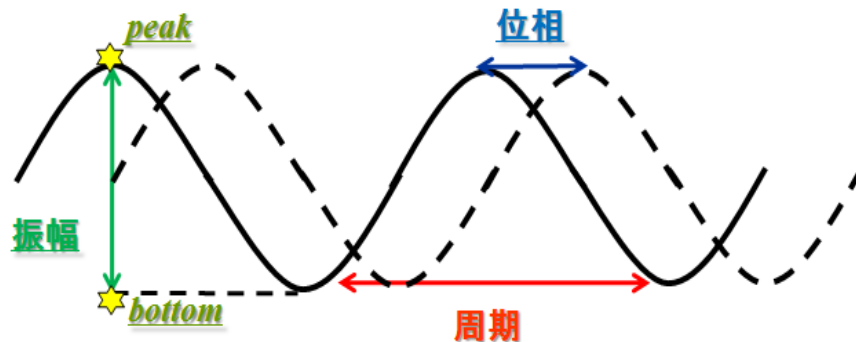


Fig.3

(5) 食餌と同調

概日時計は 24 時間前後のばらついた周期のリズムであるため、地球の自転周期の 24 時間に合わせないと位相がずれていく。サーカディアンリズム周期を 24 時間周期に合わせる機構を「同調」と呼ぶが、外界の明暗周期が網膜を通して視交叉上核に伝わり、同調刺激となる。一方で、マウスやラットに毎日一定時刻に餌を与えると、視交叉上核以外の肝臓や肺など末梢臓器の時計遺伝子発現リズムは同調刺激となる(Hara, *Genes Cell*, 2001)。

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。同じメカニズムで、他の同調因子として食餌による視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA axis)から分泌されるグルココルチコイドが知られており、また食餌時間も概日時計をリセットできる。

ヒトにおいて、毎日決まった時間に食事を摂る場合、その時間が近づくと空腹感を感じるようになる。これは脳の中で食事のリズムが刻まれていることによる。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、脳時計において食餌性のリズム発振機構(Food Entrainable Circadian Oscillator ; FEO)が出現し、新たな主時計としての機能を持つようになる。その表現系として脳時計においては、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昼に活動するようになり(Food Anticipately Activity ; FAA) (Mistlberger, 1994; Stephan , 2002; Krieger, 1972; Stephan *et.al*, 1972; Boulos *et.al*, 1980)末梢臓器においてはその時計が同調作用(Food Entrainable Peripheral Clock)を示す(Fig.4)。

これらのリズムも 24 時間周期を描いており、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。つまり、この同調因子は非光体内時計同調因子として光をマスキングして働いていると考えられ、SCN の時計遺伝子発現には影響を与えない。

視床下部内側核(Medio Basal Hypothalamus ; MBH)(Fig.5) を破壊すると脳時計の表現系である FAA は消失するものの、末梢の時計同調作用は消失しなかったという先行研究から、FEO を主時計とした食餌性リズム形成の表現系は互いに独立していることがわかった(Tahara *et.al*, 2010)。

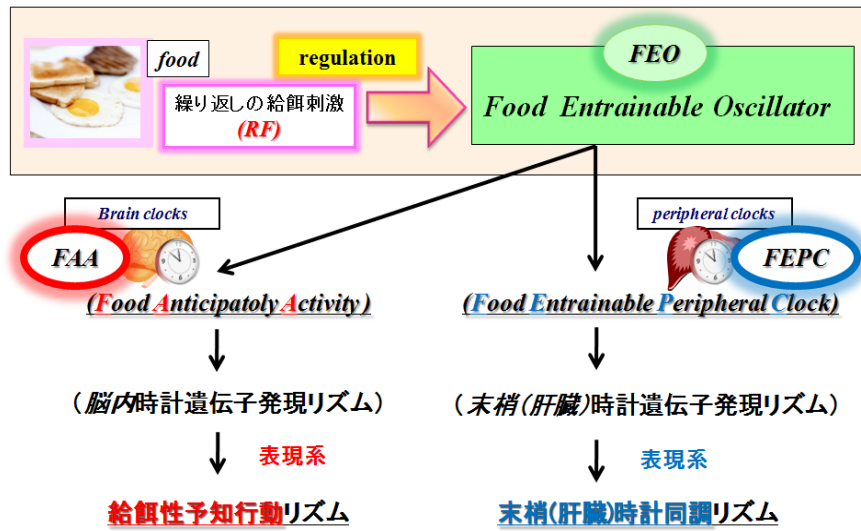


Fig.4 食餌性リズムの発振機構概念図

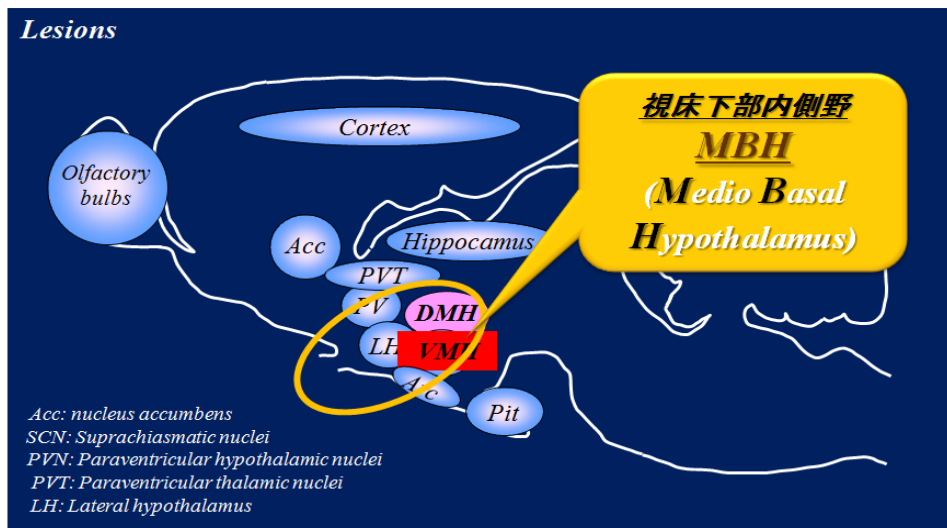


Fig.5 視床下部内側核

(6)時間薬理学

時間生物学分野と前述したがその幅は広く、薬学の分野においてもその概念の存在は大きいものになっている。生体リズムと薬物動態を考慮し、投薬の時刻やタイミングを変えることによって、薬の有効性を高めたり、副作用を軽減したりすることが可能になる。なお、ライフスタイルや疾患、治療によって生体リズムは変動するため、個々のリズムに合った時刻に投与することが大切である。このような投薬時刻の違いによる薬物動態や薬効の差、その機序を明らかにする学問を時間薬理学(chronopharmacology)といい、現在、医療現場などでその治療法が注目されている。

(7)時間栄養学

哺乳類では1997年に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、体内時計が食事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ことが多いので、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。朝食は生活リズムを整える可能性があり、食事摂取の方法が体調を整える手段として用いられると思われる。そこで、時間薬理学に対応する学問として、広義の「時間栄養学」が提唱され、(1)食物や栄養物の作用が摂取する時刻によって影響される点(狭義の時間栄養学)と、(2)食物・栄養物が体内時計に影響する点(体内時計作用栄養学)の二つの視点をもとに(Fig.6)研究が展開されている。

(8)研究目的

先に述べた二つの視点のうち、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にかかわっているかは、不明のままである。また、食餌と体内時計は複雑かつ密接に関わり合っているといえる。しかし、どのような機構を持つか詳しいことは分かっていない。そこで、食餌による末梢時計の同調機構を解明することを目的として、食餌内容を変化させ、どの栄養成分が時計の位相前進に関与しているのかという観点のもと、本研究を行った。また、生活習慣病の原因となる食生活の乱れを改善する方法や、食事療法の発展といった領域で、新しい知見をヒトの生活に応用させることが本研究の最終目標である。

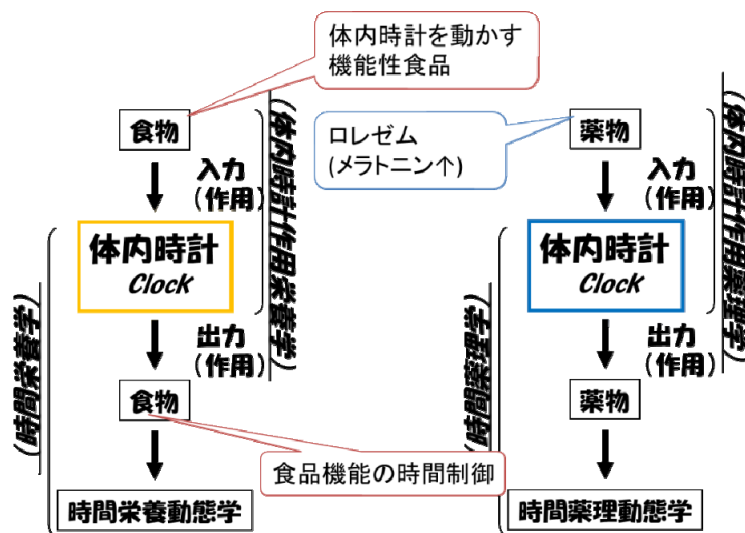


Fig.6 時間薬理学と時間栄養学

第二章 末梢時計の食餌同調における食餌内容

I 食餌内容の検討

【1】緒言

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(Young *et.al*, 2002)。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(Hirota *et.al*, 2002)。

前述したように、RF 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(Kobayashi *et.al*, 2004)。植物油を RF した場合、末梢時計の位相前進をもたらさなかったため、高エネルギーが原因ではなく、グルコースによって引き起こされたといえる(Stephan *et.al*, 1998)。したがって、本研究においては、グルコースが直接的に起因している炭水化物の効果を調べることにした。

一般的に、ヒトはグルコースだけを摂取することはほとんどない(Stephan *et.al*, 1998)。炭水化物、タンパク質、および油を含むバランスのとれた適切な食事を摂取する(Frost *et.al*, 2000; Englyst *et.al*, 1987)。将来的に臨床応用を可能にするため、AIN-93M 食餌の成分をコントロールとし、餌成分の部分または完全置換してその効果を調べる。

本研究ではグルコースに着目するとともに、特にコーンスターチ、糖に焦点を合わせ、アミロース含量の違い(Yoshikawa *et.al*, 2005)によってコーンスターチの効果を比較することにした。

【2】 材料と方法

(1) 実験動物

今回の実験は全て J.S.Takahashi 教授から提供していただいた Per2::luciferase knock-in (Per2-luc K.I.)マウスを用いた(Yoo *et.al*, 2004)。

このマウスは、Per2 遺伝子下流にホタルルシフェラーゼの DNA を導入したことにより、Per2 遺伝子の発現リズムをルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光リズムで追うことが可能である(Yamazaki *et.al*, 2000)(Fig.7)。実験には、ICR マウスとの交配から作製した F3 の homo マウス、週齢は 8-12 週齢、性別は♂・♀を使用した。

マウスの飼育環境は気温 22±2℃、湿度 60±5%に保たれ、明暗条件は明期を 8:00-20:00 の 12 時間、光を当てない暗期を 20:00 - 8:00 の 12 時間で一定に保った。

なお、明期の始まり(8:00)を動物の主観的時間の開始と考え ZT(Zeitgeber time) 0 と表す。この場合 20:00 は ZT12 となる。また、ルミサイクルの結果に用いた“projected ZT (pZT)”はこの ZT に相当する。ルミサイクルについては【1】(2)にて説明する。

自由摂餌(Free Feeding ; FF)時の餌は市販の動物用飼料(オリエンタル酵母)を自由に摂取できる状態にした。また、水も同様に自由に摂取できる状態にした。

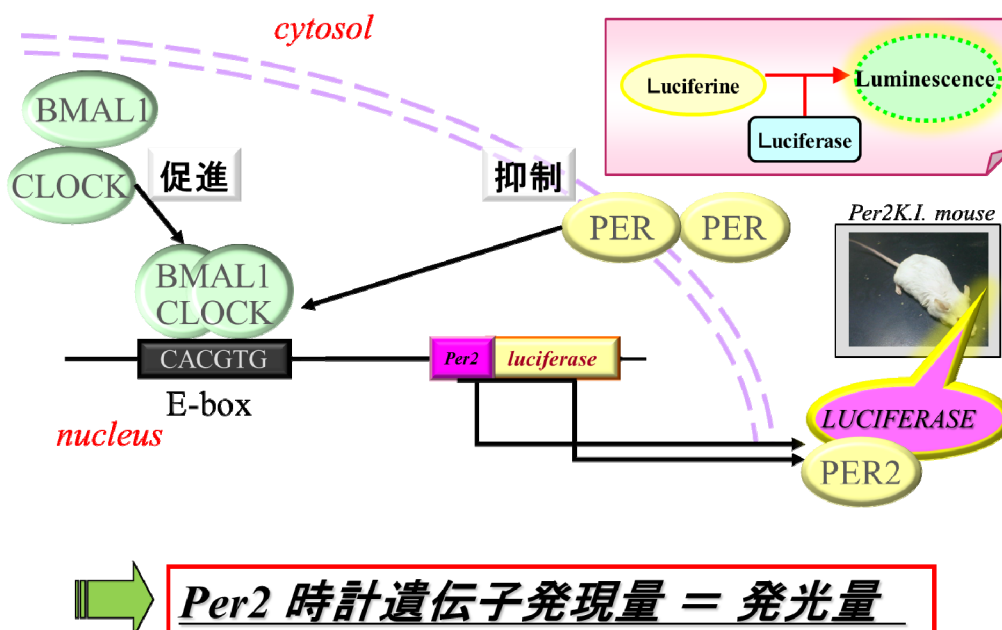


Fig.7 Per2::luciferase knock-in (Per2-luc K.I.)マウス

(2) Per2:LUC ノックインマウスを用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ発光リズム解析

Per2-luc K.I.マウスは前述したように、Per2 遺伝子にルシフェラーゼが含まれるため、ルシフェリンを加えることにより、Per2 遺伝子の発現リズムを発光リズムとして観測することが可能となる。つまり、ホタル由来の発光酵素であるルシフェラーゼ (luciferase) が発光基質であるルシフェリン (luciferin) を酸化することによって自ら発光する。このシステムを遺伝子のリズム解析に応用したのが、本研究で使用した実験系であるルミサイクル (ActiMetrics 社) である (Meerlo *et.al*, 1997)。実際の発光は人の目で観測できるレベルではないため、微弱な光も感知することが可能な、非常に高感度な光電子増倍管 (Photo multiplier tubes ; PMT) を用いた。ルミサイクルはこの PMT を 4 つ備えたシステムであり、培養組織が生存している限り、リアルタイムなリズムの測定が可能である (Fig.8)。本研究では、ZT3 にサンプリングされた末梢組織 (肝臓) をルミサイクルの設置された 37°C のインキュベーター内で培養し、Per2 遺伝子の発現リズム (発光リズム) を解析した。

解析には、計測データ (RAW データ) から 24 時間分の移動平均値を引くディトレンド処理を行い、その後 2 時間分の移動平均値で平滑化するスムージング処理を行う (Hayasaka *et.al*, 2007; Ohta *et.al*, 2008)。この処理に用いた R のプログラミングソフトは矢板強志氏、古谷直樹氏、柴田重信教授によって考案されたものである (早稲田大学, 柴田研究室)。この波形データの発光値の peak 値を算出し、データを比較する。また、peak1 の値が前進したか後退したかを評価の基準とした (位相の前進・後退) (Fig.9)。ここで、培養に用いた試薬の組成を以下に示す。

・ 培地

滅菌したミリ Q 水に 100ml に対し、Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) 1.34g、HEPES (WAKO) 238mg、カナマイシン硫酸塩 (WAKO) 2mg、炭酸水素ナトリウム (WAKO) 23mg を入れ、PH が 7.2 になるように調整後、濾過滅菌した。

・ 20×サプリメント

滅菌したミリ Q 水 50ml に対し、アポトランスフェリン (SIGMA) 100mg、インスリン (SIGMA) 5mg、ストレプトシン二塩酸塩 (ALEXIS) 16.1mg、400mM プロゲステロン (SIGMA) 50 μ l、6mM 亜セレン酸ナトリウム (SIGMA) 5 μ l の用量で作成した。

・ 緩衝液

滅菌したミリ Q 水 1000ml に対し、Hanks Balanced Salts (SIGMA) 9.7g、炭酸水素ナトリウム 350mg を入れ、PH が 7.2 になるように調整後、濾過滅菌した。

35mm 組織培養用 dish に、培地 1ml (20×サブメント 0.5 μ l、10mM D-luciferin sodium salt (in vitro) 0.01 μ l を含む) を入れ、組織培養を行った。また、緩衝液はサンプリング組織を一時的に保存しておく目的で使用した。

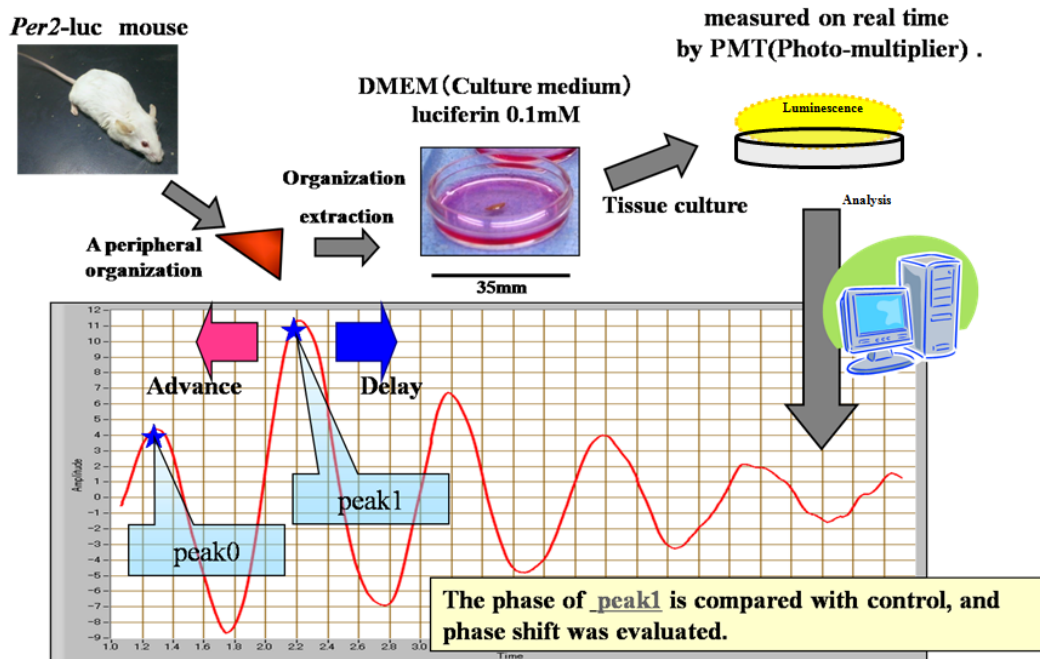


Fig.8 ルミサイクルの手順

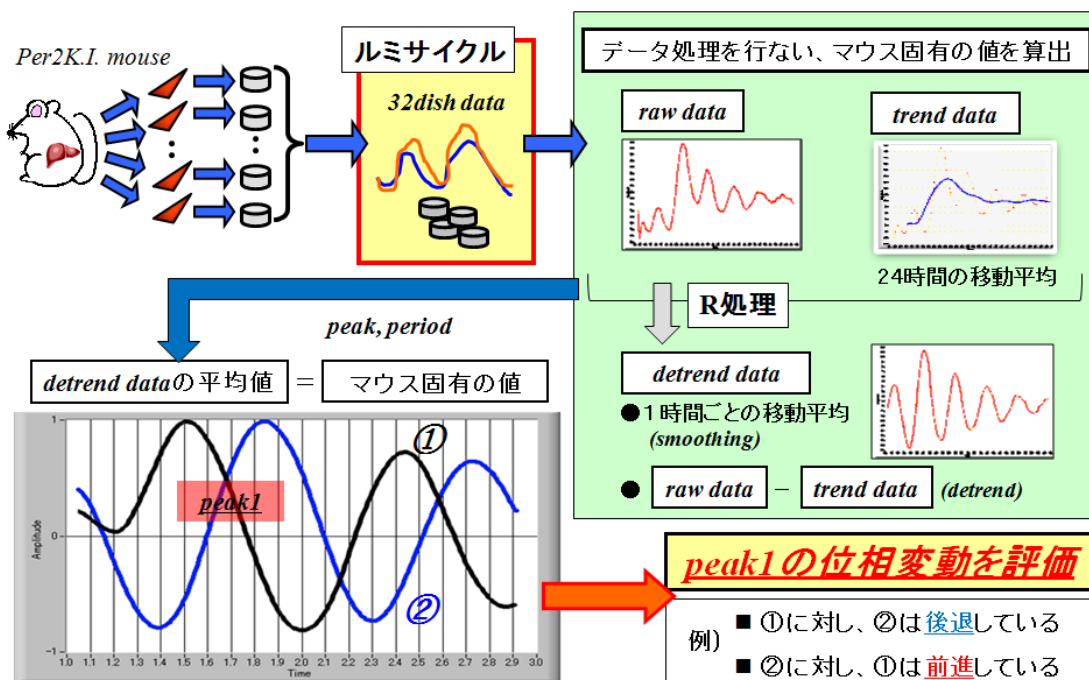


Fig.9 ルミサイクル解析

(3)制限給餌(RF)

一般的に、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。先述した通り、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おり(King *et.al*, 2000)、主観的昼(ZT0-12)の時間帯におけるRFでは位相の前進が起こる。

本研究では、位相前進効果が見やすく、同調しやすい、摂餌行動を目で追やすいなどの理由から、ZT6からのRFで実験を行っている。

これは、24時間の絶食後(前日のZT6に餌を抜く)、次の日からZT6に餌を提示するというスケジュールである(Fig.10)。マウスをコントロール食(AIN-93M)に順応させるために、実験の4日前に標準食(MEQ)からコントロール食に切り替えた。コントロール食からの24時間絶食の後、ZT6にタブレットを各マウスに給餌した。

また、このスケジュールにおいて、餌の提示時間は示されてから4時間とし、RF後に、食糧消費量をチェックした。4時間以内にほとんどのマウスは完食したが、嗜好性によって完食しなかったマウスもいる。

ZT10までに食べきれなかった餌は取り除き、摂餌量が1日目0.6g/10g BW以上、2日目以降0.84g/10g BW以上のものをデータとして取り入れ(1日摂餌量の2SEM; 【3】(1)参照)、それ以外のものは実験に使用しなかった。

実験に用いた餌の組成とその調整方法については、【2】(4)で示す。

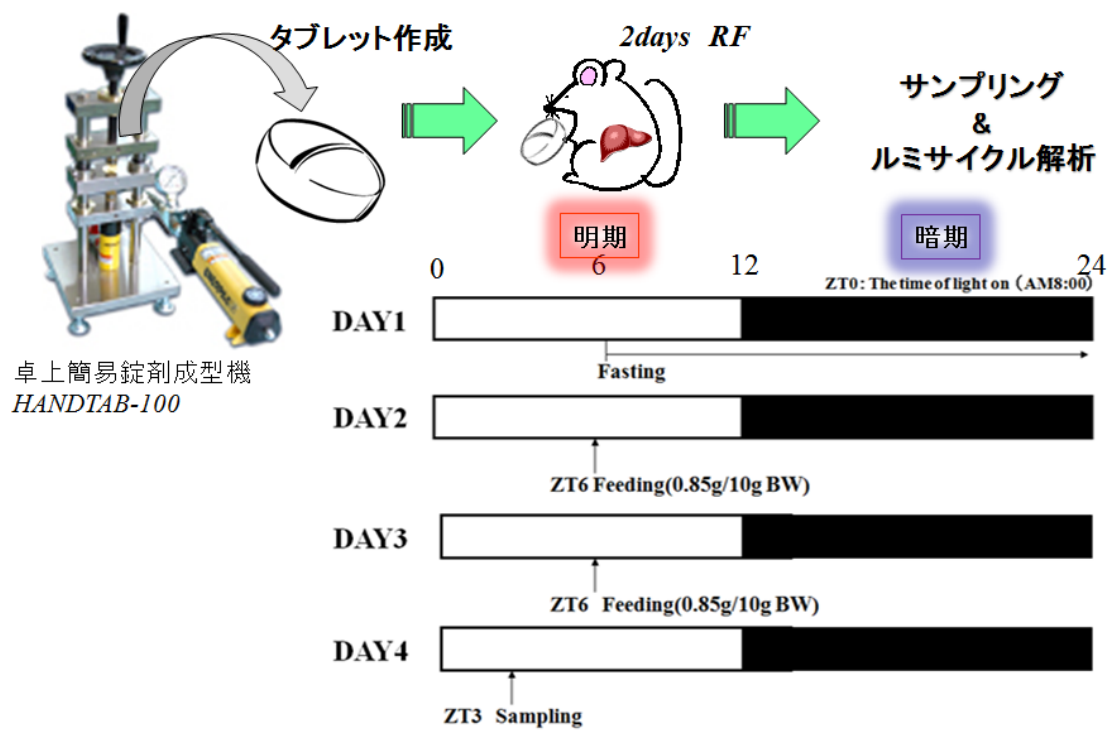


Fig.10 基本プロトコル

RF の24時間前に絶食をかけ、ZT6に2日間餌を与える。その翌日 ZT3 にサンプルングを行ったのちにルシフェラーゼ発光リズムを測定した

(4) 餌の組成とタブレット調合方法

標準食は FF 時に用いられている餌(オリエンタル酵母工業、マウス・ラット・ハムスター用飼料;MEQ)を用いた。

制限給餌実験のために、卓上簡易錠剤成型機 HANDTAB-100(市橋精機株式会社、京都)(Fig.11)を使用してタブレットを調合し、マウスに与えた。コントロール食に用いたのは、AIN-93M 調整食(オリエンタル酵母工業株式会社、東京; 構成: カゼイン 14%、L-シスチン 0.3%、 α コーンスターチ 15%、 β コーンスターチ 47%、シユークロース 10%、大豆油 4%、セルロース 5%、AIN-93 ミネラル混合 3.5%、AIN-93 ビタミン混合 1%、酒石酸水素コリン 0.25%、tert-ブチル基ヒドロキノ 0.0008%)(Table.1)であり、米国国立栄養研究所(American Institute of Nutrition, AIN)から発表された組成が世界各国で広く使われているものである。組成についての詳細は 1993 年に Journal of Nutrition に公表してある。

また、置換に使用したコーンスターチは日本食品化学工業(東京)から給与されたもので、あらかじめゼラチン化されたコーンスターチ(GCS; Nisshoku Alstar E)とハイアミロースコーンスターチ(HACS; Nisshoku High-amirose Corn starch)を用いた。

それぞれのアミロース含量は、26g/100g と、68g/100g、でんぷん量は 5.6 g/100g と 50.7g/100g、食物繊維量は 0.1 g/100g と、19.3 g/100g である(Liu *et.al*, 2009)。

調製した飼料は冷蔵庫に密閉して保存する。尚、マウスは通常の餌と同様に摂餌行動を起こし、餌を食べる。この餌による特別な変化が起こらないことは確認済みである。



HANDTAB-100

最大打錠圧	30kN(3.0t)※1
金型形式	専用金型
最大錠剤径	φ15mm※1
設置寸法	600(W)×800(D)×550(H)
その他主要装備	アナログ圧力計

Fig.11 卓上簡易錠剤成型機 HANDTAB-100(市橋精機株式会社 HP より抜粋)

AIN93-M	%	AIN-93Gミネラル混合	mg/100g
カゼイン	14.0	CaCO ₃	35700.0
L-シスチン	0.2	KH ₂ PO ₄	25000.0
βコーンスターチ	46.6	K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ •H ₂ O	2800.0
αコーンスターチ	15.5	NaCl	7400.0
シュクロース	10.0	K ₂ SO ₄	4660.0
大豆油	4.0	MgO	2400.0
セルロースパウダー	5.0	FeC ₆ H ₅ O ₇ •XH ₂ O	606.0
AIN-93Mミネラル混合	3.5	ZnCO ₃	165.0
AIN-93Mビタミン混合	1.0	MnCO ₃	63.0
重酒石酸コリン	0.3	CuCO ₃ •Cu(OH) ₂ •H ₂ O	32.4
第三ブチルヒドロキノン	0.0	KIO ₃	1.0
合計	100.0	Na ₂ SeO ₄	1.025
		(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	0.795
		AIN-93Gビタミン混合	mg/100g
		ニコチン酸	300.0
		パントテン酸カルシウム	160.0
		塩酸ピリドキシン	70.0
		塩酸チアミン	60.0
		リボフラビン	60.0
		葉酸	20.0
		D-ビオチン	2.0
		ビタミンB12(シアノコバラミン)[0.1%]	250.0
		ビタミンE(全-rac-α-トコフェロール酢酸)	1500.0
		[50%]	
		ビタミンA(全-trans-パルチンシ酸レチノール)	80.0
		[500,000U/g]	
		ビタミンD3(コルカルシフェロール)[400,000U/g]	25.0
		ビタミンK1(フィロキノン)	7.5
		シュクロース	97465.5
合計	100.0	合計	100.0
		NiCO ₃ •2Ni(OH) ₂ •4H ₂ O	3.06
		NH ₄ VO ₃	0.66
		LiCl	1.74
		H ₃ BO ₃	8.15
		NaF	6.35
		シュクロース	20978.32

Table.1 粉末飼料組成表(日本農産工業株式会社 HP より)

マウス・ラット用の栄養研究のための標準精製飼料組成。動物の週齢:10~12週齢頃を目安に、それ以後を93Mとする使用法が勧められている。カゼインはミルクカゼインを脱脂処理したものの商品名で、すべてのビタミンが取り除かれていることを意味しない。CuCO₃•Cu(OH)₂•H₂O 原報は無水物 30.0mg/100g、NiCO₃•2Ni(OH)₂•4H₂O 原報は5水和物 3.18mg/100g を使用している。

(5) 赤外線行動センサー

マウスの FF 時の行動と、RF 条件化における行動との違い(摂餌行動)を比較するために、マウスを個別のケージで飼育し、赤外線センサーを用いてその行動を計測した。尚、飼育条件は前述したものと同様である。

給餌前の予知行動である FAA は、ZT3-6 の時間帯の行動とし、1 日の総行動における FAA の割合を比較、解析した。

(6) 血糖値と GI 値

血糖値とは、血液中のグルコース(ブドウ糖)の濃度をあらわすもので、単位は mg/dL。空腹時や運動時には低下、食後には上昇する。また、GI 値とは、食品が体内で糖に変わり、血液に吸収されて、血糖値を上げるまでの速度を数値化したもので、GI 値が低い食事は血液中のグルコースの濃度は急に上がらず、体の中でうまくグルコースが消費されるため、高血糖が起こりにくくインスリン濃度も低いと言える。

対ヒト実験では、GI 値(%)は、以下の公式で計算される: $100 \times (\text{食物摂取量の 2 時間後の血糖} / \text{同量のグルコース摂取 2 時間後の総血糖})$ 。

したがって、本研究では、経口投与後、血糖値を測定し、AUCを計算した(Frost *et.al*, 2000)上で、各実験群の GI 値(%)を $100 \times (\text{各時間における血糖値} / \text{AUC 値})$ の公式のもとに計算した。

(7) Area Under the blood concentration time Curve (AUC)

AUC(area under the blood concentration time curve)とは薬物血中濃度-時間曲線下面積のことであり、血中濃度曲線下面積とも言う。薬物血中濃度の時間経過を表したグラフで描かれる曲線(薬物血中濃度-時間曲線)と、横軸(時間軸)によって囲まれた部分の面積を示し、体循環血液に入った薬物量は直接測定することができないため、薬物血中濃度-時間曲線下面積(AUC)で代替するのが一般的である。

AUC は体循環血液に入った薬物量に比例するため、体内に取り込まれた薬の量を示す指標として用いられる。ここでは、グルコースの血中濃度曲線下面積を求めるために使用した。

(8) 血糖値測定

血中グルコース濃度(以下、血糖値)はエーテル麻酔ののち、マウスの尾静脈から $1\mu\text{l}$ の血液を採り、Glucose PILOT キット(Aventir Biotech, LLC、カールスバッド(カリフォルニア)、アメリカ)を使用して、一定時間間隔で測定した(Fig.12)。このキットで測定できる血糖値の範囲は $20\sim 600\text{mg/dL}$ である。それぞれのタブレットは液体の大豆油を除いて、 0.1g/mL の濃度で水に溶解し、各マウス $0.33\text{ mL}/10\text{ g BW}$ の用量を経口投与した。このような処置は摂餌の開始、終了時刻を血糖値の時間的経過測定のために、一定にする必要があったためである。

投与量はタブレットの約 $1/10$ 個に相当する【2】(4参照)。

したがって、本研究において、経口投与の15、30、60、90、および120分後に血糖値を測定し、血糖曲線を作成、加えて、AUC、GI値(%)を算出した。

(9) 統計処理

統計解析は統計処理ソフトSPSS(ver.11.5、SPSS Japan Inc、東京)を用いて行った。

ルミサイクルによるpeakの位相変動、FAA、血糖値変化に用いた統計的検定は、全て一元配置分散分析(Repeated measures designed one-way ANOVA、fisher PLSD test)である。

各統計的検定において、有意な差が見られた場合 $P<0.05$ を*、 $P<0.01$ を**と示した。

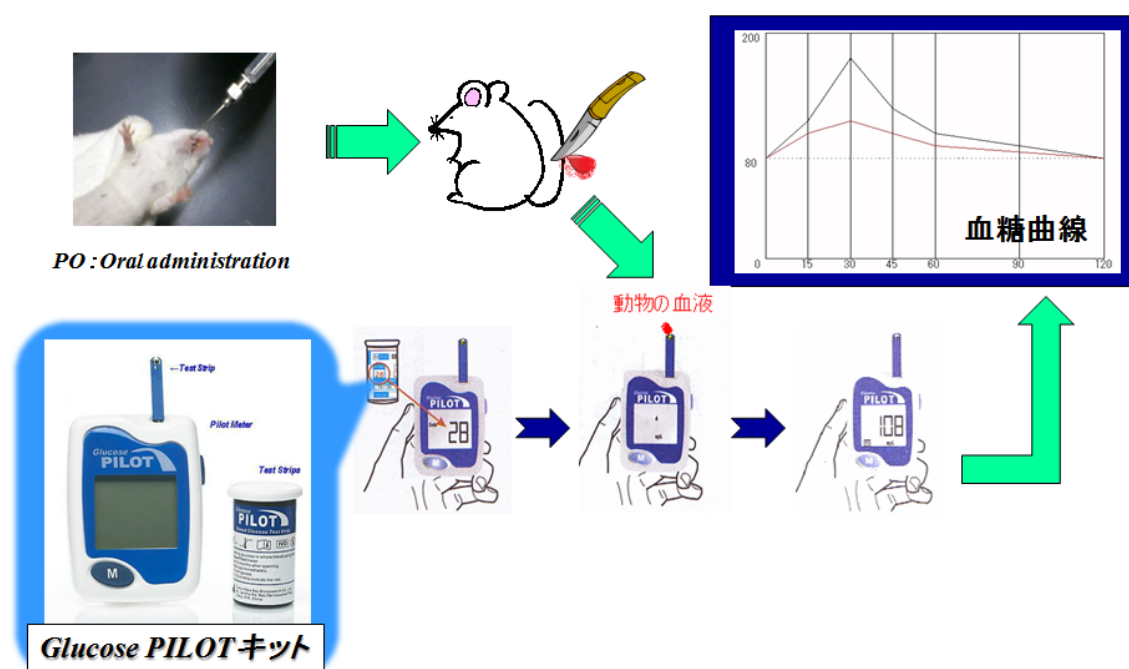


Fig.12 血糖値測定キット

【3】実験スケジュール

(1) 実験 1. 制限給餌性リズム形成(PAA)の条件検討

制限給餌による位相変動、同調効果はどのような条件で形成されるのか。この条件を統一することで、実験 2 以降の条件を決定した。

検討項目は、以下の5項目である。

① 一回の給餌で与える餌の量

先行研究において、4時間のRFがマウスの肝臓時計遺伝子発現の位相前進に必要であると報告されている(Damiola *et.al*, 2000; Stokkan *et.al*, 2001; Hara *et.al*, 2001)。

そこで、Per2-luc K.I.マウス (body weight[BW], 23.8±0.8 g (range, 20-30 g); age, 10-18 weeks; N = 26) を用い、24時間絶食後、4時間の摂餌量を測定し、位相前進に一番適した用量の餌量を定めた。

② RFを行う日数

0.85g/10 g BWの餌を4時間(ZT6-ZT10)のRFし、その期間を1日、2日、4日、14日間設け、今回のプロトコルに適したRF日数を検討した。

③ 比較対照群(コントロール群)の設定

今回、餌の内容成分を変化させることによって、その位相変動がいかなるものであるかを検討していくため、AIN-93Mをポジティブコントロールと定める必要がある。そこで、AIN-93Mがポジティブコントロールとして適しているかを確認した。

④ サンプルング時間の設定

サンプルングの刺激、またはその条件によって、位相に変化が生じるかもしれないことを考慮し(Yoshikawa *et.al*, 2005)、異なるサンプルング時間における位相変動を検討した。

⑤ マスキング効果の検討

RFによって位相が前進する作用がマスキング(一時的な位相前進作用)ではないことを明らかにするために、RFした群とRFの後1日絶食した群との位相を比較検討した。

(2) 実験 2. AIN-93M食における、各栄養成分の完全置換効果

実験 1を踏まえ、AIN-93M食における、各栄養成分の完全置換効果を検討した。置換した成分はコーンスターチ(炭水化物)、カゼイン(タンパク質)、大豆油(脂質)、シユークロース(糖質)、グルコースである。それぞれの栄養物のパーセント構成と置換部分(白抜き部分)を Fig.13 に示す。このタブレットを餌として用い、初日に0.6g/10g BW、24時間絶食後の2日目に0.85g/10g BWの用量をRFした。

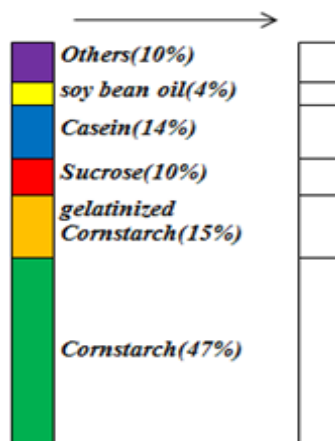


Fig.13 完全置換タブレット組成

左の色付きバーは AIN93-M の組成を示している。この組成中の栄養成分をそれぞれ100%置換することによって位相の変動作用を確認した。

(3)実験 3. 100%グルコース置換+栄養成分添加食の効果

実験 2 において注目したのは、100%グルコースも 100%のシュクロースも位相前進を引き起こさなかったことである。そこで、AIN-93M に含まれた他の栄養成分を混合することによって、初めて肝臓時計の位相前進への糖の機能が働く仮説をたて、グルコースに他の成分を添加してその作用を確認した。添加した成分は カゼイン(タンパク質)、大豆油(脂質)、ビタミン、ミネラル、セルロースである。それぞれの栄養物のパーセント構成と置換部分(白抜きグラフの色つき部分)を Fig.14 に示す。

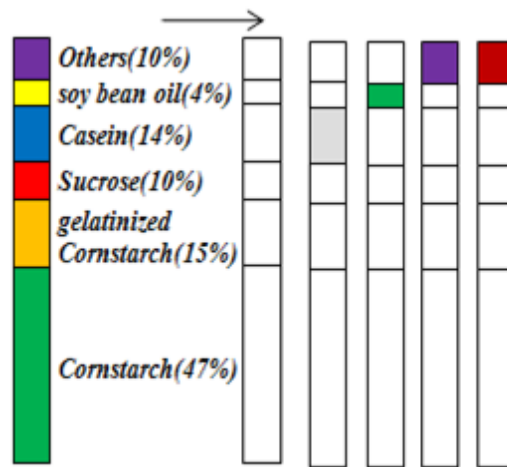


Fig.14 グルコース+栄養成分添加タブレット組成

グルコースに添加した成分として カゼイン(タンパク質)、大豆油(脂質)、ビタミン、ミネラル、セルロースを挙げる。それぞれの栄養物のパーセント構成と置換部分は白抜きグラフの色つき部分で表示した。

(4)実験 4.AIN-93M 食における、コーンスターチとシュークロースの部分置換効果

実験3において、カゼインとグルコースの組み合わせは、位相前進効果を示したため、本実験では糖の効果を見るためにコントロール食(AIN-93M)の α 、 β コーンスターチ、シュークロース部分を各種の糖(グルコース、シュークロース、フルクトース、およびポリデキストロース)に部分置換した。ポリデキストロースは難消化性の糖である。それぞれの栄養物のパーセント構成と置換部分(白抜き部分)を Fig.15 に示す。

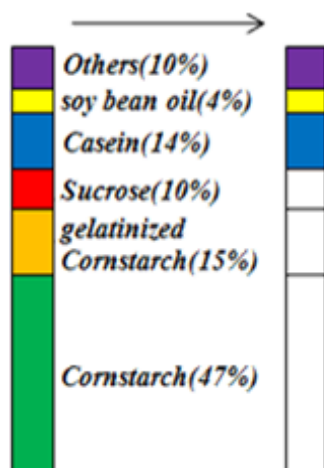


Fig.15 コーンスターチとシュークロースの部分置換タブレット組成

糖の効果を見るためにコントロール食(AIN-93M)の α 、 β コーンスターチ、シュークロース部分を各種の糖(グルコース、シュークロース、フルクトース、およびポリデキストロース)に部分置換した。置換した部分は白抜き部分で示している。

(5)実験 5. アミロース含量の異なるコーンスターチの効果

実験 4 において糖の違いによる位相前進作用の変化が確認された。その原因を確かめるために、本実験においてアミロース含量の異なる二種類のコーンスターチ: HACs(high amylose cornstarch)、GCS(gelatinized cornstarch;low-amylose cornstarch)を用いてコントロール食のコーンスターチ部分を置換し、アミロース含量の違いによる位相変動を検討した。それぞれの栄養物のパーセント構成と置換部分(白抜き部分)を Fig.16 に示す。

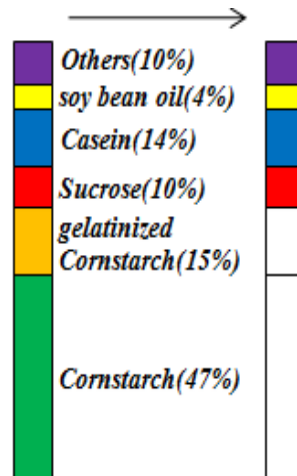


Fig.16 アミロース含量の異なるコーンスターチの部分置換タブレット組成

アミロース含量の異なる二種類のコーンスターチ: HACs(high amylose cornstarch)、GCS(gelatinized cornstarch;low-amylose cornstarch)を用いてコントロール食のコーンスターチ部分の置換をした。置換部分は白抜きで示している。

(6)実験 6. 制限給餌性予期行動(FAA)の効果

100%グルコースがマウスで FAA を引き起こすことが報告されているが(Damiola *et.al*, 2000; Stokkan *et.al*, 2001; Hara *et.al*, 2001; Wakamatsu *et.al* 2001)、本研究では、100%グルコースが肝臓時計の位相前進に影響しなかった(Davidson *et.al*, 2003; Feillet *et.al*, 2006)。よって、100%グルコース、100%グルコースにカゼインを添加した餌がマウスにおいて FAA を引き起こすか否かを検討した。FAA 解析に使用したプロトコルは、ルミサイクルと同様である。

【4】 実験結果

(1) 実験 1. 制限給餌性リズム形成(PAA)の条件検討

① 餌の量の検討

24 時間絶食後、4 時間の摂餌量測定したところ、1 日目は 1.4 ± 0.11 g/mouse (0.60 ± 0.040 g/10 g BW)、2 日目は 2.0 ± 0.13 g/mouse (0.85 ± 0.047 g/10 g BW)であった。

したがって、以降全ての実験において、マウスの体重に適した用量のタブレットを作成し投与した。また、2 日間 RF のスケジュールにおいては、摂餌量の多い順に肝臓時計の位相が有意に前進していることが確認された。(F4,32 = 12.3, $P < 0.01$, one-way ANOVA) (Fig.17)。

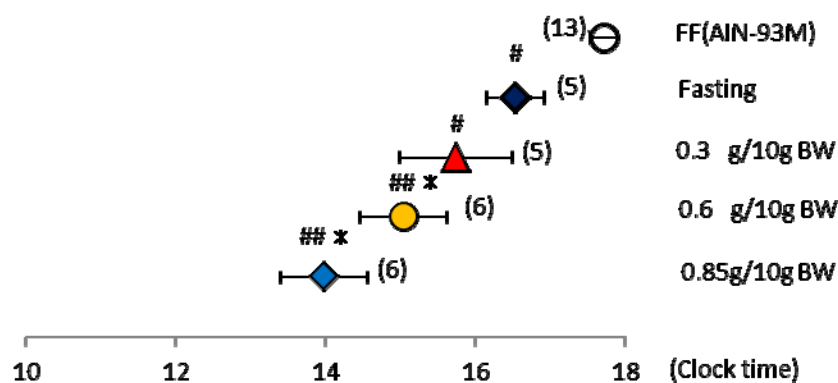


Fig.17 摂餌量の違いによる肝臓時計の位相前進作用

24 時間絶食後 2 日間、AIN-93M 食による制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。餌の量は 2 日間 0.3 g/10 g BW の餌を与える群 (0.3+0.3-ggroup; 赤三角)、0.6 g/10 g BW の餌を与える群 (0.6+0.6-g group; 黄丸)、1 日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2 日目 0.85 g/10 g BW (0.6+0.85-g group; 青ダイヤ)の餌を与える群である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズムによる検討を行った。

Fisher's PLSD test: #P,0.05, ##P,0.01 (vs. free feeding; 白丸). *P,0.05 (vs. fasting; 紺ダイヤ)。Fasting 群は2日間の絶食をした群である。

② RF 日数の検討

0.85g/10 g BW の餌を 4 時間(ZT6-ZT10)の RF し、その期間を 1 日、2 日、4 日、14 日間設けた結果、肝臓の時計の位相前進には最低でも 2 日必要であり、4 日間以上の RF によって位相前進の最大値に達することが分かった。これは、RF を 4 時間に設定し、14 日間経過したときの位相前進と同様の値を示しているからである(Fig.18)。したがって、本実験では 2 日間の RF スケジュールを採用した。

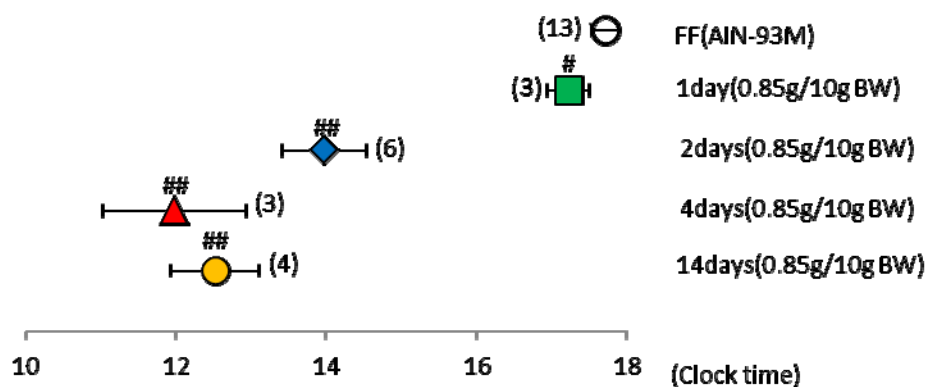


Fig.18 実験 1-② 結果

24 時間絶食後 2 日間、AIN-93M 食による制限給餌を行った。初日に 0.6 g/10 g BW の制限給餌を行う群 (1-day group; 緑四角); 1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日目 0.85 g/10 g BW の餌を与える群(2-day group; 青ダイヤ); 1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、二-四日目 0.85 g/10 g BW の餌を与える群 (4-day group; 赤三角); 14日間、ZT6-ZT10 (4 h)の四時間は自由摂餌することができる群 (14-day group; 黄丸)である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズムによる検討を行った。Fisher's PLSD test: #P,0.05, ##P,0.01 (vs. free feeding; 白丸).

③ 比較対照群の検討

ルミサイクルにおける Per2 の発光リズムは有意に確認できた($P < 0.05$ vs. FF, Fisher's PLSD test)(Fig.19)。したがって以下の実験の全てにおいて、比較対象を AIN-93M 群にした。

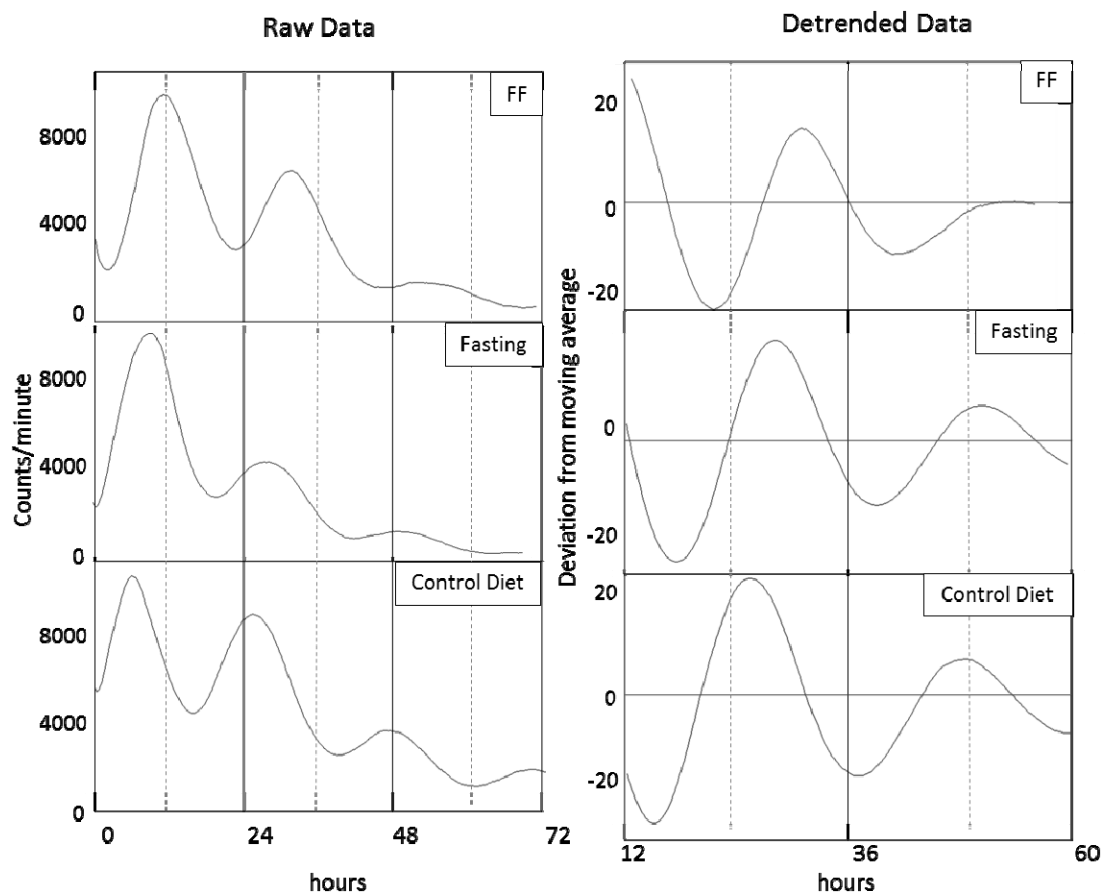


Fig.19 実験 1-③ 結果

通常摂餌下 (FF)、48時間絶食後 (Fasting)、24時間絶食の後 ZT6 に1日目 0.6 g /10g mouse BW 2日目 0.85 g /10g mouse BW の再給餌 (Control Diet)を行ったマウス肝臓時計の Raw data と Detrend data.

④ サンプルング時間の検討

FFにおいてZT3にサンプルングした際の肝臓時計の位相のピークは $pZT 17.7 \pm 0.18$ (N = 13) (培養開始 約 15 時間後)、であり、ZT7にサンプルングした際の肝臓時計の位相のピークは $pZT 18.5 \pm 0.53$ (N = 8) (培養開始 約 11 時間後)であった。

また、2 日間の RF では位相のピークがそれぞれ $pZT 14.0 \pm 0.56$ (N = 6) (培養開始 約 11 時間後)、 $pZT 13.9 \pm 0.9$ (N = 5) (培養開始 約 15 時間後)であった。

これらの結果からサンプルング時間と位相変動には関係性がないものと考えた。

⑤ マスキング効果の検討

2 日間の RF によって位相が前進することが分かったが、その作用がマスキング(一時的な位相前進作用)ではないことを明らかにするために、2 日間 RF した群と 2 日間の RF の後 1 日絶食した群との位相を比較検討した結果、双方の肝臓の時計の位相のピークは $pZT 14.6 \pm 0.8$ (N = 4) と $pZT 14.0 \pm 0.6$ (N = 6) であり、差は見られなかった。したがって、2 日間の RF によって肝臓時計の位相は確実に前進していることが言える。

(2)実験 2. AIN-93M 食における、各栄養成分の完全置換効果

肝臓時計の位相前進は 100%コーンスターチで観察され、同様に、大豆油でも位相前進が観察されたが、有意差は認められなかった ($P>0.05$ vs. fasting, Fisher's PLSD test) (Fig.20)。

100%シュクロース、100%グルコース、および 100%カゼインにおいては、位相前進を引き起こさなかった($P>0.05$ vs. fasting, Fisher's PLSD test)。血糖値は経口投与の後に 15、30、60、90、および 120 分後に測定した。

それぞれの血糖値と GI 値を示した(Fig.21;左:血糖値、右:GI 値)。血糖値をコントロール食と比較すると、100%シュクロースはほぼ同値、100%コーンスターチ、100%グルコースはわずかに高かった。しかし、100%カゼイン、100%大豆油の値はかなり低かった($P<0.01$ vs. water, Fisher's PLSD test)。

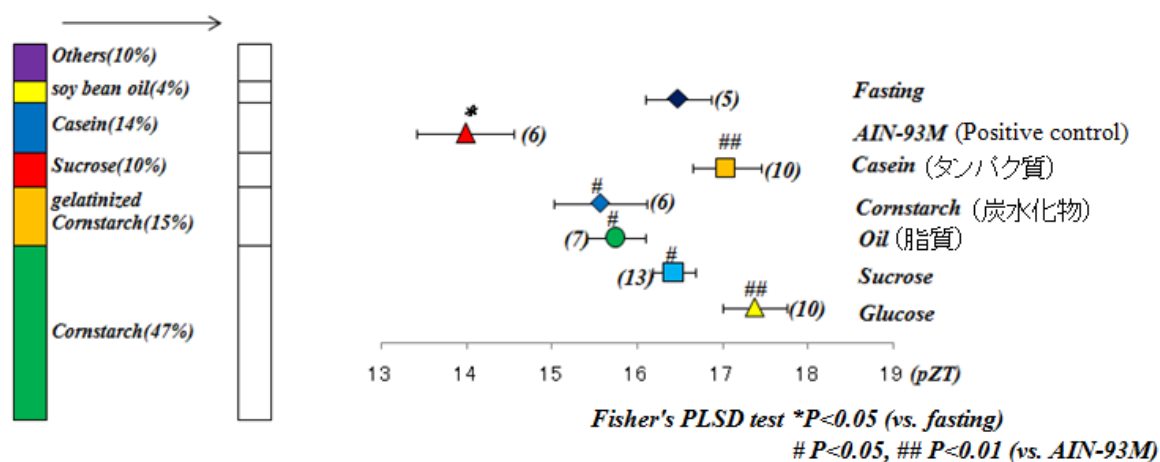


Fig.20 AIN-93M 食における、各栄養成分の完全置換効果の位相前進作用

左の色付きバーは AIN93-M の組成を示している。この組成中の栄養成分をそれぞれ100%置換する(カゼイン、コーンスターチ、大豆油、シュクロース、グルコース)ことによって位相の変動作用を確認した。24時間絶食後2日間、AIN-93M 食による制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。餌の量は1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日目 0.85 g/10 g BW である。大豆油は餌に相当するカロリーと同量(1日目 0.3 ml、2日目 0.43 ml)を経口投与した。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズムによる検討を行った。Fisher's PLSD test: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ (vs. AIN93-M). * $P<0.05$ (vs. fasting)。Fasting 群は48時間絶食をした群である。

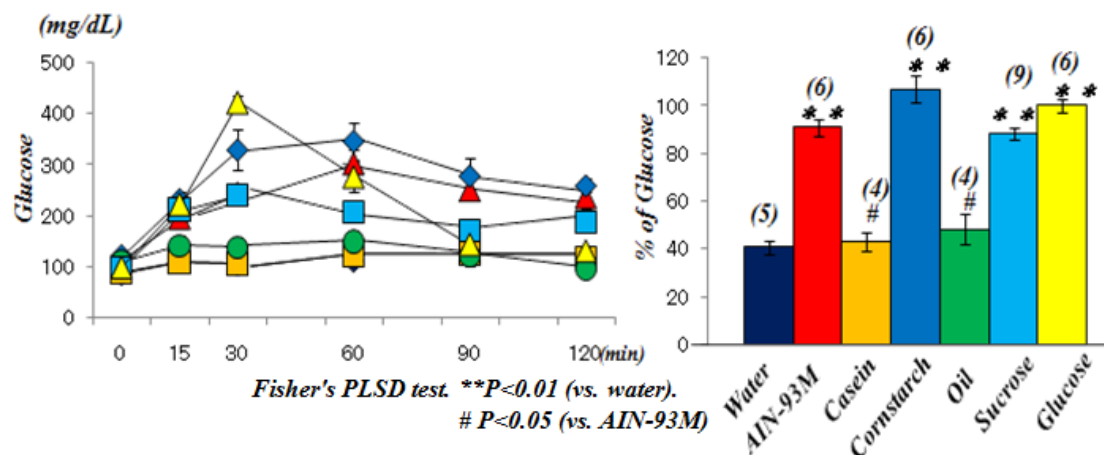


Fig.21 AIN-93M 食における、各栄養成分の完全置換効果における血糖値、GI 値
 左図は 0.03g/0.33ml /10g BW の経口投与を行った後のタイムコース。餌は Fig20 と同様の置換食であり、AIN93-M、100%コーンスターチ、100%カゼイン、100%シュクロース、100%グルコースである。100%大豆油に関しては 0.015 ml / 10g BW を経口投与し、対照群として水を 0.33ml /10g BW 投与した群を用意した。右図はタイムコースから割り出した GI 値であり、以下の計算式を用いた。GI value (%) = 100 x [摂餌後二時間の血糖曲線下積分 / グルコース摂餌後二時間の血糖曲線下積分]。Fisher PLSD test. ** $P < 0.01$ (vs. water). # $P < 0.05$ (vs. control).

(3)実験 3. 100%グルコース置換+栄養成分添加食の効果

4%大豆油と96%グルコース4.5%ビタミン、ミネラルと95.5%のグルコース、また、5%セルロースと95%グルコースとの組み合わせは位相前進を引き起こさなかった($P>0.05$ vs. 100%グルコース, Fisher's PLSD test)。しかし、14%カゼインと86%グルコースの組み合わせは肝臓時計の位相を有意に前進させた(vs. 100%グルコース $P>0.05$) (Fig.22)。

また、コントロール食(AIN-93M)(19.9 ± 1.2 , $N=5$)と標準食(MEQ)(19.0 ± 0.8 , $N=5$)を与えているマウスの肝臓時計の位相を比較すると両間に差は見られなかった。したがって、本研究において標準食の位相変動を考慮しなかった。

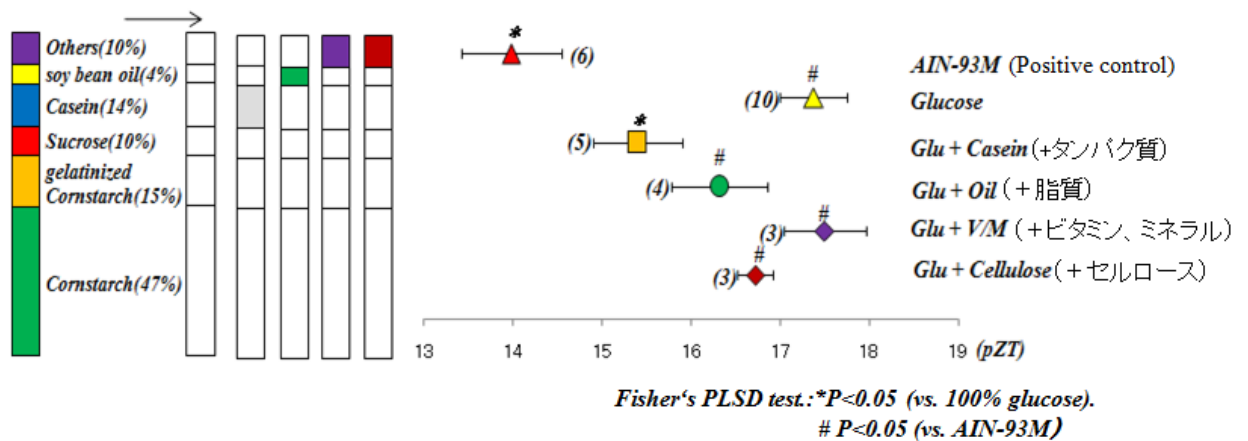


Fig.22 100%グルコース置換+栄養成分添加食の効果における肝臓時計の位相前進作用
グルコースに添加した成分として、カゼイン(14%カゼインと86%グルコース)、大豆油(4%大豆油と96%グルコース)、
ビタミン・ミネラル(4.5%ビタミン・ミネラルと95.5%のグルコース)、セルロース(5%セルロースと95%グルコース)を挙げ
る。それぞれの栄養物のパーセント構成と置換部分は白抜きグラフの色つき部分で表示している。24時間絶食後2
日間、AIN-93M食による制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。餌の量は1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日
目 0.85 g/10 g BW である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズ
ムによる位相前進作用の検討を行った。Fisher's PLSD test: # $P<0.05$ (vs. AIN93-M). * $P<0.05$ (vs. 100% glucose)。

(4)実験 4. AIN-93M 食における、コーンスターチとシュークロースの部分置換効果

グルコース、シュークロース、またはフルクトースとの置換はそれぞれ位相前進を顕著に引き起こし、グルコース、シュークロース、フルクトース、およびポリデキストロースの順に位相前進が確認された(Fig.23)。

また、グルコース、シュークロース群間には、位相前進に違いが見られた($P < 0.05$ vs. fasting, Fisher's PLSD test)。しかし、フルクトース、ポリデキストロースと fasting 群間には、位相前進の違いが全く見られなかった。それぞれの群における血糖値と GI 値の大きさは、位相前進と相対的な関係性を持っていると示唆された(Fig.24)。

また、補足データとしてコントロール食の 10%シュークロース部分を各種の糖(グルコース、フルクトース、ポリデキストロース)(Fig.25)で部分置換したところ、位相は前進したものの、コーンスターチ、シュークロース部分置換ほどの差は見られなかった($F_{3,18} = 0.63$, $P < 0.05$ vs. fasting, one-way ANOVA) ことから、ある程度の量に依存することも示唆された。

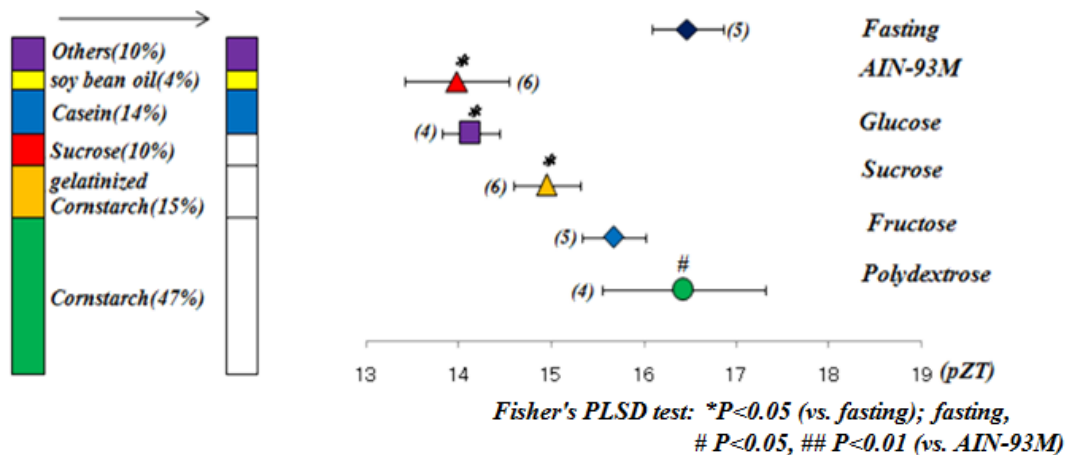


Fig.23 AIN-93M 食におけるコーンスターチとシュークロースの部分置換効果の位相変動糖の効果を見るためにコントロール食(AIN-93M)の α 、 β コーンスターチ、シュークロース部分を各種の糖(グルコース、シュークロース、フルクトース、およびポリデキストロース)に部分置換した。置換した部分は白抜き部分で示している。

24 時間絶食後 2 日間、AIN-93M 食による制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。餌の量は1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日目 0.85 g/10 g BW である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズムによる位相前進作用の検討を行った。

Fisher's PLSD test: # $P < 0.05$ (vs. AIN93-M). * $P < 0.05$ (vs. fasting)。

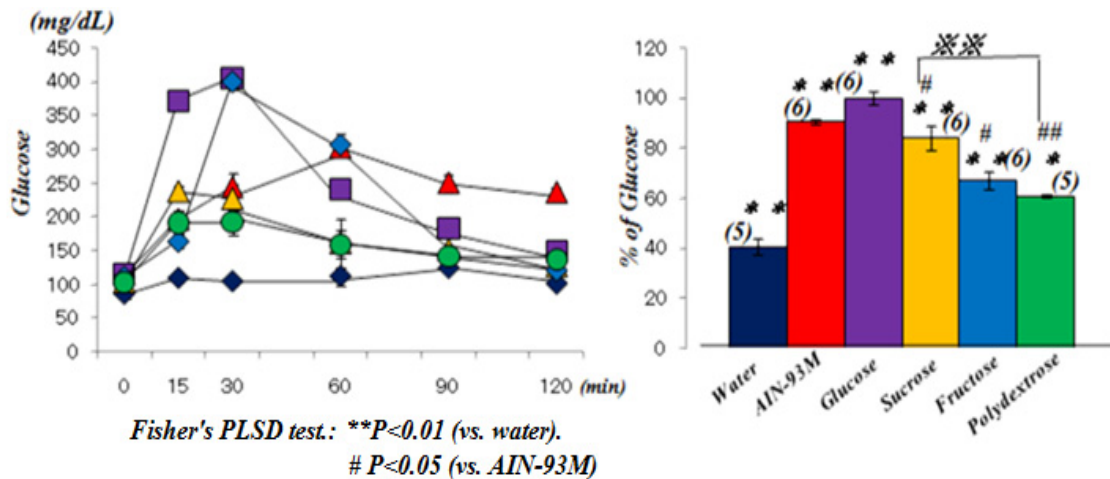


Fig.24 実験4 血糖値、GI 値結果

左図は0.03g/0.33ml /10g BWの経口投与を行った後のタイムコース。餌はFig23と同様の置換食であり、コントロール食(AIN-93M)の α 、 β コーンスターチ、シュークロース部分を各種の糖(グルコース、シュークロース、フルクトース、およびポリデキストロース)に部分置換したものである。

右図はタイムコースから割り出したGI 値であり、以下の計算式を用いた。

GI value (%) = 100 x [摂餌後二時間の血糖曲線下積分 / グルコース摂餌後二時間の血糖曲線下積分]。Fisher PLSD test. ** $P < 0.01$ (vs. water). # $P < 0.05$ (vs. AIN-93-M).

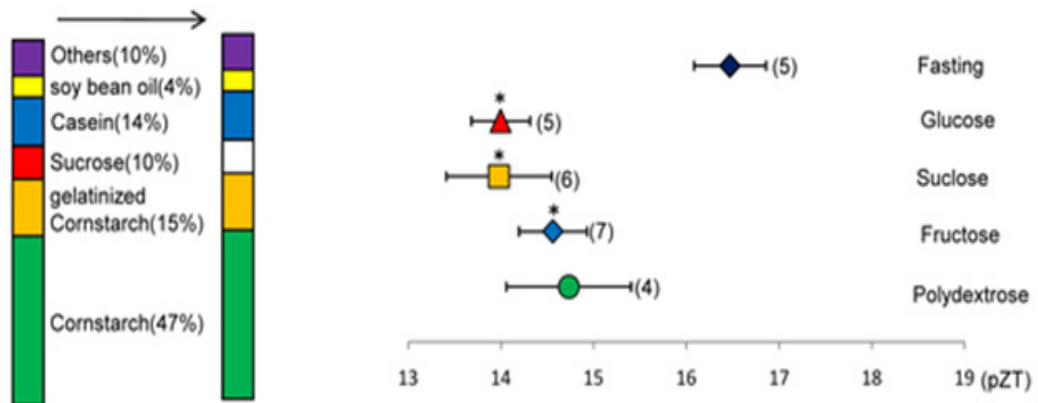


Fig.25 実験4 ルミサイクル補足結果

コントロール食のシュークロース部分を各種糖(グルコース、シュークロース、フルクトース、ポリデキストロース)に置換した餌を用い、24時間絶食後2日間、制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。餌の量は1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日目 0.85 g/10 g BW である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズムによる位相前進作用の検討を行った。

Fisher's PLSD test: # $P < 0.05$ (vs. AIN93-M). * $P < 0.05$ (vs. 100% glucose)。

(5)実験 5. アミロース含量の異なるコーンスターチの効果

HACS と比べて、GCS との代替は、より強い位相前進を引き起こした($P < 0.05$ vs...fasting、Fisher's PLSD test) (Fig.26)。また、GCS 群に比べて、HACS 群の血糖値の上昇は著しかった (Fig.26)。

次に 100%コーンスターチと同様に 100%GCS、100%HACS は位相前進作用をほとんど示さないことを確認するために、それぞれの完全置換における位相変動を検討したところ、どちらも位相前進は引き起こさなかった($P < 0.05$ vs. fasting, Fisher's PLSD test) (Fig.. 27)。

したがって、AIN-93Mと比較して 100%コーンスターチ、100%GCS、100%HACS の位相前進作用には有意な差が見られた($P < 0.05, 0.01$ vs.AIN-93M, Fisher's PLSD test)。

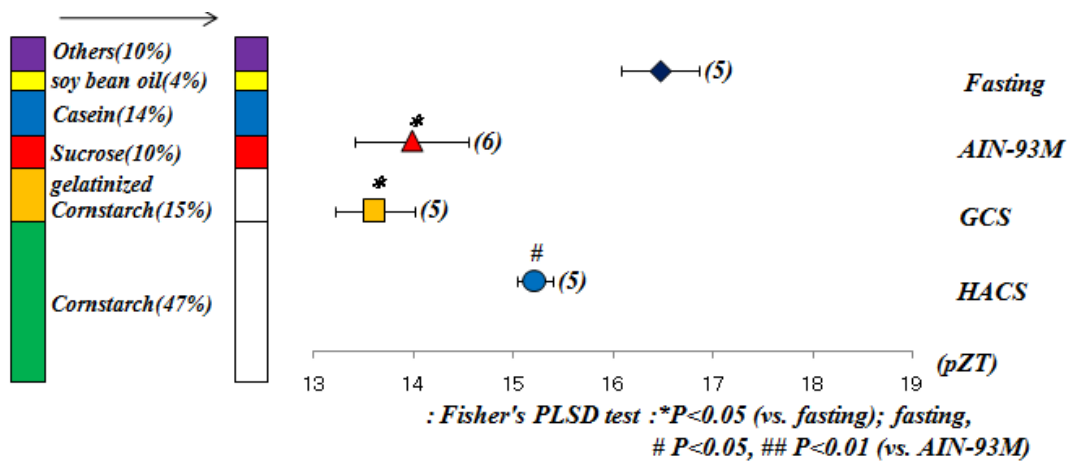


Fig.26 実験 5 ルミサイクル結果

アミロース含量の異なる二種類のコーンスターチ: HACS(high amylose cornstarch)、GCS(gelatinized cornstarch;low-amylose cornstarch)を用いてコントロール食のコーンスターチ部分の置換をした。置換部分は白抜きで示している。24時間絶食後2日間、制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。餌の量は1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日目 0.85 g/10 g BW である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズムによる位相前進作用の検討を行った。

Fisher's PLSD test: # $P < 0.05$ (vs.fasting). * $P < 0.05$ (vs. AIN93-M)。

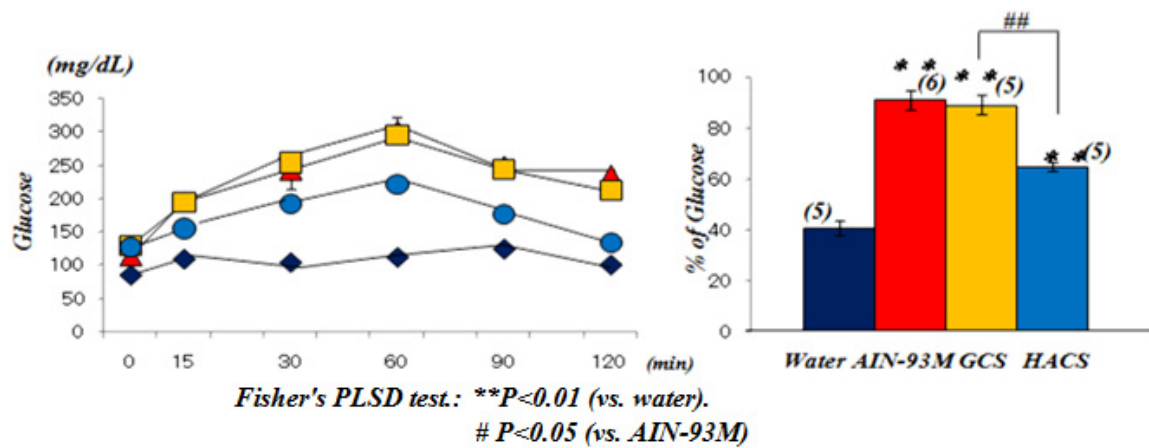


Fig.26 実験 5 血糖値、GI 値結果

左図は0.03g/0.33ml /10g BWの経口投与を行った後のタイムコース。餌はFig25と同様の置換食であり、コントロール食(AIN-93M)の α 、 β コーンスターチ、シュクロース部分をアミロース含量の異なる二種類のコーンスターチ: HACS(high amylose cornstarch)、GCS(gelatinized cornstarch;low-amylose cornstarch)に部分置換したものである。右図はタイムコースから割り出したGI値であり、以下の計算式を用いた。

GI value (%) = 100 x [摂餌後二時間の血糖曲線下積分 / グルコース摂餌後二時間の血糖曲線下積分]。Fisher PLSD test. ** $P < 0.01$ (vs. water). # $P < 0.05$ (vs. AIN93-M).

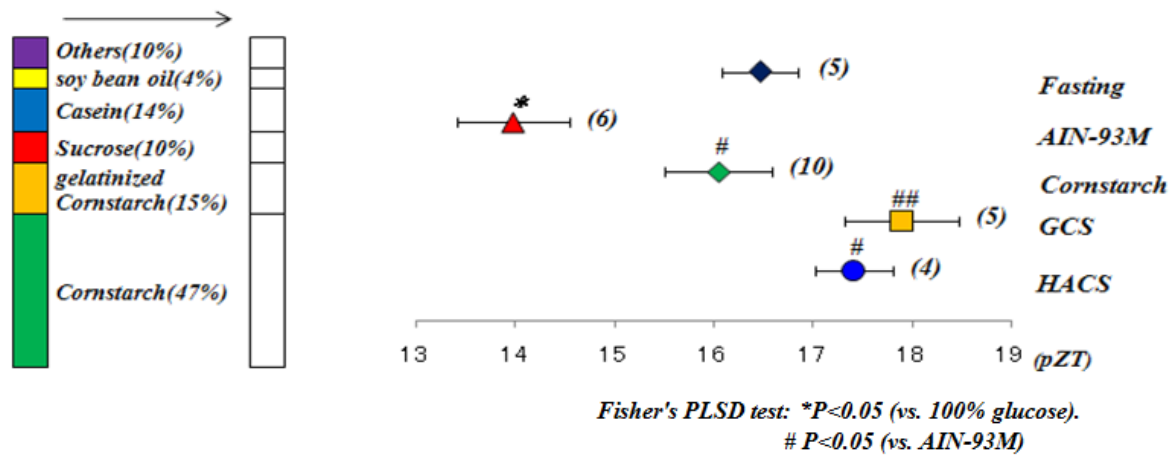


Fig.27 実験 5 ルミサイクル補足結果

左の色つきバーは AIN93-M の組成を示している。この組成中の栄養成分をそれぞれ100%置換食(100%コーンスターチ、100%GCS、100%HACS)を給餌した。24時間絶食後2日間、制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。餌の量は1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日目 0.85 g/10 g BW である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、生物発光リズムによる位相前進作用の検討を行った。

Fisher's PLSD test: * $P < 0.05$ (vs. 100% glucose) # $P < 0.05$ (vs. AIN93-M)。

(6)実験 6. 制限給餌性予期行動(FAA)の効果

2 日間のコントロール食の RF はマウスにおいて、FAA を引き起こした(Fig.28)。また、100%のグルコース、14%カゼインと86%グルコースの組み合わせの RF も同様に FAA を引き起こした。FAA の活動量は同時刻の FF の活動量と比較して値を算出した。

その結果、FF 群の活動量が $91 \pm 100\%$ (N=9)に対し、AIN-93M 群は $441 \pm 121\%$ ($P < 0.05$ vs... free-feeding(FF) ,Fisher's PLSD test,N=4), 100% グルコースは $338 \pm 72\%$ ($P < 0.05$ vs.FF, Fisher's PLSD test, N=4)、そして 14%カゼインと 86%グルコースの組み合わせ は $598 \pm 242\%$ ($P < 0.05$ vs.FF,Fisher's PLSD test, N=3)と著しく高かった。

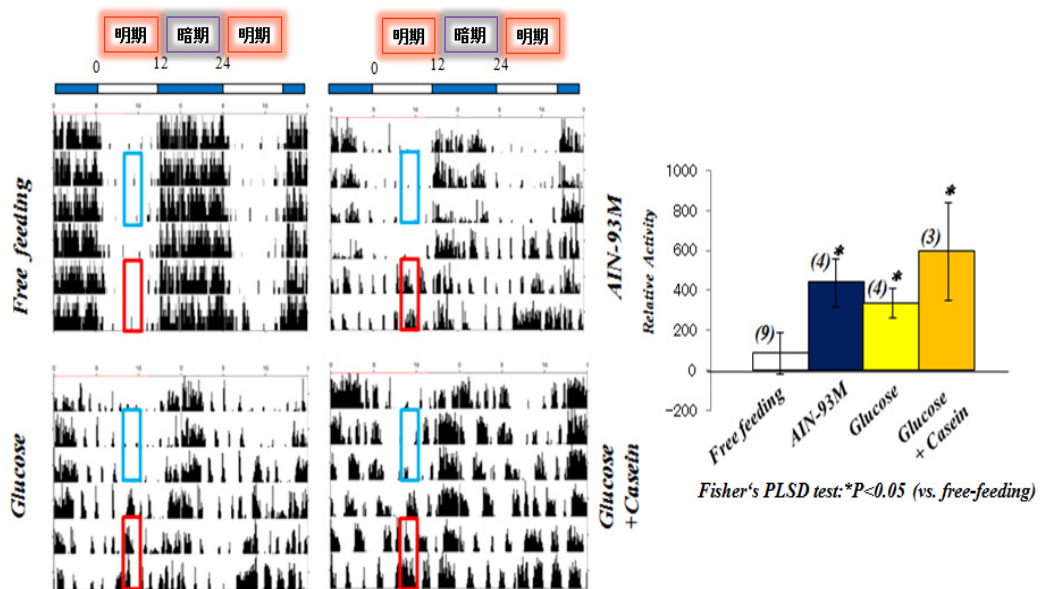


Fig.28 実験 6 結果

【5】 小括

(1)位相前進に必要な食餌量、RF 期間の検討

食餌量がラットの FAA に深く関係しており、食餌量が大きいほど、FAA のリズムも大きく位相前進するという先行研究がある(Stephan, 1997)。ラットに 0-20g food/day の用量の餌を与えたところ、摂餌量約 6g の用量が位相前進を引き起こすために必要な最小量であった。

本研究では、肝臓時計の位相前進にコントロール食の用量(0.7、1.4、2.0g/day)が大きく関与していることがわかった。

マウスの場合 FF 下で約 4--6g/day の餌を摂餌し、1.4g food/day の用量が位相前進を引き起こすために必要であった。以上より、自由摂餌と比較して、少なくとも 30%の食餌摂取量がマウスの肝臓時計における位相前進を引き起こすために必要な最小量であると示唆された。

また、先行研究より、2 日間の RF によって位相前進が引き起こされたとあるが(Le *et.al*, 2001)、本研究において、肝臓時計の位相を前進させるためには少なくとも 2 日間の RF が必要であり、RF4 日目で位相前進の最大値に達することが分かった。

(2)バランスのとれた食餌の重要性

本研究において、肝臓時計の同調には、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(AIN-93M)などのバランスのとれた食餌が、有効であることが示唆された。実際、スターチや糖に関しては、fasting 群と比較すると、100%グルコース、100%シュークロース、100%コーンスターチ、100%GCS、または 100%HACS では位相前進を引き起こさなかった。また、100%カゼインと 100%大豆油も有意な位相前進を引き起こさなかった。

このデータを踏まえると、100%糖、100%タンパク質、100%油などの単一栄養成分食は同調を引き起こすのに不十分であるといえる。よって、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なく位相維持にも大きく関与していると考えられた。

(3)カゼインとグルコースの関係性

100%グルコース、100%カゼイン、100%スターチ、および 100%大豆油は本研究において位相前進を引き起こさなかったが、100%シュークロースと比較すると、14%カゼインと 86%グルコースの組み合わせにおいては単一に近い栄養成分食ながら、位相前進を引き起こしたことから、少なくとも数種の栄養素の組み合わせが重要だと考えられた。

タンパク質と脂肪が豊かな食餌は小腸上部から胆嚢収縮物質(CCK)や、セクレチン、ペプチ

ドYYなどの消化管ホルモンの分泌につながる事が報告されている(Dockray 2009; Arora *et.al*, 2006; Green *et.al*, 1989)。

現在、末梢時計の位相前進と消化管ホルモンの役割は未解明である。しかし、CCK の役割を研究している実験もある(Lundberg *et.al*, 2007; Shimazoe *et.al*, 2008)ことから、食餌性の同調におけるCCKの役割解明が期待される。

また、植物油は制限給餌において位相前進を引き起こさないとされている研究報告もある(Kobayashi *et.al*, 2004)。同様に、本研究においても大豆油が肝臓時計の位相前進に関わっていないことが示唆された。

これらの結果から、バランスのとれた食餌の最小単位では、タンパク質とでんぷん、またはタンパク質と糖の組み合わせが肝臓時計の位相前進を引き起こすのに必要であると示唆された。

それに対して、ビタミン、ミネラルとグルコースの組み合わせ、また、セルロースとグルコースの組み合わせは位相前進を引き起こさなかったことから、コントロール食に含まれたビタミン、ミネラルやセルロースが、位相前進を引き起こさない可能性が高いと考えられた。

(4) 血糖値と時計の関連性

本研究において、肝臓時計を位相前進させるためには、コントロール食の中に含まれるスターチと糖が重要であることが分かった。そのなかで、ポリデキストロースをスターチや糖に置換した餌では、位相の前進が行われなかったことから、原因がポリデキストロースのカロリー不足にあるのではないかと考え、シュークロース部分のみをグルコース、シュークロース、フルクトース、およびポリデキストロースに置換すると、血糖値の上昇と正の相関性で位相が前進した。

2種類のコーンスターチ(Liu *et.al*, 2009)置換の実験は、さらにこれらの結果を裏付けるために行なった。コントロール食のコーンスターチ部分をGCS、HACSに置換すると、血糖値上昇がHACSに比べ著しかったGCSは位相前進もそれと同様に著しかった。以上より、肝臓時計の位相前進には、バランスのとれた血糖値の上昇を引き起こしやすい食餌が不可欠であることが、より示唆された。

(5) FAA とグルコース

グルコース負荷した Rat-1 線維芽細胞において、Per1 と Per2 の転写抑制が確認された(Hirota *et.al*, 2002)。しかし、本研究では、100%グルコースが位相前進を引き起こさなかった。この差異はおそらく実験手法が in vitro であるか、in vivo であるかに起因すると思われる。

また、絶食においてマウス肝臓の Per1 遺伝子発現が上昇し、Per2、Dec1 および Bmal1 遺伝子発現が減少したという報告がある(Kawamoto *et.al*, 2006; Kobayashi *et.al*, 2004)。したがって、バランスのとれた食餌(コントロール食)による遺伝子発現の増減は 100%グルコースでは起こり得ないかもしれない。

今後の展望として、コントロール食と100%シユークロス間の、肝臓の時計遺伝子発現パターンを比較する。FAA の行動実験において、グルコース RF 負荷したラットが FAA を変化させるとあるが(Stephan *et.al*, 2000)、本研究においても、コントロール食、14%カゼインと 86%のグルコースの組み合わせ、100%のグルコースが 2 日間の RF 下で FAA を引き起こしたことがわかった。

このことから、100%グルコースには肝臓時計の位相変動に影響を与えず、FAA を生産する能力があることが示唆される。FAA と末梢時計遺伝子発現が異なった作用機序を持つことは既に報告されているが (Davidson *et.al*, 2003; Feillet *et.al*, 2006) 、グルコースとの関係性は分かっていない。グルコースと FAA のメカニズムは本研究では解明していないが、今後の研究の大きな課題の一つとなるだろう。

(6) SCN

本研究の結果より、食餌における肝臓の時計遺伝子発現が誘発されるための特異的要因は明らかになっていない。仮に食餌内容の相違によって引き起こされる肝臓の時計遺伝子発現の見識を深めるとしたら、SCN に注目する必要性がある。しかし、食餌における時計遺伝子発現が肝臓特異的なものであったならば、SCN における位相前進を確認することは難しい。

先行論文に、RF が SCN の時計の位相変動を引き起こさないとあるが(Damiola *et.al*, 2000; Stokkan *et.al*, 2001; Hara *et.al*, 2001)、将来的にはコントロール食、そしてコントロール食置換餌による位相前進の効果を SCN の時計においても見る必要があるだろう。

II 油脂置換食による末梢体内時計への同調効果

【1】 緒言

先行研究から RF により油脂を投与したところ、行動リズムには影響を及ぼさないことがわかった (Stephan and Davidson, 1998)。油脂には多数の異なる脂肪酸が含まれている。多くの脂肪酸のうち、魚油に多く含まれる Docosa Hexaenoic Acid(DHA)や Eicosa Pentaenoic Acid(EPA)などのオメガ-3 脂肪酸が抗肥満作用を引き起こすことが多く報告されている(Talukdar *et.al*, 2011)。制限給餌(RF)を行った場合、グルコース上昇 (Hirota *et.al*, 2002)、インシュリン上昇 (Tahara *et.al*, 2010)、アドレナリン上昇 (Terazono *et.al*, 2003)、体温上昇 (Buhr *et.al* 2010)が引き起こされることで末梢時計に作用するという分子メカニズムは明らかになってきている。また、DHA や EPA は GPR40 のアゴニスト(Itoh, 2003) GPR120 のアゴニスト (Kebede *et.al*, 2008)、として作用することが報告されている。GPR120 のレセプターは小腸下部、大腸上部に存在し、グルカゴン様ペプチド(GLP-1)を放出することでインシュリンを上昇させる(Kebede *et.al*, 2008)。一方で、膵臓細胞で発現する GPR40 もインシュリン分泌を上昇させることが分かっている (Itoh, 2003; Oh *et.al*, 2010)。さらに DHA/EPA がインシュリンのカスケードとして IRS-1 や Akt キナーゼを通じて作用する (Briscoe *et.al*, 2003)。すなわち、魚油や DHA/EPA が様々な細胞のインシュリンの機能を強めていると示唆される。

栄養の実験において標準飼料とされる AIN-76 や AIN-93 は大豆油が含まれている。GPR40 (Hirasawa *et.al*, 2005)や GPR120 (Kebede *et.al*, 2008)のアゴニストとして様々な脂肪酸が報告されている。大豆油の脂肪酸の主成分はリノレン酸(50%)とオレイン酸(20%)であり、これらの脂肪酸は GPR40 には作用しない (Hirasawa *et.al*, 2005)。さらに GPR120 に対しても同様の作用があることが分かっている(Kebede *et.al*, 2008)。ところがツナ油のような主だった魚油は DHA (8-23%)、EPA (7-18%)、パルミトレイン酸 (5-11%)、オレイン酸 (9-16%)を含む。DHA/EPA は GPR40 や GPR120 のレセプターの作用が比較的高いことが分かっている (Hirasawa *et.al*, 2005; Kebede *et.al*, 2008)。従って魚油による大豆油の置換は、肝臓時計の RF によって誘発された位相変動作用を強化するかもしれない。

インシュリンの上昇によってインクレチン分泌が誘発されることから、インクレチンは糖尿病治療のために臨床的に使われる。インクレチンの中でも、酵素による分解に対して抵抗性のあるエキセナチドを使った。魚油または DHA/EPA を含む食餌にかかわらず、Exendin-4(Greig *et.al*, 1999)の注射処置によって、あるインクレチンは、インシュリン分泌の上昇を通して、肝臓時計の

RF によって誘発された位相変動を促進する。また、大豆油の含まれた従来の餌の代わりに魚油や、大豆油に溶解した DHA/EPA を含んだ餌を与え、RF によって誘発される位相変動作用を PER2::LUCIFERASE knock-in mouse の生物発光を測定することで評価した。肝臓での Per2, Dec1 の遺伝子発現変化は絶食後の再給餌で上昇することが報告されている。(Tahara *et.al*, 2010; Kawamoto *et.al*, 2006)。したがって、魚油と DHA/EPA を含む餌が肝臓で Per2, Dec1 の遺伝子発現の変化を促進するかどうかを調べた。

【2】 材料と方法

(1) 実験動物

第二章 I -【2】と同様のものを使用した。

(2) Per2:LUC ノックインマウスを用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ発光リズム解析

マウスに餌を慣れさせるため、実験の3-4日前に標準飼料からAIN-93M飼料に変えた。飼料変更後から24時間の絶食の後、第二章で説明したように、ZT0またはZT6で0.85g/10gBW(1日目)、0.6g/10gBW(2日目)の餌を給餌し、2時間後に摂餌量を確認した。マウスのほとんどは、2時間以内に全ての餌を食べたが、何匹かのマウスは完食できなかった。このような未完食のマウスは実験に使用しなかった。

また、今回の実験ではSCNの発光リズムも測定した。ZT3にサンプリングされた脳をマイクロサライサーDTK-1500(堂版イーエム株式会社、京都)を用いて300 μ mにスライスした。その後、メンブレン Millicell membranes(0.4 μ m, PICOMORG50, Millipore, Bedford, MA)に載せ、ルミサイクルの設置された37°Cのインキュベーター内で培養し、Per2遺伝子の発現リズム(発光リズム)を解析した。

エキセナチド(10 μ g/kg)投与実験ではRF状況下においてZT0で2日間投与を行った。魚油または大豆油の経口投与は、自由摂餌下でZT0に行った。

その後の解析方法は第二章 I -【2】と同様である。

肝臓の培養方法、解析方法は第二章 I -【2】と同様に行った。

(3) MEF細胞とインシュリン刺激実験

In vitroのインシュリン刺激実験は、PER2:LUCIFERASEマウスの胚線維芽細胞(MEF)を用いて行った。

MEFは、ウシ胎児血清(FBS)、0.1mMのD-ルシフェリン・ナトリウム塩(インビトロゲン)、DMEM下で培養した。魚/大豆油は、DMSOに溶解し、インシュリン(100nM、シグマアルドリッチ)または油+インシュリンを処置薬剤とした。デキサメタゾン処置後の40時間の生物発光のうち、2-3サイクル測られた30分間に、薬物を投与した。

(4)インシュリン濃度測定

2 日目の RF 状況下においたマウスに AIN-93M の餌を水に溶解して(0.1g/mL)、経口投与(0.33mL/10gBW)し、(魚油または大豆油を含んでいる AIN-93M の食餌)を与えられた。120 分後に、血中インシュリン濃度を測定した。

AIN-93M の餌(0.85g/10g のマウス BW)を給餌すると同時に、エキセナチドの皮下注射の後、インシュリンの濃度を 120 分で測定した。

エーテル麻酔下のマウスの目穿静脈から抗凝固剤としてヘパリンまたは EDTA を含んでいるチューブに血を集めて、24 時間 2~8°Cで保存し、血清を分離した。その後、Sensitive Mouse Insulin ELISA キット(Mercodia 社)で先行論文 (Tahara *et.al*, 2010) を基に測定した。

(5)RNA の分離とリアルタイム RT-PCR 測定法

①組織の抽出方法

採取した組織(肝臓)はすばやく RNA 抽出液(RNA-Solv Reagent、鼻腔、気道のみ TRIzol を使用)500 μ l にホモジナイズした。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 15000rpm,10min,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、11500rpm,10min,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酢酸ナトリウム 10 μ lを加え、20 分常温静置した。その後 11500rpm,20min,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 を加え、転倒攪拌後、8000rpm,5min,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(肺、肝臓)、20 μ l(鼻腔、気道)の DEPC 処理水を加えて沈殿を溶解させ、ボルテックス後、軽く遠心した。分光光度計を用いて、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 50ng/ μ l になるように調整した。

② mRNA 定量

リアルタイム PCR(Real-time PCR)は、定量 PCR(Q-PCR)の一つである。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅を経時的(リアルタイム)に測定することで、増幅率に基づいて鋳型となる DNA の定量化を行なう。

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。

抽出を終えたサンプルはリアルタイム PCR 解析システム StepOnePlus™を用いてその mRNA 定量をした。

RT-PCR の設定条件

1, 逆転写反応(1repeat)

reverse transcript(40°C, 5 分)

pre-PCR(95°C, 10 秒)

2, PCR 反応(40repeat)

denaturing(95°C, 5 秒)

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

3, Dissociation Protocol(1repeat)

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

なお、目的遺伝子の PCR 産物の定量値は、GAPDH の定量値で規準化したものである。

プライマーの配列は以下のとおりである。

GAPDH: 5'-tgacaggatgcagaaggaga-3', 5'-gctggaaggtggacagtgag-3';

Mouse Per2: 5'-tgtgtgcttacacgggtgtccta-3', 5'-acgtttggtttgcgcataaa-3';

MouseDec1: 5'-ccaggcggggaataaaac-3', 5'-ttcagctgggcaatgcactc-3';

Mouse GPR120: 5'-gcataggagaaatctcatgg-3', 5'-gagttggcaaacgtgaaggc-3'

(6)魚油、薬物投与方法

マグロ、イワシ、タラ、サンマの魚油は日本水産会社社(東京)から提供され、メンハーデン油、大豆油とココナッツオイルは SIGMA Ardrich(sentruis, MO, USA)から購入した。6890N ネットワーク・ガスクロマトグラフ・システム(Agilent 技術日本社、日本国東京)を用いたガスクロマトグラフィーによって定量したあと、各々の油の脂肪酸(FA)組成(Table.2)を決定した。データは GC Chemstation(Agilent Technologies)で集めたものを示している。

メチル・エステル類の識別は、標準的脂肪酸メチル・エステル類の比較によってなされ、先行論文(Yang *et.al*, 2011)を参考とした。DHA エチル・エステルと EPA エチル・エステルは、Chemport 社(大田、韓国)から購入した。精製率は CPFA-D85E02(85%DHA/2%EPA)、CPFA-E92D00(92%の EPA/0%の DHA)となっている。DHA または EPA 比率はマグロ油のものに合わせた。したがって、DHA(23%)や EPA(7%)を大豆油に溶解して調整した。

すべての油、そして、DHA/EPA は、N₂ ガスによって固定した後、-80C 急速冷凍冷蔵庫で保管した。インシュリン分泌能低下モデルマウスは、 β -細胞毒素 streptozotocin(STZ)の i.p.注射によって作られた。STZ の服用は 200mg/kg(シグマアルドリッチ)であり、非処置マウスには生理食塩水を同量注射した。マウスの血糖濃度は STZ 注射の 2 日後に測定し(グルコース PILOT キット、Aventir Biotech, CA)、グルコースレベルが 300mg/dL を超えるマウスを実験に用いた。

主な incretins は、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)とグルコース依存的インシュリン分泌性ポリペプチド(GIP)である。今回実験で用いたのは代謝に対する抵抗を有するエキセナチドである。24 時間絶食後、エキセナチド(シグマアルドリッチ、0.1 μ g/mL(使用の直前にボリュームを流用するために滅菌通常の食塩水で希釈))10 μ g/kg/mouse の投与量を皮下注射した。

(7)回腸下部および大腸上部に含有する腸内内容物量の測定

2 日目の RF 状況下で fast green を 0.05%含有した餌を給餌した(0.85g/10gBW)。そして、給餌 2 時間後にマウスを屠殺し、回腸下部と大腸上部の消化内容物を採取、乾燥重量を測定した。

(8)統計処理

第二章 I -【2】と同様。

Fatty acid composition of dietary oils and pEC50 values of fatty acids tested in HEK 293 cells stably expressing GPR120 and GPR40.

	Plant oils		Fish oils	Sardine	Saury	Tuna	Menhaden	pEC50	
	Coconuts	Soybean	Alaska pollack					GPR120 (#1)	GPR40(#2)
Fatty acids (%)									
C10:0	5.8	ND	ND	ND	0.03	ND	0.02	IA	4.85
C12:0	49.6	0.02	0.05	0.04	0.1	0.05	0.2	IA	4.92
C14:0	20.3	0.07	4.4	5.8	3.9	3.2	7.5	4.53	4.84
C16:0	10.5	9.8	10.4	13.7	9.1	17.3	23.4	4.28	5.3
C18:0	3.2	3.9	2.6	2.4	2.1	4.2	3.9	4.74	4.78
C20:0	0.1	0.3	0.1	ND	0.9	0.2	0.2	IA	4.21
ΣSaturated	89.5	14.1	17.6	21.9	16.1	25.0	35.2		
C16:1n-7	0.02	0.02	10.5	8.5	4.9	5.3	9	5.49	4.86
C18:1n-9	7.6	21.6	16	14.2	6.2	21.1	9.6	4.48	4.39
C20:1n-7 & n-9	0.05	0.2	11.4	3.4	20.6	3	1.5	-	-
C22:1n-11 & n-9	ND	ND	13.6	3	22.7	1.9	0.04	-	-
ΣMUFA	7.7	21.8	51.5	29.1	54.4	31.3	20.1	-	-
C18:2n-6	2.2	52.7	1	1.2	1.5	1.2	1.4	-	5.02
C20:2n-6	ND	0.03	0.3	ND	0.2	ND	0.2	-	4.97
C20:4n-6	ND	ND	0.5	1.5	0.9	2	1.5	-	4.92
Σn-6 PUFA	2.2	52.73	1.8	2.7	2.6	3.2	3.1		
C18:3n-3	0.02	6.9	0.7	0.7	ND	0.5	1.5	6.37	4.9
C20:4n-3	ND	ND	0.7	0.9	1.2	10.6	1	-	-
C20:5n-3	0.03	0.4	12.3	18.2	6.7	7	12	5.55	5.17
C22:5n-3	ND	ND	1.1	2.6	2.7	1.5	0.07	4.58	5.33
C22:6n-3	ND	ND	7.9	13.5	14.5	23.3	9.8	5.41	5.37
Σn-3 PUFA	0.1	7.3	22.7	35.9	23.9	42.9	24.4		

Values correspond to the mean of three separate samples processed independently.

ΣSaturated: Total saturated fatty acid; ΣMUFA: Total monounsaturated fatty acids; ΣPUFA: Total polyunsaturated fatty acids;

ND: Not detected; IA: Inactive, no response at 100μM.

#1 Data from Kebede M, et al. ; #2 Data from Hirasawa A, et al.

Table.2 各々の油の脂肪酸(FA)組成

【3】 結果

(1)各種油置換 AIN-93M 餌の制限給餌(RF)が引き起こす肝臓時計の位相変動

24 時間絶食のあと、マウスに AIN-93M の餌を 1 日目に 0.6g/10 BW、また 2 日目に 0.85g/10g BW 与えた(Hirao *et.al*, 2009)。RF には 2 日間とも魚油を含んだものを与え(Fig.29A)、位相後退作用が肝臓で引き起こされるかを確認した($P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. soybean oil group, Fisher's PLSD test) (Fig.29C,E)。魚油で有意な位相後退作用が確認され、中でもツナ油のグループは他のグループ(タラ油、サンマ油、イワシ油、ニシン油)と比較してもその作用は大きかった。大豆油やココナッツ油はどちらも作用は見られなかった。ZT6 に給餌した実験では有意な位相前進作用の結果が得られた (Fig.29B) ($P < 0.01$ vs. soybean oil group) (Fig.29D,F)。生物発光による概日リズムの実験の結果は Fig.29C と D に示す。

魚油や DHA や EPA を含んでいる AIN-93M の給餌を ZT0 または ZT6 に 2 日間行った結果 (DHA/EPA 比率はマグロ油のものと同量)、ZT0 で与えられる DHA/EPA は肝臓時計 (Fig.29G)の位相後退作用($P < 0.05$, $P < 0.01$ 対大豆油グループ)を引き起こした。

DHA と EPA の組合せは、マグロ油に類似した有意な位相後退作用(3.6 時間)を引き起こした。

餌の中に含有する DHA または EPA は ZT6 で与えた場合、肝臓時計の位相前進は示したものの、EPA よりも DHA がある方がその作用は大きかった ($P < 0.05$ 対大豆油グループ) (Fig.29H)。

マグロ油による位相変動の大きさを大豆油と比較すると、それぞれ 4.4 時間(マグロ油)と 2 時間(DHA)(そして、2.1 時間(マグロ油)と 0.8 時間(DHA))であった。

ZT0 の位相変動の大きさが ZT6 のものより大きかったので、その後の実験は ZT0 で主に行った。ZT0-ZT4の間2日間の処置を行ったが、同様に標準飼料を7日 ZT0-ZT4(位相後退作用)または ZT6-ZT10(位相前進作用)に給餌することで、位相の大きさに互換性を持たせた (Fig.29E、F)。

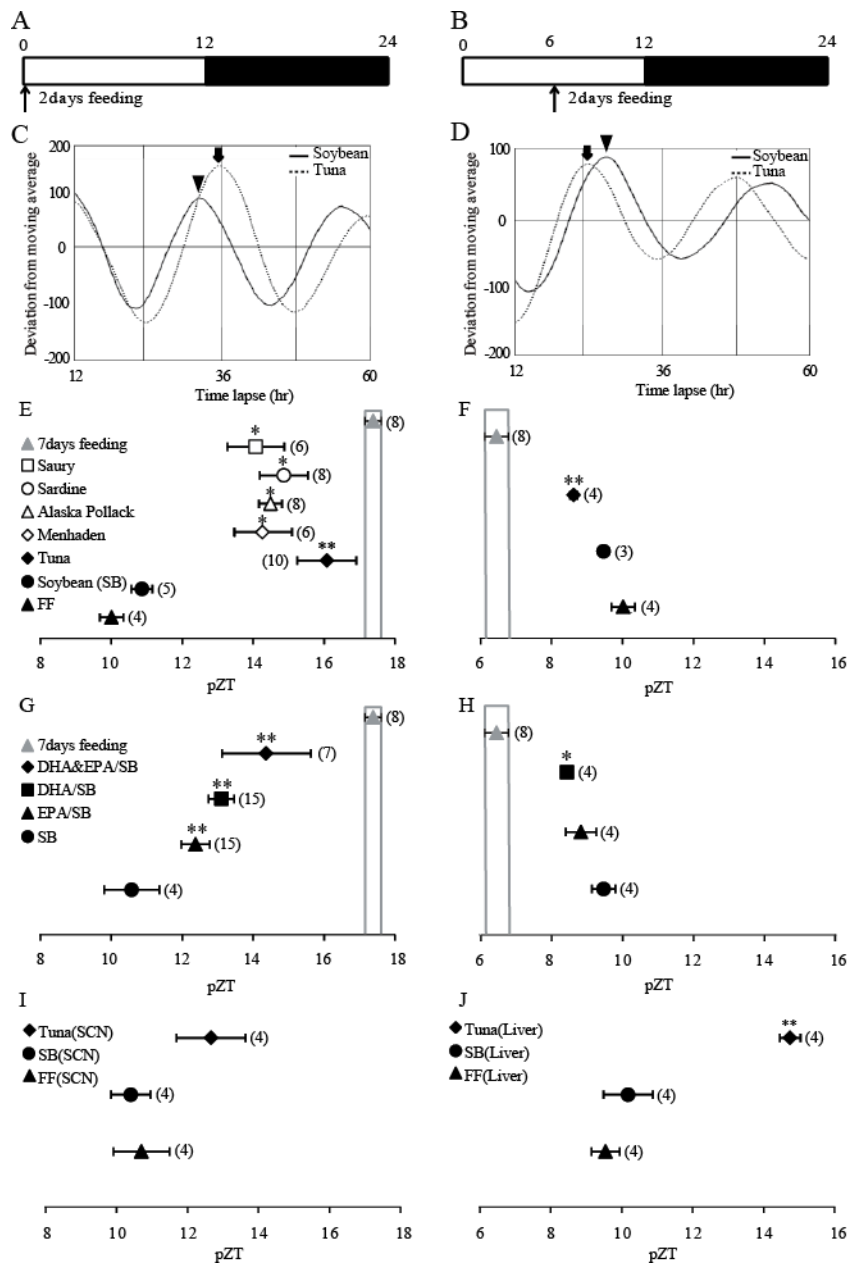


Fig.29 各種油置換 AIN-93M 餌の制限給餌(RF)が引き起こす肝臓時計の位相変動
 コントロール食の油部分の置換をした(マグロ油、タラ油、サンマ油、イワシ油、メンハーデン油、大豆油)置換食を用い、24 時間絶食後 2 日間、AIN-93M 食による制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。給餌時間は ZT0(A,E)と ZT6(B,F)である。餌の量は1日目 0.6 g/10 g BW の餌を与え、2日目 0.85 g/10 g BW である。マウスを屠殺した時刻を肝臓時計の projected zeitgeber time (pZT) とし、*PER2::LUCIFERASE* 発光リズム(C,D)による位相変動作用の検討を行った。*P < 0.05, **P < 0.01 (vs. soybean oil, control chow, Fisher's PLSD test).DHA/EPA においても同様の検討を行った(G, H)。I, J ではツナ油、大豆油の置換餌を ZT0 に2日間 RF した後の SCN(I)、肝臓(J)の位相変動作用を検討した。実験では SCN の発光リズムも測定した。ZT3 にサンプリングされた脳をマイクロスライサー DTK-1500(堂版イーエム株式会社、京都)を用いて 300 μ m にスライスした。その後、メンブレン Millicell membranes(0.4 μ m, PICOMORG50, Millipore, Bedford, MA)に載せ、ルミサイクルの設置された 37°C のインキュベーター

ター内で培養し、Per2 遺伝子の発現リズム(発光リズム)を解析した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (vs. soybean oil, control chow, Fisher's PLSD test)..

RF 状況の下で(0.85g/10g のマウス BW)、色付の餌を給餌した 2 時間後に、回腸上部、回腸下部、大腸上部、肝臓で消化された食物内容物および GPR120 の遺伝子発現を測定した。(Fig.30)

断食したマウスと比較して、消化された食物内容量は高く(Fig.30B)、GPR120 の遺伝子発現も回腸下部、大腸上部で有意に上昇していたことから、絶食から RF をしている実験的プロトコルにおいて、給餌後の 2 時間は、食物を回腸および大腸へ伝達するのに十分な時間であると考えられる。

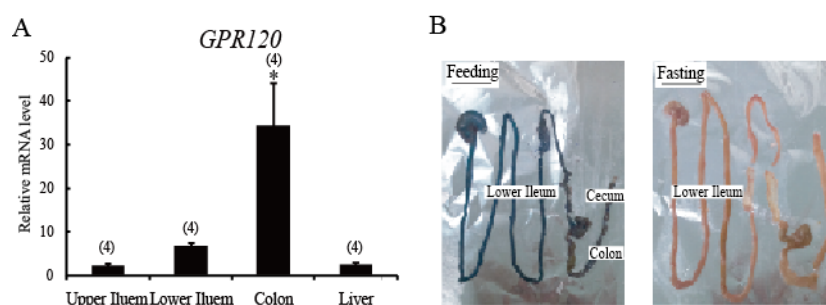


Fig.30 色付餌の給餌後 2 時間の、回腸下部と大腸上部で消化された食物内容物量

A、回腸上部、回腸下部、大腸上部、肝臓における GPR120 の遺伝子発現量の測定。目的遺伝子の PCR 産物の定量値は、GAPDH の定量値で規準化したものである。* $P < 0.05$ (vs. liver, Fisher's PLSD test:).

B、餌に fast green (0.05%) を混ぜた餌を 24 時間絶食の後与えた(0.85g/10g BW)。2 時間後に回腸下部、大腸上部に内容物が存在するかどうかの観察をした。

(2)魚油含有食が SCN および肝臓時計の位相変動に与える影響

マグロ油を含んだ餌が肝臓時計の位相変動に影響を与えたことがわかったが (Fig.29E)、SCN に影響を及ぼす可能性は考えられる。

そこでSCN時計の位相変動への影響を調べた結果、マグロ油 (Fig.29I、J) でわずかに位相後退作用がみられたものの有意差はなかった ($F=2.75$ 、One way ANOVA $P=0.899$)。

(3)AIN93-M に含まれる油脂置換によって生じる血中インシュリン濃度の差異

インシュリンは肝臓時計 RF 誘発性位相変動のために重要なホルモンである。そして、オメガ-3 脂肪酸摂取によって体内のインシュリン濃度を増やすことが報告されている (Kebede *et.al*, 2008)。

そこで、60、120、240 分後のインシュリン濃度を測定し、マグロ油、メンハーデン油、大豆油または DHA/EPA の違いを観察した。

インシュリンの血中濃度は、マグロまたはメンハーデン油 (Fig.31A) 餌の 120 分後に、有意な上昇を見せた。また、餌に含ませることのない DHA や EPA を単独で経口注入した場合は、濃度上昇は有意に見られなかったもの (Fig.31B)、DHA/EPA を組合せることによって、その濃度はかなり上昇した。

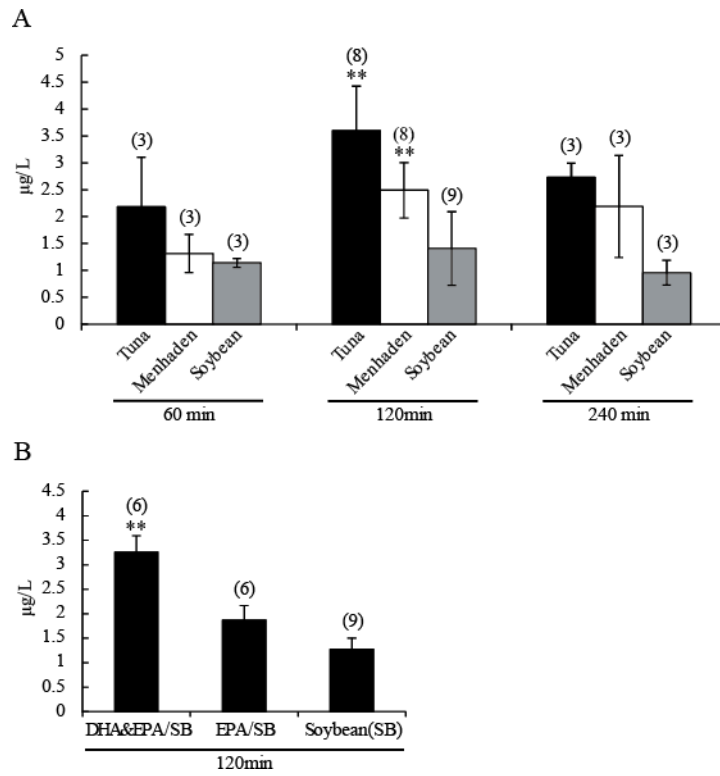


Fig.31 AIN93-M に含まれる油脂置換によって生じる血中インシュリン濃度の差異

コントロール食の油部分の置換をした(A;マグロ油、メンハーデン油、大豆油、B;マグロ油比率のDHA&EPA、DHA、EPA(大豆油に溶解))置換食を用い、24時間絶食後制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。給餌時間はZT0である。Aは60、120、240分後に、Bは120分後に、血インシュリン濃度を測定した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs. control soybean oil group, Fisher's PLSD test).

(4) スレプトゾトシン(STZ)投与糖尿病モデルマウスを用いた魚油含有餌の位相変動への作用

インシュリンが位相変動に関わっているかどうかを確かめるために、インシュリン分泌量を減少させるマウスを、STZ 投与によって作成した。

STZ 投与マウスで ZT0 に 2 日間魚油を含んだ食餌を与えると、肝臓時計($P > 0.05$ 対大豆油グループ)(Fig.32A)の位相変動に作用はほとんど見られなかった。

通常の STZ 無処置のマウスと比較するとマグロ油または大豆油(Fig.32B)を含有している AIN-93M 餌を給餌したあとのインシュリン分泌の効果は、STZ 処理をしたことで差が見られなくなった。

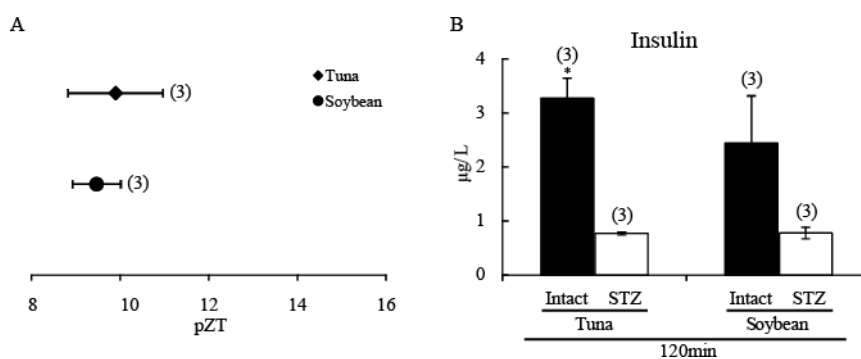


Fig.32 STZ 投与糖尿病モデルマウスを用いた魚油含有餌の位相変動への作用

膵臓 β -細胞の毒素である streptozotocin (STZ) の i.p. 注射によって作られた。STZ の服用は 200mg/kg であり、非処置マウスには生理食塩水を同量注射した。マウスの血糖濃度は STZ 注射の 2 日後に測定し、グルコースレベルが 300mg/dL を超えるマウスを実験に用いた。

その後 24 時間絶食の後、油置換餌を制限給餌して(ツナ油、大豆油)生物発光リズム(A)、120 分後のインシュリンの濃度(B)を測定した。

* $P < 0.05$ (vs. STZ-treated group, Fisher's PLSD test). The numbers in the parentheses indicate the number of tested mice.

(5) 魚油を含んだ餌が Per2 と Dec1 の mRNA 発現量に与える影響

16-24 時間絶食後の再給餌によって Dec1、Per2 の遺伝子発現量を増やし、Bmal1 の遺伝子発現量が減少することが報告された(Tahara *et.al*, 2010; Kawamoto *et.al*, 2010; Hitao *et.al*, 2010)。肝臓における生物発光リズムが大豆油よりも魚油に影響を受けたというメカニズムを説明するために、置換食を給餌した後の Per2、Dec1 と Bmal1 遺伝子発現の増加のレベルを調べた。マグロ油(P<0.01 対大豆油グループ)(Fig.33A)またはメンハーデン油(P < 0.05)を含んでいる餌を与えた場合、Per2 の遺伝子発現は 120 分後に、また Dec1 は(Fig.33B)60 分後に急激な増加が見られた。

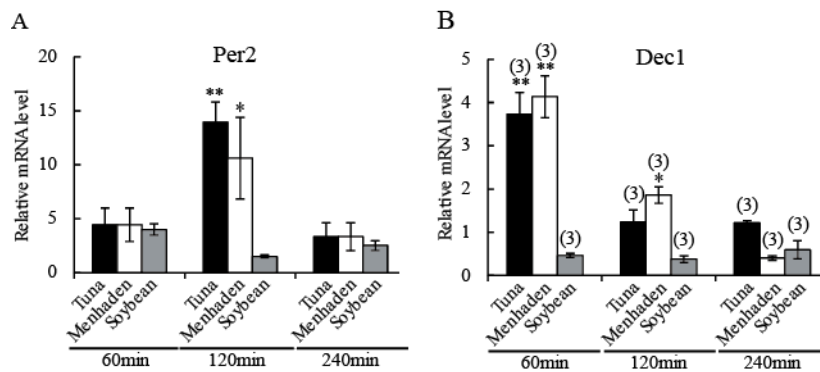


Fig.33 魚油を含んだ餌が Per2 と Dec1 の mRNA 発現量に与える影響

コントロール食の油部分の置換をした(マグロ油、メンハーデン油、大豆油、)置換食を用い、24時間絶食後制限給餌を行った(0-0.85 g/10 g BW)。給餌時間は ZT0 である。60、120、240 分後に、時計遺伝子発現量を測定した。

*P < 0.05, **P < 0.01 (vs. control soybean oil group, Fisher's PLSD test).

(6) エキセナチド投与が肝臓時計の位相変動、血中インシュリン濃度、時計遺伝子発現量に及ぼす影響

魚油とDHA/EPAがGLP-1 (incretinの一種)の増加を通してインシュリンの濃度を上昇させることによって、位相後退作用が発現するという仮説を実証するために、ここではエキセナチドの作用を調べた。

標準飼料(0.85g/10g, BW)を2日間給餌すると同時にZT0でエキセナチドの皮下注射を行うと、肝臓時計で大きな位相後退作用(3.5時間 対食塩注射液)を引き起こした(Fig.34A)。

エキセナチド注射は、血清($P < 0.05$ 対食塩注射液)でインシュリン濃度の重要な増加を引き起こして(Fig.34B)、投与の2時間後に、肝臓では *Dec1* と *Per2* 遺伝子発現レベルを上げた(Fig.34C, D)。

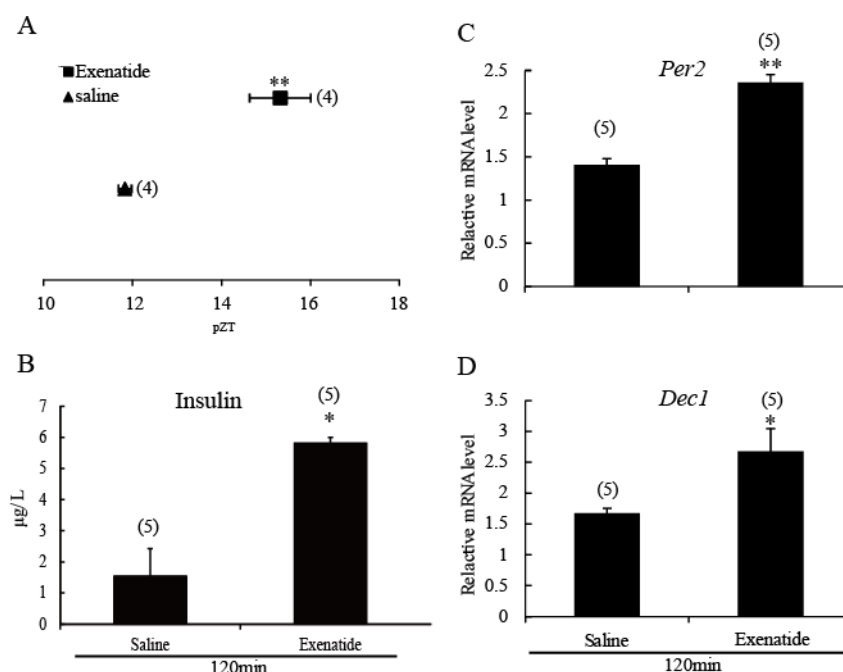


Fig.34 エキセナチド投与が肝臓時計の位相変動、血中インシュリン濃度、時計遺伝子発現量に及ぼす影響

AIN-93Mの餌(0.85g/10gのマウスBW)を2日間ZT0に給餌すると同時に、エキセナチドの皮下注射(10 $\mu\text{g/kg}$)の後、生物発光リズム(A)、120分後のインシュリンの濃度(B)、120分後の時計遺伝子発現量(C,D)を測定した。

* $P < 0.05$ (vs. saline-treated mice, Fisher's PLSD test).

(7)自由給餌下の魚油、DHA、EPA の経口投与の効果または位相変動、インシュリン濃度と時計遺伝子発現に関する作用

餌に含まれた魚油または DHA/EPA の RF が肝臓時計の大きい位相変動を引き起こしたので、ZT0 でマグロ油または大豆油を含んでいる DHA/EPA のみを自由給餌マウスに 2 日間、経口投与した。

位相後退作用は観察されなかった(Fig.35A)。さらに、インシュリン濃度を測定したところ、マグロ油または大豆油を含んでいる DHA/EPA は大豆油と比較しても有意な差は見られなかった (Fig.35B)。

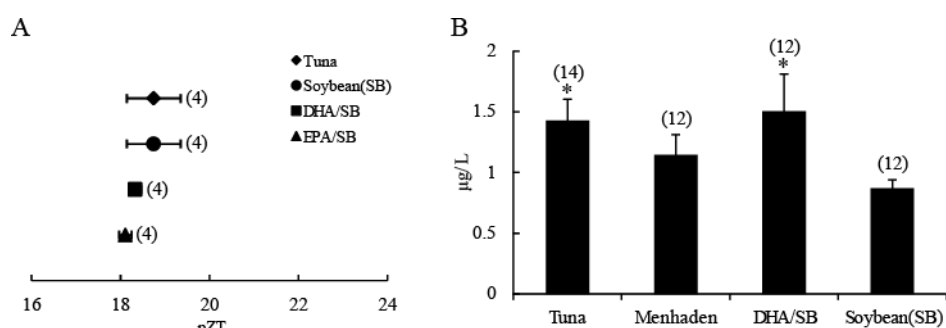


Fig.35 自由給餌下の魚油、DHA、EPA の経口投与の効果

ツナ油、大豆油、DHA(ツナ油比率),EPA(ツナ油比率)を自由給餌下のマウスに ZT0 に 0.034ml /10g BW、2 日間投与したときの生物発光リズム(A)と投与後二時間のインシュリン濃度(B)。* $P < 0.05$ (vs. soybean oil group, Fisher's PLSD test).

(8)インシュリン非生産的な MEF 細胞を使用して魚油のインシュリン反応の感受性に対する効果の検証

PER2-LUCIFERASE ノックイン・マウスから作成した MEF 細胞を用い、肝臓生物発光リズムを測定し、魚油がインシュリンによって位相変動に影響を及ぼすことができるかどうか調べた。

マグロ油は、MEF 細胞(Fig.36A)で位相後退作用の振幅を変えなかった。

このことから魚油そのものは、MEF 細胞の 24 時間周期のリズム(Fig.36B)で、位相変動を引き起こさないことが示唆される。

また、GPR120 レセプターの発現を各臓器で調べた結果、肝臓と MEF では発現が見られず (data not shown)、大腸、そして回腸下部で発現の増加が認められた(Fig.30A)。

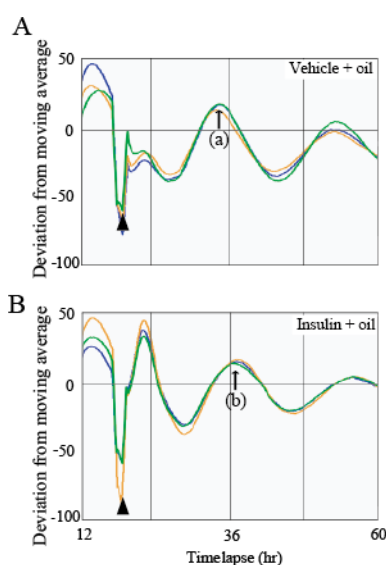


Fig.36 インシュリン非生産的な MEF 細胞を使用して魚油のインシュリン反応の感受性に対する効果の検証

PER2-LUCIFERASE ノックイン・マウスから作成した MEF 細胞を用い、肝臓生物発光リズムを測定した。A では DMSO に溶解した(final concentration, 0.05%)各種油(ツナ油;青線、大豆油;黄線、DMSO;緑線)を(a)地点で滴下した。B では同様の処置を行うが、(b)地点で各種油を滴下する際にインシュリンを混ぜて滴下した。* $P < 0.05$ (vs. peak A, Fisher's PLSD test:).

【5】 小括

魚油とDHA/EPAを含む餌は、肝臓時計のRF誘発性位相変動作用を強化した。第二章-Iの研究では、消化しやすいコーンスターチが消化しにくいコーンスターチと比較してRF誘発性位相変動作用を強化促進することを引き起こすことを証明し、グルコース上昇は、その際に鍵となることも明らかにした。さらに、大豆油のみの投与は、肝臓時計に位相変動作用を引き起こさなかった。

全脂肪酸の構成成分を Table.2 に示す。有意な位相後退作用を示した魚油は 20-30%のDHA/EPAを含むのに対し、位相変動を示さない大豆油はそれを含まないことから、RF誘発性活動リズムにはDHA/EPAが重要であり、特にDHAの比率が重要になってくると考えられる(マグロ DHA/EPA;23/7%、イワシ DHA/EPA;13.5/18.2%、タイセイヨウニシン DHA/EPA;7.9/12.3%、サンマ DHA/EPA;14.5/6.7%、メンハーデン DHA/EPA;9.8/12%)。

また、抗炎症性影響、抗肥満効果に、DHA/EPA が関与していることが報告されているため(Wall *et.al*, 2010; Manerba *et.al*, 2010; Calder *et.al*, 2009)、魚油(DHA/EPA)が肝臓時計においてRF誘発性位相変動を起こす原因にインシュリン分泌が関わっていることが示唆される。

実際、マグロ油またはメンハーデン油含有AIN-93M給餌の後、血清中インシュリン濃度は60分から増加し、120分でピークに達して、240分に減少した。

先行論文では、100nmol/gのリノレン酸を24時間絶食後のマウスへ投与すると小腸、門脈と下大静脈を通して、30分後にインシュリン濃度の上昇が確認されたという報告がある(Kebede *et.al*, 2008)。EPAと比較してDHAは内部結腸注射の180-240分後に血中インシュリン濃度を上昇させることが報告されている(Morishita *et.al*, 2008)。

本実験では魚油および大豆油に溶解したDHA/EPAを含む餌の給餌後に回腸下部、大腸上部に達し、また120分後に血中インシュリン濃度の上昇が確認された。

このように、魚油またはDHA/EPAの給餌によって回腸と大腸でGPR120レセプターを介するincretin分泌を通して(Kebede *et.al*, 2008; Talukdar *et.al*, 2011)グルコース濃度が上昇、さらにインシュリン分泌を強化することが示唆された。

DHAとオメガ-3脂肪酸がGLP-1分泌を増加させることはいくつかの論文で報告されている(Morishita *et.al*, 2008; Kebede *et.al*, 2008)。

しかしDHA/EPAはGPR40とGPR120のレセプターのいずれにも作用することから、GPR40のレセプターにDHA/EPAのような脂肪酸が直接影響を及ぼす可能性もある。様々な種類の脂肪酸は、GPR40(Hirasawa *et.al*, 2005; Oh *et.al*, 2010)とGPR120(Kebede *et.al*, 2008)のいずれ

にも関与していることも報告されていることから、両受容体に作用して脂肪酸がインシュリン放出 (Oh *et.al.*, 2010)を増やすということが挙げられる。

大豆油の主な脂肪酸はリノール酸(50%)、オレイン酸(20%)とパルミチン酸(10%)であり、ココナッツ油の主な脂肪酸はラウリン酸 50%、ミリスチン酸 20%、オレイン酸 7.6%、パルミチン酸 10.5%、ステアリン酸 3%である。GPR40 はパルミチン酸、ラウリン酸によってインシュリン分泌が促されるが、GPR120 はラウリン酸によるインシュリン分泌が引き起こされないことから、インシュリン分泌を通じた食餌性の体内時計の位相変動に関与するレセプターは GPR120 の可能性が示唆される。

したがって、魚油の DHA/EPA は、GPR120 を介して肝臓時計の RF 誘発性位相変動に影響を与えていると考えられる。

オメガ-3 脂肪酸は、インシュリン分泌促進を通して、インシュリン抵抗性を向上する。MEF へのインシュリンには、位相変動を引き起こした(Tahara *et.al.*, 2011)。

本研究において MEF 細胞では、マグロ油はインシュリン誘発性位相後退作用を促進しなかった。

この結果は、魚油がインシュリンのシグナリングに直接影響を及ぼすことなく RF によって誘発された位相変動作用を強化することを示唆している。さらに、魚油がインシュリンのような位相変動を生じることがなかったことは、GPR120 レセプターが MEF 細胞に存在しないことに由来する。

先行論文より、肝臓時計の RF 誘発性位相変動作用にはインシュリン分泌が重要であることを明らかにした。(Tahara *et.al.*, 2011)

したがって、魚油または DHA/EPA によるインシュリン分泌の促進は、肝臓時計の位相変動促進を助長していると言える。

絶食後の再給餌は Per2 や Dec1 遺伝子発現を増加することが報告され、さらにインシュリン分泌による肝臓での Per2 遺伝子発現のレベルの上昇も報告されている(Tahara *et.al.*, 2011)。

本実験で、魚油と DHA/EPA を含む食餌が、Per2 と Dec1 の遺伝子発現を増やすことが見出された。このような転写促進効果は、肝臓時計の RF 誘発性位相変動作用に関わっていることが示唆された。

GPR40 または GPR120 レセプター作用薬は cholestkinin 量を増加することが報告されている (Liou *et.al.*, 2010; Tanaka *et.al.*, 2008)。また、24 時間周期のリズムに影響することも報告されている(Shimazoe *et.al.*, 2008)。

したがって、魚油と DHA/EPA が cholestkinin の分泌促進作用を通して 24 時間周期のリズ

ムに影響を及ぼすことも考えられる。

リノール酸は、培養腸管細胞(Suh *et.al*, 2008)で、GPR40を通してCa²⁺、cPLA2とPPAR 経路を通して糖新生を刺激する。

Ca²⁺/経路と PPAR 経路が時計遺伝子発現を誘発するということは、知られていることから、これらの経路が関係しているかもしれないとも考えられる(Takashima *et.al*, 2006; Yang *et.al*, 2007, Teboul *et.al*, 2009)。また、DHA/EPA が中枢神経系(Ouellet *et.al*, 2009)に作用し、脳関連の病気(Yurko-Mauro, 2010; Kidd, 2009)を改善することも示唆された。

したがって、本実験では、魚油による肝臓時計の RF 誘発性位相変動作用促進が SCN 時計にも作用するかどうか調べたところ、マグロ油は肝臓リズムの大きな位相後退作用を引き起こしたが、SCN においては、作用は弱かった。

つまり、肝臓時計の魚油によって誘発された位相変動は、SCN 時計から独立している可能性が示唆された。

魚油を含む食品または補助食品としての DHA/EPA を含んだ食事は、末梢時計の位相変動のために重要な役割を担っているのである。

第三章 食餌同調における食餌のタイミング

【1】 緒言

給餌性予期行動(FAA)は、制限給餌(RF)時間(24 時間周期)の 2~3 時間前に増大する自発運動活性を特徴とする。FAA リズムは、脳内にあるであろう摂餌同調性振動体(FEO)によって制御されると考えられている(Mistlberger, 2009)。FAA に加えて、制限給餌が、肝臓時計などの末梢体内時計を同調することも知られている(Damiola *et.al*, 2000; Gooley *et.al*, 2006; Stokkan *et.al*, 2001)。肝臓の体内時計システムは、概日性機能に基づいて、炭水化物、アミノ酸及び脂質などの栄養素の代謝(Davidson *et.al*, 2004; Froy, 2009; Hoogerwerf, 2009)や薬物の代謝(Ohdo, 2010)において重要な役割を果たすとされている。肝臓は、末梢器官の中でも RF 効果の影響を受け易い臓器であることから(Davidson *et.al*, 2003)、肝臓の体内時計システムは、動物でも人類でも毎日の摂餌習慣で制御できると考えられる。

動物は、食餌が十分に与えられないと、行動変化によって不快を表すことがある。逆に、食餌の量が多すぎると、時間的な摂餌制御ができなくなる。ラットにおける FAA の研究では、非制限量のペレット状又は粉末の標準的なラット用固形飼料を明期中頃で 2~4 時間与える、タイムリミットを設けた 1 日 1 食の方法を利用している場合が多い(Mistlberger, 2009)。1 日 1 食の食餌スケジュールは、同調因子の特性を調べるのには便利な手段ではあるが、野生の夜行性げっ歯類の採餌パターンを正確に表すことはできない。

少量ずつ 1 日 1 食以上与える別の方法もある。これまでは、複数の FEO ペースメーカーが各食餌時間の追跡に向いているかどうかを判断するために、1 日に 2~6 食与えていた。食間を 5 時間以上空けて 1 日 2 食与えると、ラットは FAA を発現したが、それらの発現はどちらも、給餌タイミングよりも概日性タイミングの特性を表していた(Davidson *et.al*, 2003; Mistlberger, 2009; Stephan, 1989; Stephan, 1989)。一部のラットは 3 食のうち 2 食で FAA を発現したが、3 食全てを同時に予測するラットはいなかった(Stephan, 1989)。さらに、1 日 6 食与えると、すべての食餌に対応した FAA は生じない(Mendoza *et.al*, 2008)。面白いことに、1 日 2 食与えると、ラットは FAA を 2 回発現し、そして夜間の食餌にのみ整合する肝臓と胃腸の同調が見られた(Davidson *et.al*, 2003)。しかし、夜間の食餌だけが末梢体内時計を同調させる理由が、この研究では分からなかった。また、1 日 2 食の給餌スケジュールでは、末梢器官の体内時計のリズムが双峰型ではなく単峰型のピークを示す理由も不明であった。そこで、野生動物や人類の摂餌様式に基づいて、複数の摂餌回数と絶食間隔と食餌の量とが、制限給餌によって誘発される同調に与える影響を調べられたら良いのではと考えた。そのため、マウスに食餌の量

や食間の絶食間隔を変えて 1 日 2 食与えて、食餌の量と絶食間隔との組み合わせが、制限給餌によって誘発される肝臓の Per2 発現リズムの同調に影響を及ぼすか否かを調べた。

興味深いことに、行動 FAA リズムと末梢体内時計遺伝子の発現リズムとの解離は既に報告されている。Feillet ら(Feillet *et.al*, 2006)は、Per2 変異マウスでは、FAA の発現リズムは弱いですが、末梢体内時計遺伝子発現の位相変動が強く表れることを明らかにした。Davidson ら(Davidson *et.al*, 2003)もまた、FAA の発現リズムが定着してから 1 週間は自由摂餌させたマウス群において、絶食によって FAA の回復が可能だと報告している。ただし、これらのマウスでは、回復した FAA によって末梢体内時計遺伝子発現リズムに変動は現れなかった。ラット(Davidson *et.al*, 2009; Glooey *et.al*, 2006)及びマウス(Tahara *et.al*, 2010)ではそれぞれ、視床下部背内側(DMH)の細胞特異的損傷又は視床下部内側基底部(MBH)の熱損傷によって FAA の形成が抑制されることが分かった。MBH 損傷は、FAA の形成を抑制することの他に、Per2::luciferase ノックインマウスにおける、制限給餌によって誘発される肝臓の Per2 発現リズムの同調にも影響を及ぼさない(Tahara *et.al*, 2010)。また、MBH 損傷マウスでは、主要な振動体である視交叉上核(SCN)によってもたらされる給餌－自発運動活性リズムが喪失していることも分かった(Tahara *et.al*, 2010; Shibata *et.al*, 2010)。したがって、本研究の大半では、MBH を損傷したマウスを用いることで、RF によって誘発される肝臓時計の同調に対する FAA の影響を軽減し、さらには SCN 出力機能の影響も抑制した状態で実験を行った。

【2】 材料と方法

(1) 実験動物

第二章と同様のものを使用する。

(2) 行動解析

摂餌行動は、摂餌量に関連するリズムで決まる。MBH 損傷からの 10 日間の回復期を経た後で、マウスを摂餌監視システム(FDM システム、モデル FDM-ez1;Neuroscience Co.、東京(日本))に移した。本実験では、無傷マウスと MBH 損傷マウスもセットで用意した。飼料箱の重量変化を測定することで摂餌量を記録した。摂餌リズムは、24 時間にわたって毎時測定した固形飼料の消費変化率で表す。

(3) 固形試料の給餌と実験スケジュールとプロトコル

自由摂餌群以外のマウスは全て、固形飼料給餌用フードディスペンサ(Pellet Dispenser 45 MG、Med-associates, inc.、バーモント州St. Albans(米国))を取り付けたケージで飼育し、以下のように実験を遂行した。

実験1では、肝臓時計の同調に対する食餌の量の効果が、SCN 依存体内時計を通じてLD サイクルの影響を受ける可能性があるため、無傷(非損傷)マウスを用いた。

実験2では、MBH 損傷マウスを用いることで、SCN の出力による自発摂餌リズムの影響を軽減し、また、RF 処置によって誘発されるFAA の影響も軽減した。

実験プロトコル1 (Fig.37)では、固形飼料3.6g (80 粒;80粒)をZT0、ZT3、ZT6、ZT9、ZT12、ZT15、ZT18 又はZT21 に1 日1 回与えた。

実験プロトコル2 (Fig.38)では、固形飼料を40 粒ずつZT0とZT12 又はZT6 とZT18 に1 日2 回与えた。

実験プロトコル3(Fig.39)では、1 回目と2 回目の固形飼料の量を変化させて(00:80、20:60、40:40、60:20 又は80:00)、2 食間の給餌間隔を12 時間のサイクルとした。

実験プロトコル4(Fig.40)では、1 回目と2 回目の固形飼料の量は一定にして(40:40)、2 食間の給餌間隔を変化させた(8 時間:16 時間、12 時間:12 時間又は16 時間:8 時間)。

実験プロトコル5(Fig.41)では、1 回目と2 回目の固形飼料の量を変化させて(00:80、20:60、40:40 又は80:00)、2 食間の絶食間隔が長い(16 時間)か短い(8 時間)かのどちらかとした。

これまでの研究では、絶食間隔を12 時間、6 時間及び4 時間と徐々に縮めていくことで、急

激に体重が減少しないようにした(Mistlberger, 2009)。これに対し、本実験では、食餌の量は制限したが、摂餌時間は制限しなかったため、マウスには、2~3 日の間は給餌後6~8 時間かけて飼料を全て食べさせて、最終的に4 時間以内に食べ尽くすようにした。これにより、本実験では、マウスが急激な体重減少を示さなかった。

手術後10 日間の回復期を経て、マウスを(ZT10 から開始して)一晩絶食させてから、フードディスペンサによる連続RFで14~15 日間飼育した。RF 終了翌日のZT3 にマウスを屠殺した。以前の論文において、屠殺時刻が、ex-vivo 実験におけるマウスの肝臓時計の位相には無関係であることは既に知られている(Hirao *et.al*, 2009)。

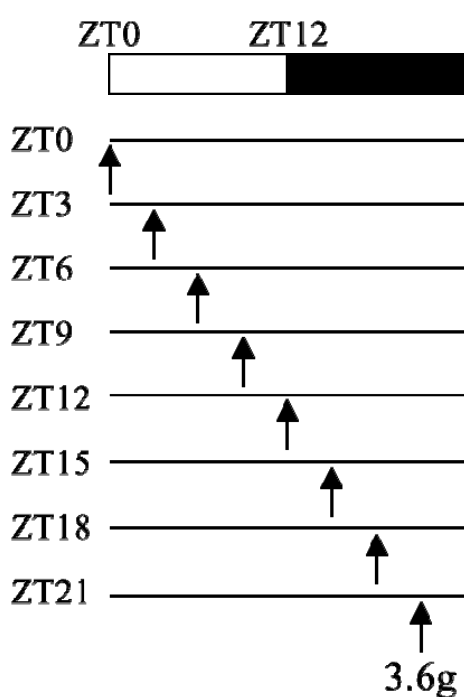


Fig.37 実験プロトコル1

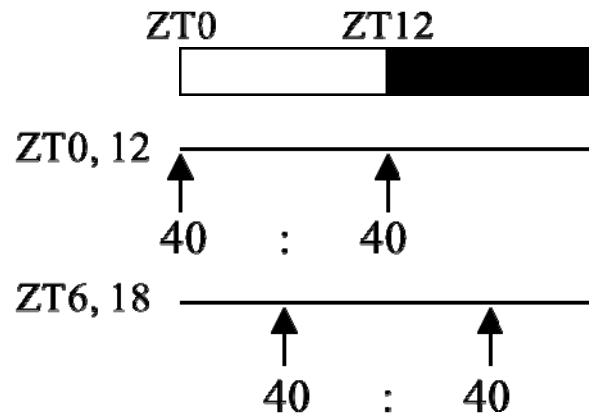


Fig.38 実験プロトコル2

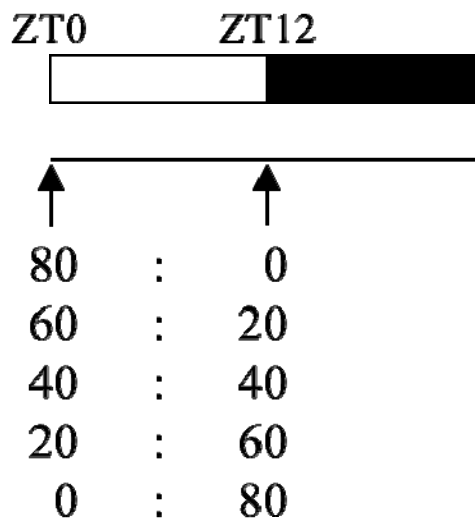


Fig.39 実験プロトコル3

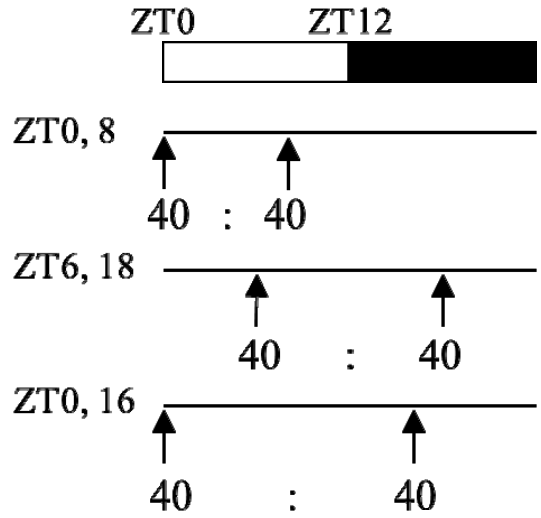


Fig.40 実験プロトコル4

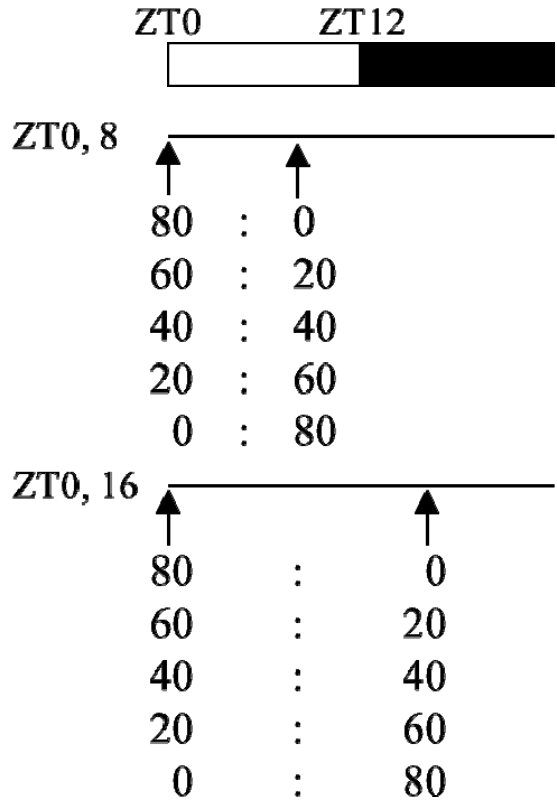


Fig.41 実験プロトコル5

(4)MBH 破壊マウス

MBH 手術プロトコルは、以下のように行った(Tahara *et.al*, 2010)。

マウスをケタミン(50 mg/kg を腹腔内注射で投与)で麻酔して、MBH にステンレス電極(直径 0.35mm)を挿入するために固定フレーム(株式会社ナリシゲ、東京(日本))に入れた。定位座標は、ブレグマの後方0.8mm 及び側方±0.3mm であり、頭蓋骨表面の下6.5mm であった。両側方の損傷は、電極チップを電流路から熱破壊装置(RFG-4A;Muromachi、東京(日本))で 55°C に 4 秒間加熱することで形成した。偽手術されたマウスも同様の方法で処理したが、電流路を通さなかった。マウスは全て、術後の回復のために LD サイクル下で 10 日間自由摂餌させた。

(5)脳の染色と損傷位置の確認

全ての損傷動物の脳は、屠殺後に回収して、エーテル麻酔下で生物発光実験を行った。脳は、4% パラホルムアルデヒド中で 3~4 日間保存した。その後、偽手術されたマウス群及び MBH 損傷マウス群から採取した 60µm 連続冠状切片をクレシルバイオレットで染色し、光学顕微鏡(BX51、オリンパス株式会社、東京(日本))に装備されたデジタルカメラで MBH 領域を通して撮影した。マウス脳アトラス(The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates、PAXINOS & FRANKLIN、ACADEMIC PRESS)を参照して、デジタルカメラの画像で DMH と VMH の境界及び弓状核を確認した。MBH 領域の損傷が不完全なマウスはデータから除外した。

(6)Per2::luciferase ノックインマウスを用いた生物発光リズム測定

(7)RNA の分離とリアルタイム RT-PCR

第二章と同様に行った。

(8)急性の再給餌によって誘発される肝臓時計の位相変動作用

マウスには、1 日目に 4 時間かけて 1.4±0.11g/マウス(20~30g)を給餌させ、それから 24 時間絶食させた後、2 日目に 2.0±0.13g/を給餌させた。その後 24 時間又は 48 時間絶食させてから ZT6 にペレット状固形飼料を 1.4g 与えた。その次の日の ZT3 にマウスを屠殺して、生物発光測定実験を行った。

(9)統計解析

第二章と同様に行った。

【3】 結果

(1)無傷マウスと MBH 損傷マウスにおける RF 条件下での体重及び摂餌リズム

各マウスには、固形飼料(1 粒 45mg)をフードディスペンサから1日合計 3.6g(45mg×80 粒)与えた。自由摂餌条件下では、無傷マウス群は 5.2 ± 0.2 g/日(N=24)を食べ、MBH 損傷マウス群は 4.9 ± 0.2 g/日(N=21)を食べたことから、食餌量(3.6g/日)は、この自由摂餌時の約 69~73% に設定した(自由摂餌の 66~75% で 3.6g/日)(Feillet *et.al*, 2003; Mendoza *et.al*, 2005)。

固形飼料 3.6g/日の RF スケジュール下で無傷マウス群の体重変化を測定すると、RF を 2 週間行った後の平均体重変化は RF 前に対して $92.3 \pm 1.2\%$ (N=61)であった。RF を 2 週間行った後の MBH 損傷マウス群の平均体重変化は $91.7 \pm 1.6\%$ (N=48)であり、無傷マウス群と MBH 損傷マウス群とでは差がなかった。過去の研究結果(Feillet *et.al*, 2003)と同様に、1 日 1 食もしくは 2 食与えた無傷又は MBH 損傷マウス群は、4 時間以内に固形飼料を全て食べ尽くした(通常は 3 時間以内)。無傷マウス群は、LD サイクル下のこの給餌パターンでも明確な日周リズムを示したが、MBH 損傷マウス群は、LD サイクル下では大きく減衰した日周摂餌パターンを示した(Fig.42B)。

DMH 領域が不完全に損傷しないように、以前の研究による MBH 領域損傷プロトコルと同一のプロトコルを適用した(Tahara *et.al*, 2010)。そのため、視床下部内側野の腹側部と背側部に比較的大きな損傷部を形成した。損傷部位には、多くの場合、VMH 部と ARC 部が含まれていた(Fig.42A)。Fig.42A に、代表例としての 4 例の損傷部位を示すが、これからも今回の外科手技では SCN が損傷しなかったことが分かる。したがって、DMH 領域内の損傷部位が大きくても、SCN は全て無傷であったといえる。

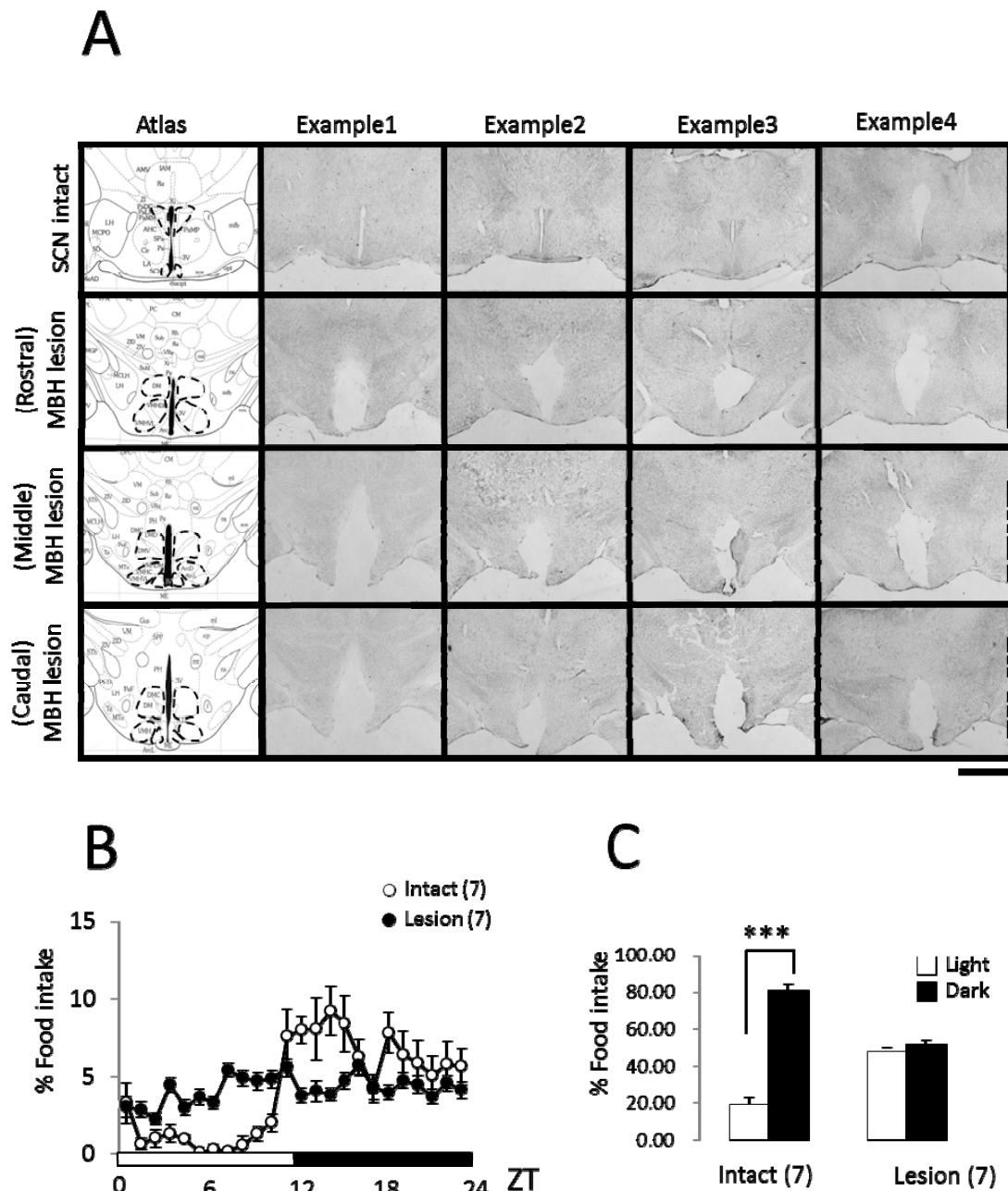


Fig.42 MBH 損傷マウス群 4 例の代表的な顕微鏡写真と明暗サイクル(LD)下の損傷マウス群の日周摂餌パターン

A:MBH 損傷部はクレシルバイオレットで染色した。試料片は、視交叉上核(SCN)並びに MBH の頭側、中央部及び尾側から採取した。損傷マウスは全て、DMH の破壊と VMH 及び ARC の部分破壊を示した。目盛バーは 1mm を表す。B:無傷マウス(○)及び MHB 損傷マウス(●)の日周摂餌パターン。摂餌率は、 $100 \times [1 \text{ 時間 bin 当たりの摂餌量(g)} / \text{1 日の総摂餌量(g)}]$ で計算した。10 日間の回復期を経た後、6 日間は、LD サイクル下で摂餌量を計測した。括弧内の数字はマウスの個体数を指す。C:日周摂餌量の昼夜比(100%)。*** $P < 0.001$; Student-ttest;Light vs. Dark

(2)無傷マウス群における、1日1食のRFによって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調

Per2::luciferase ノックインマウスに、ZT0、ZT3、ZT6、ZT9、ZT12、ZT15、ZT18 又はZT21にRFを適用した。先ず、本実験プロトコル(3.6g/日;80粒をフードディスペンサから給餌;C57 black×ICRの雑種第一代)によって肝臓時計の同調を確認した。マウスを屠殺して、肝臓時計の位相を測定した(Fig.43)。ZT0からZT21までを線で結び、ZTと位相変動との間の直接相互作用を調べたところ、肝臓時計の位相は、RFのZTに大きく直接的に依存していた。自由摂餌群($ZT9.6 \pm 0.38$)とZT15のRF群($ZT9.1 \pm 0.69$)又はZT18のRF群($ZT9.2 \pm 0.52$)の間には位相差がほとんどなかった。無傷マウス群/損傷マウス群及び/又は1日1食/1日2食のRFマウス群から採取された5つの肝葉で位相差を調べたところ、Per2遺伝子発現リズムに肝葉の差は見受けられなかった(Data not shown)。

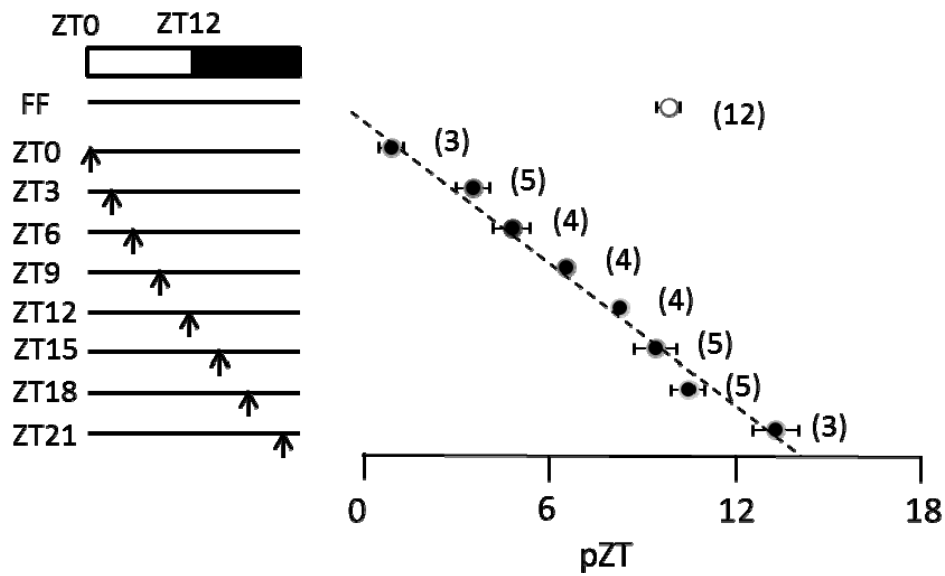


Fig.43 無傷マウスにおける1日1食のRFによって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調 (Phase response curve)

A:RF 処置プロトコル。*Per2::luciferase* ノックインマウスを各 ZT から開始する RF スケジュールに 14~15 日間課した後、屠殺して、その生物発光発現リズムを記録した。白及び黒の水平バーは、明期と暗期を表している。ツァイトゲーター時間(ZT)0 は照明を付けた時刻を表し、ZT12 は照明を消した時刻を表す。矢印はそれぞれ給餌時間を表している。B:自由摂餌マウス群(○)とRF 処置マウス群(●)において肝臓の生物発光発現リズムのトレンド除去データを入力して、この発現リズムのピーク時間(ツァイトゲーター時間、ZT)を算出した。グラフ中の波線は、肝臓体内時計の位相と給餌 ZT 時間との間の明確な関係を表している。括弧内の数字は、マウス個体数を示す。

(3)無傷マウス群における、1日2食のRFによって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調

マウスは通常、夜間に摂餌する(夜に約 80% 及び日中に約 20%)(Fig.42C)ので、ZT0/ZT12の1日2食に設定した。この処置は、短周期光パルスをZT0とZT12に与えるスケルトン光周期法と類似している(Ohta *et.al*, 2009)。そこで、ZT0とZT12に同量の固形飼料(各時刻に40粒づつ)を与えた(Fig.44A, B)。第一に、肝臓でのPer2::luciferase生物発光発現リズムの波形が、1日2食のRFスケジュール下のマウス群と1日1食のRFスケジュール下のマウス群とで類似していた(Fig.44A, B)。本実験では、1日2食のスケジュール下のマウス群には、双峰型パターンの肝臓の生物発光発現リズムが認められなかった。この発現リズムの振幅はそれぞれ、肝臓切片やマウス個体の大きさによって変わるため、生物発光発現リズムの振幅を比較するのは難しい。1日1食群と1日2食群では、生物発光発現リズムの振幅に差がなかった(第2ピークに関して、1日1食群では毎分 4602 ± 575 カウント;1日2食群では毎分 4820 ± 662 カウント)。末梢組織における生物発光発現リズムの振幅は、培養期間につれて減衰することが分かる(Fig.44A, B)。ただし、その減衰率は、1日2食群と1日1食群ではほぼ同じであった(1日1食群では第3ピークが毎分 3366 ± 237 カウント及び第4ピークが毎分 2185 ± 160 カウント;1日2食群では第3ピークが毎分 3588 ± 555 カウント及び第4ピークが毎分 2694 ± 387 カウント)。これら2つの群では、生物発光発現リズムの自由継続周期も類似していた(1日1食群では 19.76 ± 0.19 時間、1日2食群では 19.89 ± 0.18 時間)。ZT0とZT12にそれぞれ食餌の量を変えて(ZT0:ZT12の給餌量の比=80:00、60:20、40:40、20:60又は00:80)1日2食与えたRF群では、Per2による肝臓時計の位相を調べた。給餌量比が(40:40)又は(20:60)の群の肝臓時計の位相は、ZT12に1日1食与えた群(00:80)の位相に近かった(Fig.44A, B, C, D)。

これまでの実験結果では、1日2食(ZT6/ZT18)与えたラットは、ZT6及びZT18付近でFAAを2回発現し、そしてZT18付近に末梢体内時計のピークがあると報告されていた(Davidson *et.al*, 2003)。この過去の結果を今回のマウスプロトコルでも確かめるために、ZT6若しくはZT18に80粒与えるスケジュールと、ZT6とZT18にそれぞれ40粒ずつ与えるスケジュールを試みた(Fig.44E, F)。ZT6:ZT18(40:40)の1日2食のRF下のマウス群のPer2による肝臓時計の位相($ZT7.7 \pm 0.37$)は、ZT6に1日1食与えるRF下のマウス群(80:00)の位相($ZT4.5 \pm 0.58$)とZT18に1日1食与えるRF下のマウス群(00:80)の位相とのほぼ中間点であった(Fig.44D)。

Davidsonらは以前の研究論文において、ZT6とZT18に摂餌時間制限を設けていたが、本

実験では、ZT6 と ZT18 に同量の固形飼料を与えた。摂餌時間制限プロトコル(ZT6 と ZT18 に 2 時間ずつ)を利用すると、マウスは ZT18 に ZT6 の約 2 倍量の固形飼料を摂餌し(ZT6 では $1.65 \pm 0.22\text{g}$ 、ZT18 では $3.47 \pm 0.38\text{g}$)、また、肝臓時計の位相は、ZT18 に 1 日 1 食の RF 下のマウス群の位相に近かった($ZT10.2 \pm 0.5$ 、 $N=5$)。

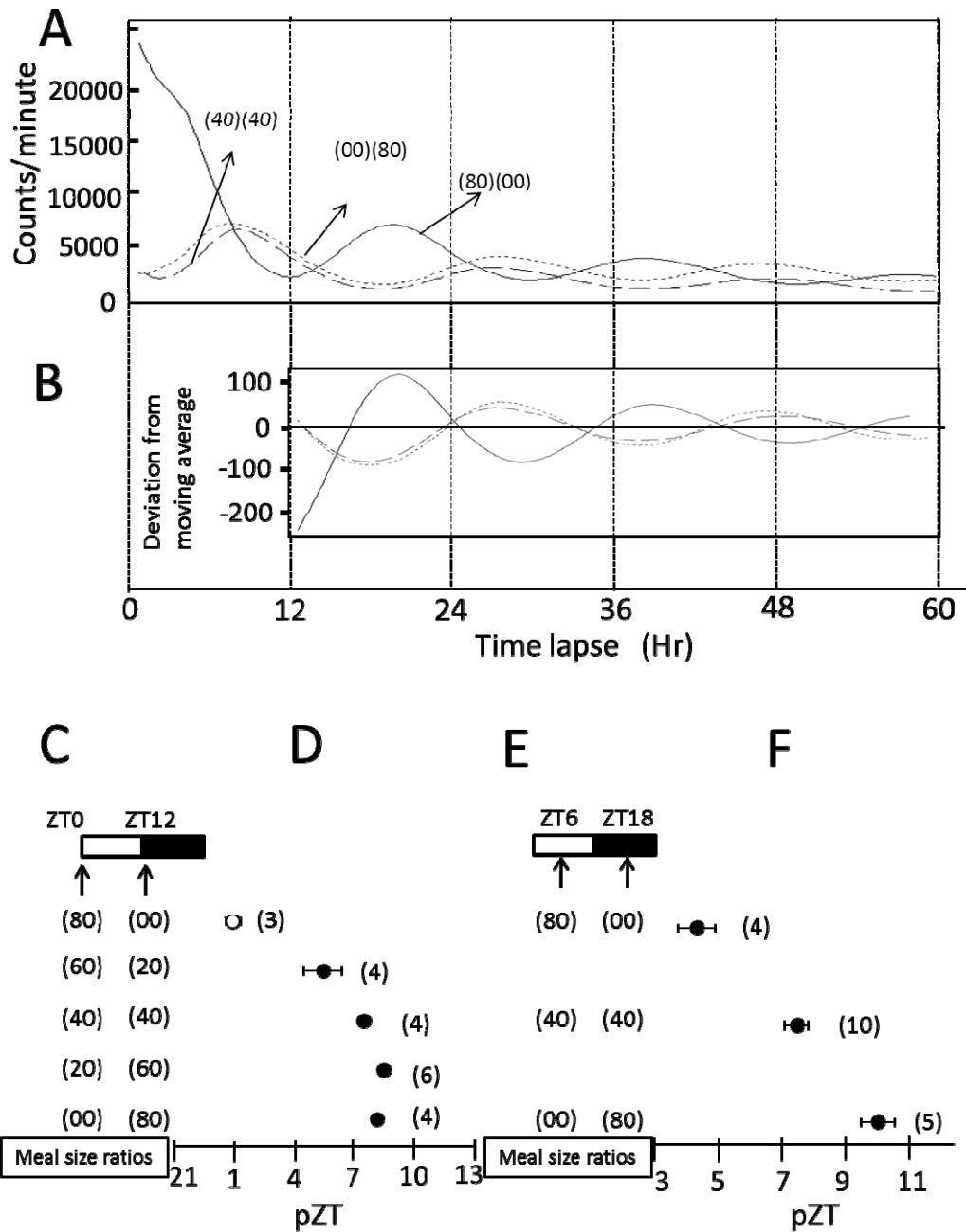


Fig.44 無傷マウスにおける、1日2食(ZT0/ZT12 又は ZT6/ZT18)のRFにより誘発された肝臓の生物発光発現リズムの同調。

A 及び B: ZT0(実線)若しくは ZT12(破線)に十分な食餌を1回与えた場合又は ZT0 と ZT12 に半量ずつの食餌を2回与えた場合(断続線)に関し、肝臓の生物発光発現リズムの代表的な生データ例(A)及びトレンド除去データ例(B)を得た。生物発光発現リズムは、*Per2::luciferase* ノックインマウスから取得した。C 及び E: RF 処置プロトコル。*Per2::luciferase* ノックインマウスは、1日2食のRFスケジュール(CはZT0/ZT12; EはZT6/ZT18)に14~15日間課してから屠殺して、肝臓の生物発光発現リズムを記録した。白と黒の水平バーは明

期と暗期を表している。ツァイトゲバー時間(ZT)0は照明を付けた時刻を表し、ZT12は照明を消した時刻を表す。矢印はそれぞれ給餌時間を表している。括弧内の数字は、固体飼料の給餌数を指す。D及びF:Per2発現リズムのピーク時間(ZT)を計算した。括弧内の数字はマウス個体数を表す。

(4)MBH 損傷マウスにおける、1 日 2 食の RF によって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調

無傷マウスで ZT0/ZT12 または ZT6/ZT18 に 1 日 2 食与えるプロトコルを利用すると、別の結果が生じる。1 日 2 食によって日周給餌リズムや FAA の影響が肝臓時計の同調に及ばないように、以前の論文に従って MBH 損傷マウスを準備した。先行論文(Tahara *et.al*, 2010)と同様に、1 日 1 食の RF 下では、無傷マウスでも MBH 損傷マウスでも単峰型のリズムが得られた。無傷マウス(第 2 ピークに関し、毎分 4602 ± 575 回)と MBH 損傷マウス(第 2 ピークに関し、毎分 4512 ± 222 回)の単峰型リズムの振幅には差がなかった。

次に、損傷マウスに、ZT0 と ZT12 にそれぞれ食餌の量を変えて 1 日 2 食与えるスケジュールを適用した。2 食の間隔は 12 時間空けて、1 回目と 2 回目(ZT0/ZT12)のそれぞれの食餌量比を変化させた(00:80、20:60、40:40、60:20 又は 80:00)(Fig.45)。MBH 損傷マウス群における肝臓の生物発光リズムは、1 日 1 食の RF スケジュールでも 1 日 2 食の RF スケジュールでも単峰型であることが分かった(Fig.45A、B)。ZT0/ZT12 に当量の食餌を 1 日 2 回(40:40)与えたマウス群の肝臓時計の位相($ZT6.2\pm 0.65$)は、ZT0($ZT1.9\pm 0.67$)又は ZT12($ZT9.9\pm 0.9$)に 1 日 1 食与えたマウス群の各位相のちょうど中間点にあった。この結果は、無傷マウスと全く異なる(Fig.45C、D)。結果として、MBH 損傷マウス群の肝臓時計の位相と食餌の量には、明らかな直線的な相互関係が認められた(Fig.45D)。

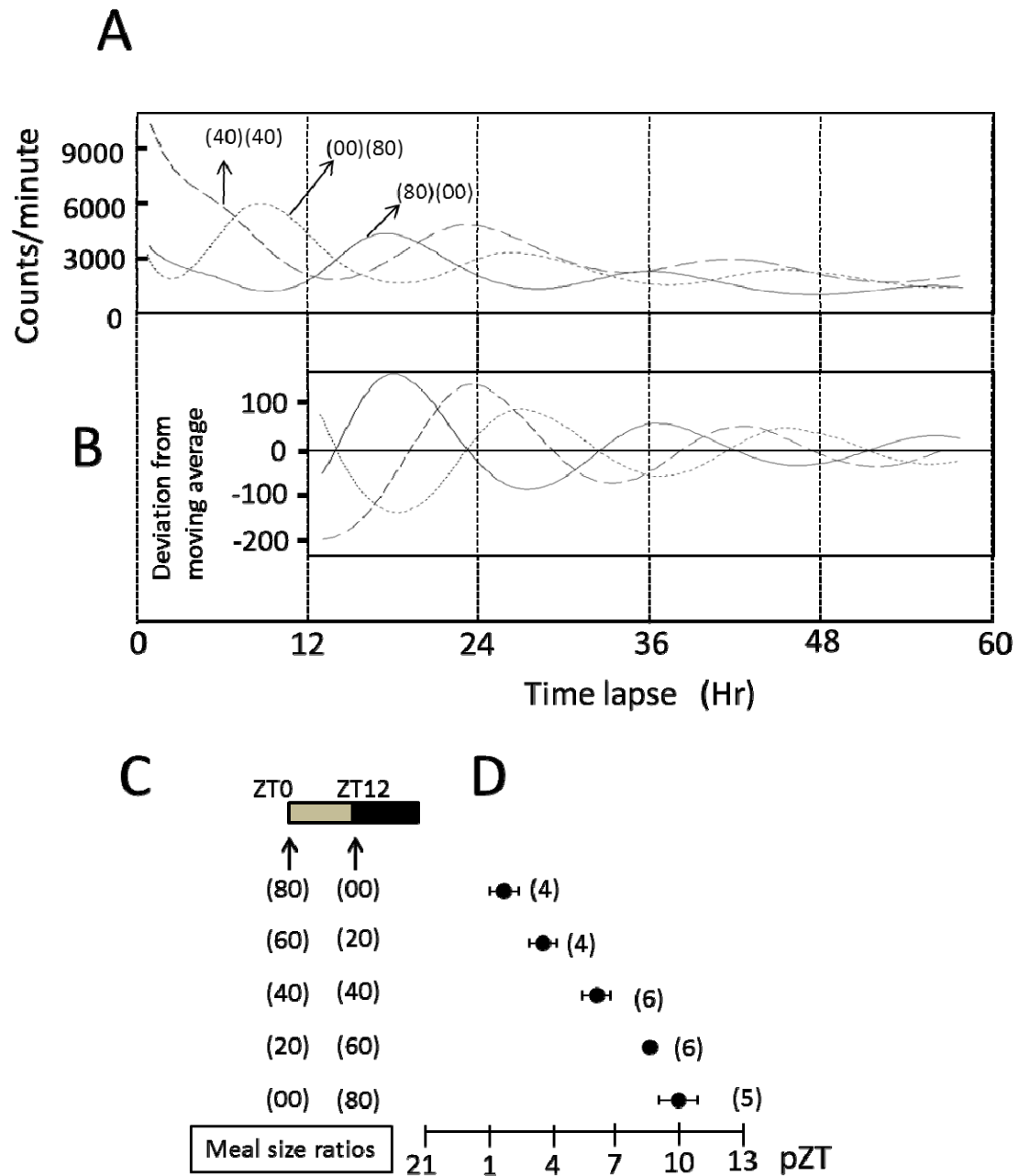


Fig.45 MBH 損傷マウスにおける、1 日 2 食(ZT0/ZT12)の RF により誘発された肝臓の生物発光発現リズムの同調

A 及び B: ZT0(実線)若しくは ZT12(破線)に十分な食餌を 1 回与えた場合又は ZT0 と ZT12 に半量ずつの食事を 2 回与えた場合(断続線)に関し、肝臓の生物発光リズムの代表的な生データ例(A)及びトレンド除去データ例(B)を得た。生物発光リズムは、*Per2::luciferase* ノックインマウスから取得した。C: RF 処置プロトコル。

Per2::luciferase ノックインマウスは、1 日 2 食の RF スケジュール(ZT0/ZT12)に 14~15 日間課してから屠殺して、肝臓の生物発光発現リズムを記録した。白と灰色の水平バーは明期と暗期を表している。ツァイトゲバー時間(ZT)0 は照明を付けた時刻を表し、ZT12 は照明を消した時刻を表す。矢印はそれぞれ給餌時間を表している。

括弧内の数字は、固体飼料の給餌数を指す。D:Per2 発現リズムのピーク時間(ZT)を計算した。括弧内の数字はマウス個体数を表す。

(5)MBH 損傷マウスにおける、RF によって誘導された肝臓の生物発光リズムの同調に及ぼす絶食間隔の効果

1 日 2 食のプロトコルで各回の固形飼料を 40 粒ずつに設定し、1 回目と 2 回目の食餌間隔を ZT0/ZT8、ZT0/ZT12 又は ZT0/ZT16 と変化させた(Fig.46A)。ZT0/ZT8 群での Per2 発現リズムの位相は $ZT2.4 \pm 0.69$ であり、ZT0 に 1 日 1 食与える RF 群の位相に近かった ($ZT1.9 \pm 0.67$) (Fig.46B)。しかしこれとは逆に、ZT0/ZT16 群では Per2 発現リズムの位相が $ZT13.0 \pm 0.5$ であり、ZT16 に 1 日 1 食与える RF 群の位相に近かった ($ZT11.2 \pm 0.44$)。Fig.45D に示すように、ZT0/ZT12 群における Per2 発現リズムの位相は、ZT0 又は ZT12 に 1 日 1 食与えたマウス群の各位相の中間点であった(Fig.46B)。

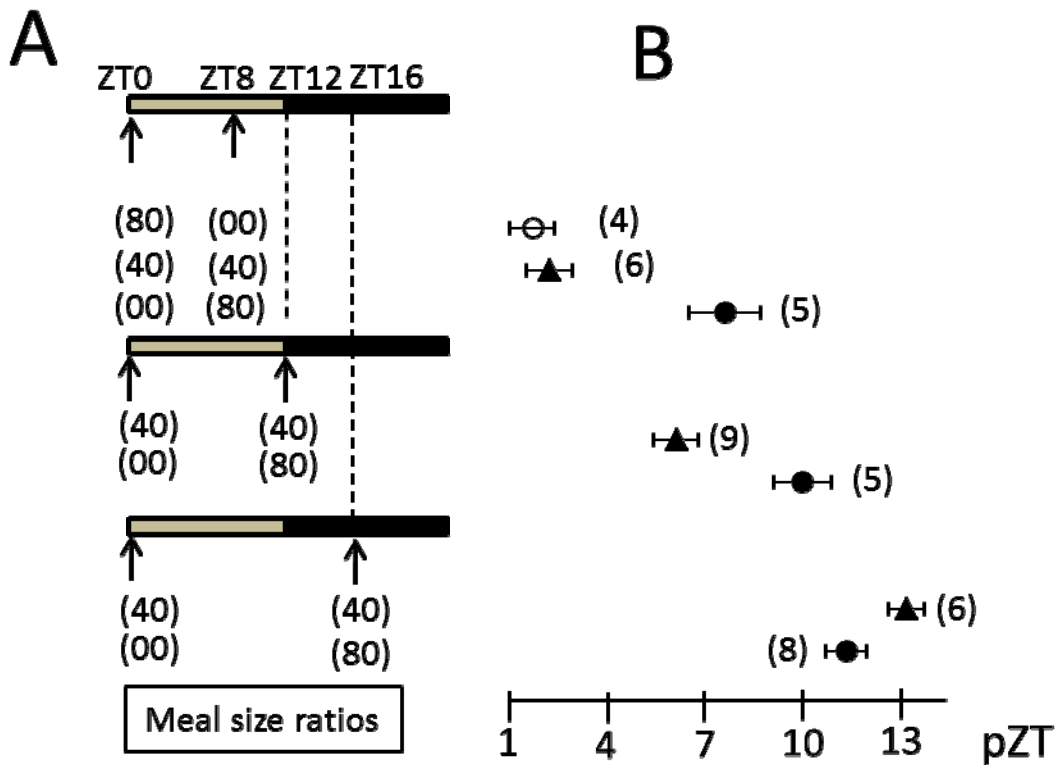


Fig.46 MBH 損傷マウスにおける、1 日 2 食の RF(ZT0/ZT8、ZT0/ZT12、ZT0/ZT16)により誘発された肝臓の生物発光発現リズムの同調に対する絶食間隔の効果

A:1 日 2 食の RF 処置プロトコル。*Per2::luciferase* ノックインマウスは、RF スケジュールに 14~15 日間課してから屠殺して、肝臓の生物発光発現リズムを記録した。括弧内の数字は、固体飼料の給餌数を指す。白と灰色の水平バーは明期と暗期を表している。ツァイトゲバー時間(ZT)0 は照明を付けた時刻を表し、ZT12 は照明を消した時刻を表す。矢印はそれぞれ給餌時間を表している。B:RF 処置マウス群における肝臓の生物発光発現リズムのトレンド除去データを入力して、この発現リズムのピーク時間(ZT)を計算した。白丸(○)は食餌量比(80:00)のデータ、黒三角(▲)は(40:40)のデータ、そして黒丸(●)は(00:80)のデータを表す。括弧内の数字はマウス個体数を表す。

(6) MBH 損傷マウスにおける、RF によって誘発された肝臓の生物発光リズムの同調に対する食餌の量と絶食間隔の複合効果

MBH 損傷マウスにおいて、1 日 2 食のプロトコルによって誘発される肝臓の生物発光リズムの同調に対する食餌の量と絶食間隔の複合効果を調べるために、食餌の量と絶食間隔をそれぞれ変化させてみた。1 回目と 2 回目の食餌時間をそれぞれ ZT0 と ZT16 に固定して、各回の食餌量比を 00:80、20:60、40:40、50:30、60:20、70:10 又は 80:00 にと変化させた (Fig.47C)。Fig.47A 及び B に、食餌量比を 00:80、40:40 又は 80:00 とした RF 下のマウス群における肝臓の Per2 生物発光発現リズムの例を表す。どの群もリズム波形には差がなかった。食餌量比 20:60、40:40 及び 50:30 の群における肝臓の Per2 発現リズムの位相は、食餌量比 00:80 の群の位相と類似していたが、食餌量比 70:10 の群における肝臓の Per2 発現リズムの位相は、食餌量比 80:00 の群の位相と類似していた (Fig.47C、D)。食餌量比が 60:20 の群では、Per2 発現リズムの平均位相 ($ZT5.9 \pm 1.7$) は、ZT0 又は ZT16 に 1 日 1 食与えたマウス群の各位相の中間点に見られた。食餌量比 60:20 の群から得た各データは、図に示すように (Fig.47D)、他の実験条件に比べて標準誤差が大きかった。

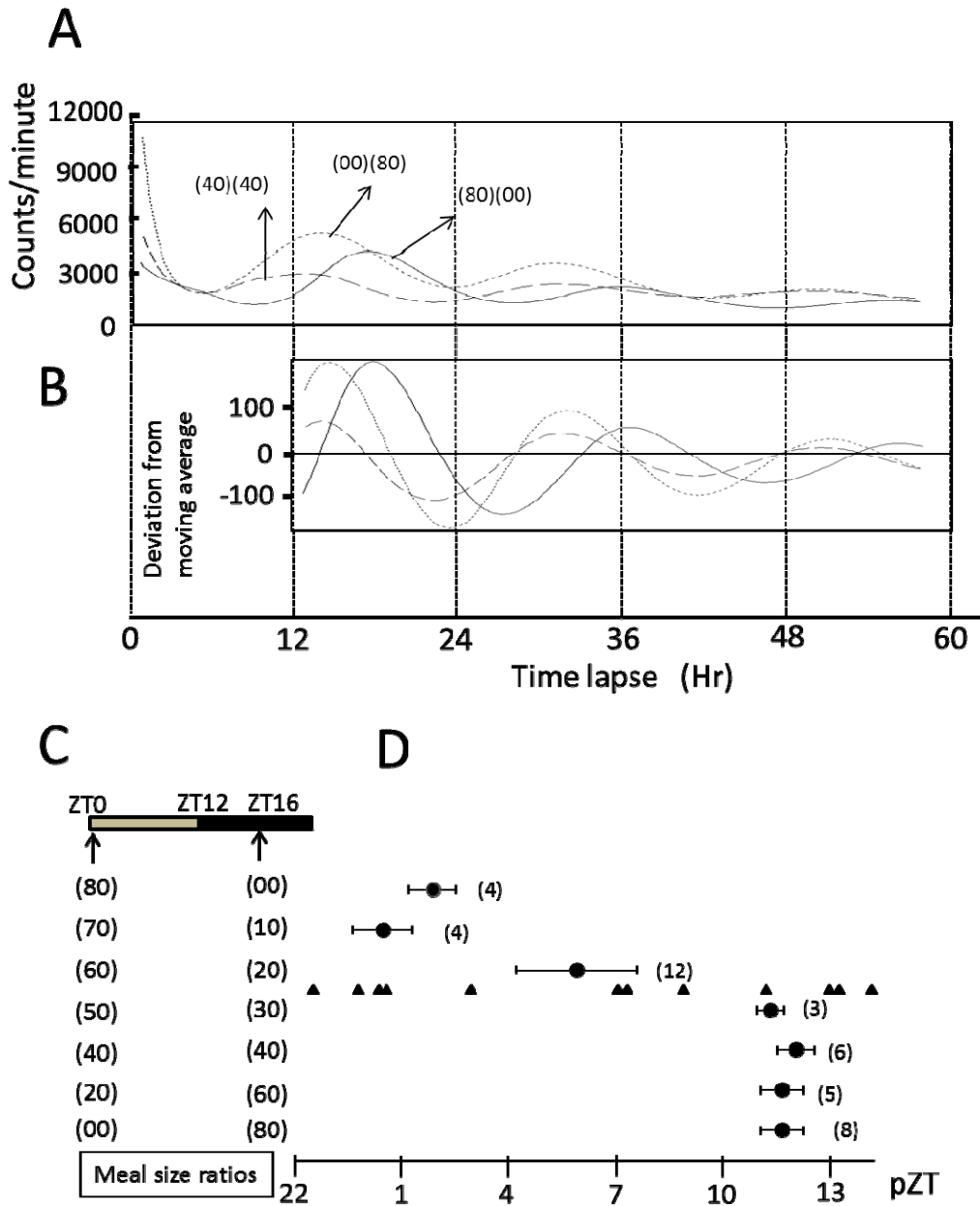


Fig.47 MBH 損傷マウスにおける、1 日 2 食の RF により誘発された肝臓の生物発光発現リズムの同調に対する絶食間隔と食餌の量との効果

A 及び B: ZT0(実線)若しくは ZT16(破線)に十分な食餌を 1 回与えた場合又は ZT0 と ZT16 に半量ずつの食事を 2 回与えた場合(断続線)に関し、肝臓の生物発光発現リズムの代表的な生データ例(A)及びトレンド除去データ例(B)を得た。C: RF 処置における絶食間隔のプロトコル。Per2::luciferase ノックインマウスは、RF スケジュールに 14~15 日間課してから屠殺して、肝臓の生物発光発現リズムを記録した。括弧内の数字は、固体飼料の給餌数を指す。灰色と黒の水平バーは、MBH 損傷マウスにおける明期と暗期を表している。ツァイトゲバー時間(ZT)0 は照明を付けた時刻を表し、ZT12 は照明を消した時刻を表す。矢印はそれぞれ給餌時間を表している。D: RF 処置マウス群における肝臓の生物発光発現リズムの実験データ及びトレンド除去データを入力して、このリズムのピーク

時間(ZT)を計算した。括弧内の数字はマウス個体数を表す。12 個の小さな三角(▲)は、1 日 2 食(ZT0:ZT16 に給餌量比 60:20)の RF スケジュール下のマウスをそれぞれ表す。

(7) MBH 損傷マウスの肝臓における、食餌によって誘発された Per2、Dec1 及び Bmal1mRNA の発現増大に対する 8 時間又は 16 時間の絶食間隔効果

24 時間絶食させた後で再給餌させると、肝臓での Per2、Dec1 及び Bmal1 遺伝子の発現が増大すると報告されている(Kawamoto *et.al*, 2006; Kobayashi *et.al*, 2004)。短い絶食間隔よりも長い絶食間隔の後の摂餌の方が肝臓の生物発光発現リズムの位相に影響を及ぼすという機序を解明するために、絶食間隔が 16 時間:8 時間の 1 日 2 食の条件下で 16 時間絶食後又は 8 時間絶食後それぞれの肝臓の Per2、Dec1 及び Bmal1 遺伝子発現の増加程度を調べた(Fig.48A)。自由摂餌条件と比べて、8 時間及び 16 時間絶食した群はいずれも、Per2、Dec1 及び Bmal1 遺伝子発現が減少した(Fig.48B)。16 時間絶食後の再給餌は、8 時間絶食後の再給餌と比べて、Per2(Fisher の PLSD 検定によれば、 $P < 0.01$)、Dec1($P > 0.05$)及び Bmal1($P < 0.05$)遺伝子の発現をそれぞれかなり増大させた(Fig.48B)。

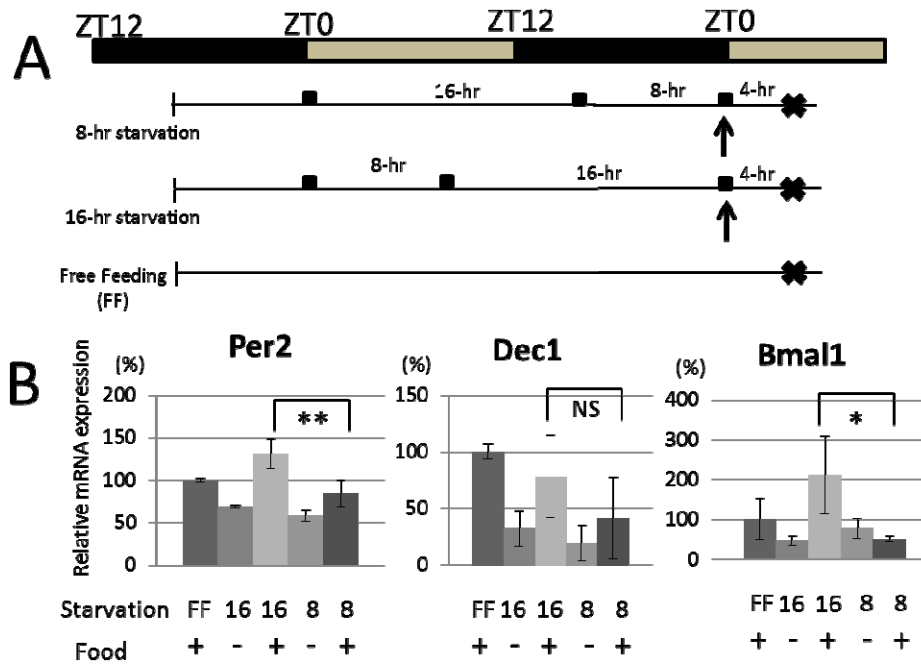


Fig.48 MBH 損傷マウスの肝臓における、食餌によって誘発された Per2、Dec1 及び Bmal1 mRNA の発現増大に対する 8 時間又は 16 時間の絶食間隔効果

A:実験プロトコル。本実験では、ZT0とZT8 又はZT0 とZT16 に固形飼料を40 粒ずつ与えた。Per2::luciferase ノックインマウスは、RF スケジュールに14~15 日間課した後、最後の摂餌(矢印)から4 時間後に屠殺した。自由摂餌マウス群も対照群として ZT4 に屠殺した。灰色と黒の水平バーは、MBH 損傷マウスにおける明期と暗期をそれぞれ表している。ツァイトゲバー時間(ZT)0 は照明を付けた時刻を表し、ZT12 は照明を消した時刻を表す。小さな黒四角(■)は、給餌時間を表している。B:8 時間又は 16 時間の絶食させてから摂餌させた後の肝臓での時計遺伝子発現。*8 時間絶食させたマウス群の P < 0.05、**8 時間絶食させたマウス群の P < 0.01; Fisher の PLSD 検定。ターゲット遺伝子の PCR 産物の相対発現量はβ-アクチンの相対発現量で標準化し、自由摂餌マウス群の遺伝子発現量を100% とした。

【4】 小括

無傷マウス群と MBH 損傷マウス群において、1 日 2 食の RF スケジュール下の Per2::luciferase ノックインマウスの肝臓の生物発光発現リズムが双峰型ではなく単峰型であることを見出した。これまでは、1 日 2 食又は 1 日 3 食の方法を適用して、複数の FEO メーカーが食餌時間の追跡に利用されるかどうかを調べた。食餌間隔を 5 時間以上空けて 1 日 2 食与えると、ラットは FAA を発現し、その FAA の発現がいずれも、食餌間隔よりも概日的なタイミングで特徴付けられることから、FAA が発現するときには少なくとも 2 つの FEO が同伴すると考えられる (Davidson *et.al*, 2003; Mistlberger, 2009; Stephan, 1989; Stephan, 1989)。また一方で、Davidson らによれば、1 日 2 食の RF 方法下の Per2::luciferase トランスジェニックラットの肝臓の生物発光発現リズムのピークは 1 つであるとも報告されている。そのため、Per1 及び Per2 遺伝子の発現は、双峰型給餌パターンで特定できない場合がある。振動体が 1 つ現れる理由が、1 日 2 食の RF 方法によって肝臓内の 2 つの振動体が密に相互結合した結果なのか又は同調振動体と体内時計のアドバイザーとの組み合わせのせいなのかは把握しきれない。あるいは、肝臓時計は振動体を 1 つしか持っておらず、この振動体の位相が、1 日 2 食の RF 条件下で RF 方法毎の同調強度の組み合わせで決まるのかもしれない。

過去の研究では、Davidson らにより、ZT6/ZT18 に 1 日 2 食与える方法下での生物発光のピークは、ZT18 に 1 日 1 食与える場合のピークと一致するが、ZT6 に 1 日 1 食与える場合とは異なることが報告されている。これに対し、本研究結果からは、ZT6 と ZT18 に同量の飼料を 1 日 2 回与えたマウス群の肝臓時計の位相は、ZT6 又は ZT18 に 1 日 1 食与えたマウス群の各位相のちょうど中間点にあることが分かる。本研究データと Davidson らのデータとが矛盾する理由は、実験プロトコルの違いによるものではないかと思われる。各給餌時間に全く同量の飼料を与えたが、Davidson らは、食餌を与える度に摂餌時間の長さを調整した。そのため、ラットは ZT6 よりも ZT18 の摂餌量が多いかもしれない。というのも、本実験によれば、1 日 2 食の方法では ZT6 に 2 時間摂餌したマウスよりも ZT18 に 2 時間摂餌したマウスの方が、摂餌量が多いことが分かり、またその結果、ZT18 に 1 日 1 食与えた RF 群の肝臓時計の位相と同じになったためである。その一方で、本実験結果からは、無傷マウス群では、ZT0/ZT12 に 1 日 2 食の方法下の生物発光発現リズムのピークが、ZT12 に 1 日 1 食与えたマウス群又は自由摂餌マウス群のピークと一致していることが明らかとなった。そのため、ZT0/ZT12 に 1 日 2 食のデータは、ZT6/ZT18 に 1 日 2 食のデータとかなり相違していた。無傷マウスは通常、日中(総摂餌量の 20%)よりも夜間に摂餌する(総摂餌量の 80%)。つまり、ZT0 と ZT12

に 1 日 2 食与える給餌パターンは自由摂餌群と比較的類似しているため、自由摂餌群の肝臓時計の位相と同様となった。面白いことに、ZT0 及び ZT12 付近で光パルスを 1 時間与えるスケルトン光周期法は、皮膚に単峰型ピークの Per1 及び Per2 遺伝子発現リズムを生じさせ、また、スケルトン光周期法が引き起こす体内時計の位相は、標準的な LD サイクルの結果とほぼ同じであった(Oishi *et.al*, 2002)。この論文結果は、自由摂餌パラダイム群と同様の単峰型ピークの肝臓の生物発光発現リズムを示したの本実験結果を強く裏付けている。今回の研究において、肝臓時計の位相差と 1 日 1 食のスケジュール下での給餌時間 ZT に明白な関係があることを見出した。したがって、1 日 1 食の RF 群の肝臓時計の位相は、各 RF 処置の時刻によって決まる。しかしながら、本実験条件によれば、肝臓組織を採取するためのマウスの屠殺時刻が肝臓時計の位相に影響を及ぼしたわけではなかった。

一方、ZT6 に食餌を与えると、ZT6/ZT18 に 1 日 2 食与えた場合と同調強度と、ZT6 又は ZT18 に 1 日 1 食与える RF で得られる各位相の中間のピーク位相とが得られる可能性がある。BMH 損傷マウスを 1 日 2 食のスケジュールに課した場合、BMH 損傷マウスは概日摂餌パターンを持たないので、肝臓時計のピーク位相は、各 ZT での食餌の量によって同調する強度の合計で決定された。

次に重要な本研究成果は、1 日 2 食によって同調される肝臓時計の位相が、食餌の量と給餌間隔との組み合わせに依存していることである。不規則な自発運動活性(Stokkan *et.al*, 2001)と摂餌活動(本実験データ)とを有する MBH 損傷マウスを利用したところ、肝臓時計の位相が、1 日 2 食の条件下では各回の食餌の量と明らかに関連していた。Hara らは以前、食餌量に依存するマウス肝臓時計の位相前進が、給餌によって生じることを報告した。本研究では、実験プロトコルが以前のものとは違うにも関わらず、肝臓時計の位相変動が食餌の量に関連していることを再確認した。肝臓時計の他に、以前の研究では、食餌が、その量に依存してラットの FAA リズムに位相変動をもたらす可能性を示したが、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変動は生じなかった(Stephan,1997 ; Stephan and Becker, 1989; Stephan and Davidson, 1998)。以上のことから、今回の実験結果からは、特に、1 日数回食餌を与える条件において肝臓時計の位相をリセットするには食餌の量が重要な因子であることが分かる。

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時計の位相と類似していた。そのため、「絶食後に最初に摂る」食餌が肝臓時計をリセットするのに有効な信号であることから、この効果を「朝食効果」と呼んだ。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。最近では、マウス肝臓内の Per2、Dec1 及び Bmal1 遺伝子発現が絶食によって抑制できることや、絶食によって誘発される遺伝子発現の変化を再給餌が抑制することが報告されている(Kawamoto *et.al*, 2006; Kobayashi, 2004)。そこで、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てみた。これら遺伝子の発現は、16 時間絶食後に増大したが、8 時間絶食後にはそれほど増加しなかった。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、マウスに飼料を 30mg/10g BW 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した。最近の研究において、食物による位相前進効果が、血中グルコース濃度と直接関連していることを明らかにしている(Hirao *et.al*, 2009)。グルコース処理した Rat-1 繊維芽細胞によれば、Per1 及び Per2 を抑制することによって体内時計をリセットすることが分かっている(Hirota *et.al*, 2002)。本研究では、24 時間絶食後ではなく、48 時間絶食後の ZT6 に摂餌すると、肝臓時計の位相前進が生じた。これら実験結果から、食物又はグルコースによる遺伝子発現の変化が同調の要因である可能性がある。そこで、次回の実験では、AMPK が CRY のリン酸化反応と分解によって体内時計を調整することから(Lamia *et.al*, 2009)、16 時間:8 時間の絶食間隔条件下での AMPK 活性を調べようと思う。

食餌の量と絶食間隔を同時に変えた場合、肝臓時計の位相は、これら 2 つの要因の組み合わせに依存した。本実験結果から、「朝食効果」は、朝食の量が「夕食」の量よりも少なすぎると現れないと考えられる。2 つの要因(食餌の量と絶食間隔)の間の競争関係が強いと、例えば ZT0:ZT16 に 60 粒:20 粒の食餌を与えると、各マウスの肝臓時計の位相に大きな個体差が見られた。このことから、マウスそれぞれの肝臓体内時間の位相は、食餌の量と絶食という 2 つの要因の微妙な相互作用で管理されていると考えられる。

肝臓の体内時計が、Cyp7a1 及び HMG-CoA レダクターゼ等の時計制御遺伝子を介してコレステロール代謝に寄与することは周知である(Jurevics *et.al*, 2000; Kudo *et.al*, 2008; Noshiro *et.al*, 2007; Wooton-Kee *et.al*, 2010)。前記酵素活性の概日リズムは、薬物代謝酵素によっても発現する(Ohdo, 2010)。また、時計遺伝子の一つである Bmal1 遺伝子の肝臓特異的ノックアウトも、脂質代謝異常の原因であった(Lamia *et.al*, 2008)。そのため、肝臓の体内時計システムは、肝臓の体内時計系の機能にとって重要なものである。本実験では、肝臓体内時間の位相が、SCN 機能を介した明暗サイクルだけでなく、複数回の給餌サイクルによっても抑制されることも分かった。本実験結果と前記論文をまとめると、肝臓の体内時計機能は、動物でもヒト

でも食習慣に左右され得ると考えられる。

本研究において、RF 条件下で、自由摂餌の場合の食餌量の 69～73% を与えた。この食餌条件下では、無傷マウス群及び MBH 損傷マウス群の体重減少はいずれも初期体重の 10% 未満であった。低カロリー食餌条件(自由摂餌の 65～75%)は初期体重減少(最初の 10 日～20 日間に 10～20% の体重減少)を引き起こすと報告されている(Challet, 1998; Mendoza *et.al*, 2005)。そのため、本実験での給餌プロトコルは、これまでの研究でも説明した軽度の低カロリー給餌条件とした。低カロリーの食餌は、行動や SCN 時計機能の位相前進の原因となる。ただし、主要実験では、活動や摂餌リズム等の SCN 出力機能を失った MBH 損傷マウスを用いたので、本研究では低カロリーの食餌の影響があまり現れなかったのかもしれない。

要するに、複数回に分けて制限給餌する条件下では、肝臓時計の位相は、食餌の量、絶食間隔及び時刻といった要因の組み合わせによって決まる。人類のライフスタイルを考えると、適切な量の朝食は、1 日 2 食あるいは 1 日 3 食の条件下で肝臓時計の位相位置を維持するのに大切なことがある。逆に、異常な食習慣は、肝臓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 総括

(1)効果的な栄養素の組み合わせ

体内時計は 24 時間よりずれているため、ヒトを含む動物では、24 時間に合わせるために、外界の光刺激に合わせて体内時計をリセットしている。ところで、最近の研究では、繰り返しの給餌刺激で形成される末梢臓器の体内時計リセット効果は、光刺激による視交叉上核を介さない別のシステムによることが明らかになってきた(Shibata *et.al*, 2010)。これまで夜行性であるマウスに日中に摂餌させた場合、肝臓の体内時計の位相前進作用は食餌量および摂餌回数に依存しており、食餌内容のグルセミックインデックス値(血糖上昇指数)が高いほどリセットしやすいことがわかった。また、グルコース単独では肝臓時計のリセット効果は弱く、グルコースとカゼインなど、複数の栄養素の組み合わせの方が効果的であり、合成飼料である AIN-93M が一番効果的である。すなわちバランスの良い食餌はリセット効果が大であることが分かった。

さらに、魚油と DHA/EPA を含む餌は、肝臓時計の RF 誘発性位相変動作用を強化し、大豆油のみの投与は、肝臓時計に位相変動作用を引き起こさないことも明らかにした。

有意な位相後退作用を示した魚油は 20-30%の DHA/EPA を含むのに対し、位相変動を示さない大豆油はそれを含まないことから、RF 誘発性活動リズムには DHA/EPA が重要であり、特に DHA の比率が重要になってくると考えられる。また、魚油および大豆油に溶解した DHA/EPA を含む餌の給餌後に回腸下部、大腸上部に達し、また 120 分後に血中インシュリン濃度の上昇が確認されたことから魚油(DHA/EPA)が肝臓時計において RF 誘発性位相変動を起こす原因にインシュリン分泌が関わっていることもわかった。このように、魚油または DHA/EPA の給餌によって回腸と大腸で GPR120 レセプターを介する GLP-1 分泌を通してグルコース濃度が上昇、さらにインシュリン分泌を強化することで肝臓時計の同調機構が確立することが示唆された。

このことから、インシュリンを上昇させるような食餌についても時計の位相変動に大きく関わるということがわかる。今回、魚油のような脂質に着目したが、今後はタンパク質などにも着目して実験していきたい。

(2)長い絶食時間後の食餌の体内時計リセット効果

マウスは、一般的には夜間に餌を食べ続けるが、よく観察すると、夜間の始め(ヒトの朝食に相当)に多く食べ、また夜間の終わり頃(ヒトの夕食)に少し多めに食べる。そこで、ヒトの食生活を意識し、マウスに1日2回の給餌を行うことにした。まず、1日1回の食餌制限を、1日を8等分して3時間おきに行ったところ、設定した給餌時刻依存的に肝臓の時計遺伝子がリセットされた。すなわち、1日1回の食餌はどの時間でも時計をリセットさせる能力を有することが分かった。1日2食にすると、例えば真昼(ヒトの夜食)と真夜中(ヒトの昼食)に設定すると、位相の綱引きがおこり、中間値に(ヒトの朝食)落ち着く。また、例えば夕方(ヒトの朝食)と朝方(ヒトの夕食)に設定すると、位相の綱引きはあまり起こらず、自由摂餌の場合と類似した時刻に時計がリセットされていた。すなわち、1日2食でも朝夕の食事は自然な食事と類似していることが分かった。次に、1日2食で給餌間隔を変えて(16時間:8時間)実験を行った。この場合16時間空けて食べる食餌を朝食とし、8時間空けて食べる食餌を夕食とした。実際、ヒトの場合も朝食は夕食に比較し、長い絶食の後に食べる(breakfast; 絶食を断つ最初の食事の意味)。1日2食で、食餌量が同じ場合、短い絶食を空けた食餌(8時間絶食、夕食に相当)よりも長い絶食を空けた食餌(16時間絶食、朝食に相当)にリセットされやすいことが分かった(Shibata *et.al*, 2010; Hirao *et.al*, 2010)。少し朝食のウエイトが少なくとも朝食側にリセットしたが、朝食のウエイトがさらに低くなると、今度は夕食側にリセットされた。

今回の実験結果と先ほどの食事の取り方と肥満の研究とを合わせて考えると、朝食にウエイトを置いた食餌は体内時計のリセットの観点と、肥満防止の観点から、是非実行したい食餌行動であると言える。

(3)おわりに

現代は、インターネットの発達やコンビニエンスストアの普及で、24時間社会が構築されている。また、同時に飽食の時代と謳われるほどに、我々の身近にはたくさんの食べ物や飲みものが溢れているため、決まった時間に食事をとるという習慣が作られにくい状態にあるともいえる。人は太古の昔から、お天道様とともに起き、夕方早くに休んでいた。もちろん昔には戻れないが、このような24時間社会にどっぷりつかっていると、体の健康は蝕まれるわけで、実際シフトワーカーなどでは、肥満が起こりやすく、癌の発症率[?]が高まり、不眠・うつ症状を呈する人が増えている。食事や運動などで規則正しい生活リズムを整えることが一番大事であり、生体リズムが乱れていると、時間薬理・時間栄養なども実践しにくくなる。これを機会に自分の生活リズムを見直してみたいものである。

参考文献

- 1) Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, et al. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci.* 22:350-356.
- 2) Arora S, Anubhuti (2006) Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—a review. *Neuropeptides* 40: 375–401.
- 3) Bechtold DA (2008) Energy-responsive timekeeping. *J Genet.* 7:447-458.
- 4) Boulos Z, Terman M (1980) Food availability and daily biological rhythms. *Neurosci Biobehav Rev.* 4:119-131.
- 5) Briscoe CP, et al. (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem.* 278:11303-11311.
- 6) Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science.* 330:379-385.
- 7) Calder PC, Yaqoob P (2009) Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med.* 121:148-157.
- 8) Challet E, Solberg LC, Turek FW (1998) Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol.* 274:R1751-1761.
- 9) Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, et al. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950-2961.
- 10) Davidson AJ, Castanon-Cervantes O, Leise TL, Molyneux PC (2009) Harrington ME. Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *Eur J Neurosci.* 29:171-180.
- 11) Davidson AJ, Castañón-Cervantes O, Stephan FK (2004) Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity. *Liver Int.*24:179-186. Review.
- 12) Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M (2003) Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system ? *Genes Brain Behav.* 2:32-39.
- 13) Dockray GJ (2009) Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul Pept.* In press.
- 14) Englyst HN, Trowell H, Southgate DA, Cummings JH (1987) Dietary fiber and resistant starch. *Am J Clin Nutr.* 46:873-874.
- 15) Feillet CA, Ripperger JA, Magnone MC, Dulloo A, Albrecht U, et al. (2006) Lack of food anticipation in *Per2* mutant mice. *Curr Biol.* 16:2016-2022.
- 16) Frost G, Dornhorst A (2000) The relevance of the glycaemic index to our understanding of dietary carbohydrates. *Diabet Med.* 17:336-345 Review.
- 17) Froy O (2009) Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr Rev.*

- 31:1-24. Review.
- 18) Gooley JJ, Schomer A, Saper CB (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci.* 9:398-407.
 - 19) Green GM, Taguchi S, Friestman J, Chey WY, Liddle RA (1989) Plasma secretin, CCK, and pancreatic secretion in response to dietary fat in the rat. *Am J Physiol* 256: G1016–1021.
 - 20) Greig NH, et al. (1999) Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia.* 42:45-50.
 - 21) Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, et al. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells.* 6:269-278.
 - 22) Hayasaka N, Yaita T, Kuwaki T, Honma S, Honma K, et al. (2007) Optimization of dosing schedule of daily inhalant dexamethasone to minimize phase shifting of clock gene expression rhythm in the lungs of the asthma mouse model. *Endocrinology.* 148(7):3316-3326.
 - 23) Hirasawa A, et al. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR12. *Nat Med.* 11:90-94.
 - 24) Hirota T, et al. (2002) Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem.* 277:44244-44251.
 - 25) Hoogerwerf WA (2009) Role of biological rhythms in gastrointestinal health and disease. *Rev Endocr Metab Disord.* 10:293-300, Review.
 - 26) Itoh Y (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 422:173-176.
 - 27) Jurevics H, Hostettler J, Barrett C, Morell P, Toews AD (2000) Diurnal and dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase. *J Lipid Res.* 41:1048-1054.
 - 28) Kato H, Saito M, Shimazu T (1984) Attenuated blood corticosterone rhythm in rats with jejunal resection. *Life Sci.* 34:331-335.
 - 29) Kawamoto T, et al. (2006) Effects of fasting and re-feeding on the expression of Dec1, Per1, and other clock-related genes. *J Biochem.* 140:401-408.
 - 30) Kebede M, et al. (2008) The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes.* 57:2432-2437.
 - 31) Kidd PM (2007) Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev.* 12:207-227.
 - 32) King DP, Takahashi JS (2000) Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu*

Rev Neurosci. 3:713-742 Review.

- 33) Kobayashi H, Oishi K, Hanai S, Ishida N. Kobayashi H, Oishi K, Hanai S, Ishida N (2004) Effect of feeding on peripheral circadian rhythms and behaviour in mammals. *Genes Cells*. 9: 857-864.
- 34) Krieger DT (1972) Circadian corticosteroid periodicity: critical period for abolition by neonatal injection of corticosteroid. *Science*. 78:1205-1207.
- 35) Kudo T, Kawashima M, Tamagawa T, Shibata S (2008) Clock mutation facilitates accumulation of cholesterol in the liver of mice fed a cholesterol and/or cholic acid diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 294:E120-130.
- 36) Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM (2009) AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*. 326:437-440.
- 37) Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:15172-15177.
- 38) Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schütz G, Schibler U (2001) Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J*. 20:7128-7136.
- 39) Liou AP, et al. (2010) The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology*. 140:903-912.
- 40) Liu X, Ogawa H, Kishida T, Ebihara K (2009) The effect of high-amylose cornstarch on lipid metabolism in OVX rats is affected by fructose feeding. *J Nutr Biochem*. 21:89-97.
- 41) Lundberg K, Josefsson A, Nordin C (2007) Diurnal and seasonal variation of cholecystokinin peptides in humans. *Neuropeptides* 41: 59–63.
- 42) Manerba A, Vizzardi E, Metra M, Dei Cas L (2010) n-3 PUFAs and cardiovascular disease prevention. *Future Cardiol*. 6:343-350.
- 43) Meerlo P, van den Hoofdakker RH, Koolhaas JM, Daan S (1997) Stress-induced changes in circadian rhythms of body temperature and activity in rats are not
- 44) caused by pacemaker changes. *J Biol Rhythms* 12: 80–92.
- 45) Mendoza J, Drevet K, Pévet P, Challet E (2008) Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J Neuroendocrinol*. 20:251-260.
- 46) Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E (2005) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci*. 25:1514-1522.
- 47) Miller JB, Pang E, Bramall L (1992) Rice: a high or low glycemic index food? *Am J Clin*

- Nutr. 56:1034-1036.
- 48) Mistlberger RE (2009) Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci.* 30:1718-1729.
 - 49) Mistlberger RE (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 8:171-195.
 - 50) Mistlberger RE (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 8: 171–195.
 - 51) Morishita M, Tanaka T, Shida T, Takayama K (2008) Usefulness of colon targeted DHA and EPA as novel diabetes medications that promote intrinsic GLP-1 secretion. *J Control Release.* 132:99-104.
 - 52) Moriya T, Aida R, Kudo T, Akiyama M, Doi M, et al. (2009) Differential effect of acute feeding and restricted feeding on clock gene expression in mouse. *Eur. J. Neurosci.* 29: 1447-1460.
 - 53) Noshiro M, Usui E, Kawamoto T, Kubo H, Fujimoto K, Furukawa M, Honma S, Makishima M, Honma K, Kato Y (2007) Multiple mechanisms regulate circadian expression of the gene for cholesterol 7 α -hydroxylase (*Cyp7a*), a key enzyme in hepatic bile acid biosynthesis. *J Biol Rhythms.* 22:299-311.
 - 54) Oh DY, et al. (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.* 142:687-698.
 - 55) Ohdo S (2010) Chronopharmacology and chronotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 62: 859-875.
 - 56) Ohta H, Xu S, Moriya T, Iigo M, Watanabe T, et al. (2008) Maternal feeding controls fetal biological clock. *PLoS ONE* 3: e2601.
 - 57) Oishi K, Fukui H, Sakamoto K, Miyazaki K, Kobayashi H, Ishida N (2002) Differential expressions of *mPer1* and *mPer2* mRNAs under a skeleton photoperiod and a complete light-dark cycle. *Brain Res Mol Brain Res.* 109:11-17.
 - 58) Ouellet M, et al. (2009) Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int.* 55:476-482.
 - 59) Saito M, Kato H, Suda M, Yugari Y (1981) Parenteral feeding abolishes the circadian adrenocortical rhythm in rats. *Experientia.* 37:754-755.
 - 60) Shibata S, Tahara Y, Hirao A (2010) The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 62:918-928.
 - 61) Shimazoe T, et al. (2008) Cholecystokinin-A receptors regulate photic input pathways to the circadian clock. *FASEB J.* 22:1479-1490.
 - 62) Stephan FK (1997) Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian

- oscillator. *Physiol Behav.* 62:995-1002.
- 63) Stephan FK (2002) The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms.* 17:284-292 Review.
 - 64) Stephan FK, Becker G (1989) Entrainment of anticipatory activity to various durations of food access. *Physiol Behav.* 46:731-741.
 - 65) Stephan FK, Davidson AJ (1998) Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock. *Physiol Behav.* 65:277-288.
 - 66) Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 9:1583-1586.
 - 67) Stephan FK (1989) Entrainment of activity to multiple feeding times in rats with suprachiasmatic lesions. *Physiol Behav.* 46:489-497.
 - 68) Stephan, FK (1989) Forced dissociation of activity entrained to T cycles of food access in rats with suprachiasmatic lesions. *J. Biol. Rhythms.* 4: 467–479.
 - 69) Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science.* 291:490-493.
 - 70) Suh HN, Huong HT, Song CH, Lee JH, Han HJ (2008) Linoleic acid stimulates gluconeogenesis via Ca²⁺/PLC, cPLA2, and PPAR pathways through GPR40 in primary cultured chicken hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295:C1518-1527.
 - 71) Tahara Y, Hirao A, Moriya T, Kudo T, Shibata S (2010) Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver Per2 expression in Per2::luc mice. *J Biol Rhythms.* 25:9-18.
 - 72) Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, Hirao A, Shibata S (2011) Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erba with shifts in the liver clock. *J Biol Rhythms.* 26:230-240.
 - 73) Takashima N, et al. (2006) Gq/11-induced intracellular calcium mobilization mediates Per2 acute induction in Rat-1 fibroblasts. *Genes Cell.* 11:1039-1049.
 - 74) Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O (2011) Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 32:543-550.
 - 75) Tanaka T, et al. (2008) Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 377:523-527.
 - 76) Teboul M, Gréchez-Cassiau A, Guillaumond F, Delaunay F (2009) How nuclear receptors tell time. *J Appl Physiol.* 107:1965-1971.
 - 77) Terazono H, et al. (2003) Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver.

Proc Natl Acad Sci USA. 100:6795-6800.

- 78) Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, et al. (2001) 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.* 13:1190-1196.
- 79) Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C (2010) Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev.* 68:280-289.
- 80) Wooton-Kee CR, Coy DJ, Athipozhy AT, Zhao T, Jones BR, Vore M (2010) Mechanisms for increased expression of cholesterol 7 α -hydroxylase (Cyp7a1) in lactating rats. *Hepatology.* 51:277-285.
- 81) Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, et al. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science.* 88:682-685.
- 82) Yang X, Lamia KA, Evans RM (2007) Nuclear receptors, metabolism, and the circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 72:387-394.
- 83) Yang ZH, Miyahara H, Takemura S, Hatanaka A (2011) Dietary saury oil reduces hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic KKAY mice and in diet-induced obese C57BL/6J mice by altering gene expression. *Lipids.* 46(5):425-434.
- 84) Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 5339-5346.
- 85) Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M (2005) Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms* 20: 500–512.
- 86) Young ME, Wilson CR, Razeghi P, Guthrie PH, Taegtmeier H. (2002) Alterations of the circadian clock in the heart by streptozotocin-induced diabetes. *J Mol Cell Cardiol.* 4:223-231.
- 87) Yurko-Mauro K (2010) Cognitive and cardiovascular benefits of docosahexaenoic acid in aging and cognitive decline. *Curr Alzheimer Res.* 7:190-196.

謝辞

本稿執筆にあたり、詳細なコメントと洞察に富む助言を与えて頂き、温かいご指導、ご助言をいただいた柴田重信教授、副査を引き受けてくださった井上宏子教授、岡野俊行教授に厚く御礼申し上げます。

また、本論文を手がけるに当たり、実験の際や困難に陥りそうな時に、快く協力、手助けしてくださった田原優君、古谷直樹君、平尾美朱帆さん、坪井琢磨君、長浜敬樹君、糸川未紗さん、大津定治君、池田祐子さんはじめ、早稲田大学先進理工学研究科、柴田研究室の皆さんにも心からの謝意を表します。

さらに、実験データの取得のために惜しみないご協力をいただきました、早稲田大学人間科学研究科 木村一郎名誉教授、山形大学農学部 五十嵐喜治名誉教授、株式会社 ニッスイ 楊志宏様、月島食品株式会社 田中博義様、小島浩一様にもこの場を借りて心より御礼申し上げます。

なお、本研究は早稲田大学 125 周年奨学金の助成および独立行政法人日本学術振興会の助成を受けています。

最後にどんな境地に置かれた時も、いつも温かい励ましを送り続けてくれた祖父母、両親、弟をはじめとする家族、親族に心から感謝し、犠牲になってしまったマウスの冥福を祈るとともに、本研究の更なる発展に努めることを誓い謝辞とさせていただきます。

研究業績

主論文

- [1] **Hirao A**, Tahara Y, Kimura I, Shibata S, A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock., 2009/9, PLoS One. 4:e6909
- [2] **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., 2010/9, Am J. Physiology 299(5):G1045-53

副論文

- [1] Shibata S, Tahara Y, **Hirao A**, The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs., 2009, Adv Drug Deliv Rev. review
- [2] ○○Shibata S, **Hirao A**, Tahara Y., Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm, 2010, Sleep and Biological Rhythms 8, 18-27. review
- [3] 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., 2010/6, J Biol Rhythms. 25:9-18
- [4] Shibata S, **Hirao A**, Basic and applied science of chrononutrition., 2011, Nihon Yakurigaku Zasshi. 137(3):110-4. Review.
- [5] Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, **Akiko H**, Shibata S., Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erb α with shifts in the liver clock., 2011/6, J Biol Rhythms. 26(3):230-40.
- [6] 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., 2011/9, J Med Chem. 22;54(18):6295-304
- [7] **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, 2012/11, Food and Nutrition Sciences (FNS)
- [8] 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. 1365-2133.2012
- [9] 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
- [10] 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

- [11] 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.

総説(国際雑誌)

- [1] Shibata S, Tahara Y, **Hirao A**, The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs., Adv Drug Deliv Rev.
- [2] Shibata S, **Hirao A**, Tahara Y., Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm., Sleep and Biological Rhythms, 8, 18-27

総説(国内雑誌)

- [1] **平尾彰子**, ~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
- [2] **平尾彰子**, 「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
- [3] **平尾彰子**, 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
- [4] Shibata S, **Hirao A**., Basic and applied science of chrononutrition., 2011, Nihon Yakurigaku Zasshi. 137(3):110-4. Review.
- [5] 柴田重信, **平尾彰子**「時間栄養学とはなにか」日本薬理学雑誌、金芳堂、137,109-114, 2011
- [6] Shibata S, **Hirao A**, Tahara Y., Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm, 2010, Sleep and Biological Rhythms 8, 18-27. review
- [7] **平尾彰子**, 柴田重信, 時計遺伝子と栄養, 2010, 脳21,金芳堂,VOL13-4
- [8] Shibata S, Tahara Y, **Hirao A**., The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs., 2009, Adv Drug Deliv Rev. review
- [9] **平尾彰子**, 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

書籍

- [1] 平尾彰子、「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
- [2] 平尾彰子、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、CMC出版

賞罰

- [1] 2011年度早稲田大学小野梓学術賞 受賞, 2012
- [2] 第10回 杉田玄白賞 受賞(応募22件)史上最年少受賞, 2011
- [3] 2011年度 ネスレ栄養科学会議 論文賞 受賞, 2011
- [4] 早稲田大学125周年奨学生として表彰(一位通過), 2010
- [5] XI. Congress of European Biological Rhythm Society の旅費補助者表彰, 2009

招待講演

《国際学会》

- [1] Akiko Hiraq, Breakfast is important for circadian rhythms ?, 2012, Autumn Seminar for Introduction of Research Collaborations, ZAO(Yamagata)

《国内学会》

- [1] 平尾彰子、時間栄養学から肥満予防を考える、第26回いのちの科学フォーラム市民公開講座「体内時計と健康」、2012、京都大学医学部芝蘭会館稲森ホール(京都)
- [2] 平尾彰子、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)
- [3] 平尾彰子、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)
- [4] 平尾彰子、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)
- [5] 平尾彰子、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)
- [6] 平尾彰子、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)

[7] 平尾彰子、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)

学会発表(国際学会) (一般公演;口頭)

[1] Hirao A,「Food-induced entrainment of mouse circadian liver clock: effect of feeding volume and feeding time」, 2008/12, 『Shanghai Jiao Tong University-Waseda University Joint Symposium 2009』, 36,Shanghai,China

学会発表(国際学会)(一般公演;ポスター)

[1] Hirao A, Tahara Y, Kimura I, Shibata S,「Balanced nutrient foods with high glycemic index but not sugar alone is suitable entraining signals of mouse liver clock」, 2009/8, 『XI. Congress of the European Biological Rhythms Society』, Strasbourg, France

[2] Hirao A, Tahara Y, Nagahama H., Shibata S, 「Mouse liver clock is entrained by restricted food with balanced nutrition」, 2009/8, 『International Symposium on Biological Rhythm』, Sapporo,Japan

[3] Tahara Y, Hirao A, Moriya T, Kudo T, Shibata S, 「Light-induced but not feeding-induced entrainment of liver circadian rhythm in dorsomedial hypothalamus (DMH) lesioned mice」, 2009/8, 『International Symposium on Biological Rhythm』, Sapporo,Japan

[4] Hirao A, Nagahama H, Shimoda M, Itokawa M ,Tahara Y,Shibata S, 「Fish oil affects clock gene and clock-controlled metabolism-related gene expression in the mouse liver」, 2010/6, 『the 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology』, Copenhagen,Denmark

[5] Hirao A, Furutani N,Nagahama H, Itokawa M ,Imanishi T,Ohtsu T,Tahara Y,Shibata S, 「About the relation nature of the day-and-night difference of a blood glucose level and insulin rise of a mouse」, 2011/5, 『III World Congress of Chronobiology』, Puebla, México

[6] Tahara Y,Ohtsuka M,Fuse Y,Hirao A, Shibata S, 「Refrding After Fasting Elicits Insulin-dependent Regulation Of Per2 and Reverba with Shifts in liver clock」, 2011/5, 『III World Congress of Chronobiology』, Puebla, México

学会発表(国内学会)(一般口演;口頭)

- [1] 田原優、平尾彰子、柴田重信、「肝臓の体内時計」, 2008/9, 『2008年度霧島神経フォーラム』, 霧島
- [2] 平尾彰子、田原優、平尾美朱帆、坪井拓磨、柴田重信、「給餌によるマウス肝臓時計遺伝子発現リズムに対する餌の量とタイミングの効果」, 2009/5, 『第63回日本栄養・食糧学会大会』, 3G-08a、長崎県立大学
- [3] 田原優、平尾彰子、田中麻貴、柴田重信、「食事の量やタイミングの相違がマウスの体重、脂肪増加に及ぼす影響」, 2009/5, 『第63回日本栄養・食糧学会大会』, 3G-08a、長崎県立大学
- [4] 柴田重信、本山裕太、平尾彰子、田原優、「給餌性体内時計リズム形成における交感神経作用薬の作用」, 2009/5, 『第63回日本栄養・食糧学会大会』, 3G-08a、長崎県立大学
- [5] 平尾彰子、長浜敬樹、布施悠太、田原優、木村一郎、柴田重信、「バランスの取れた高GI食がマウス肝臓時計遺伝子に与える影響」, 2010/3, 『日本農芸化学学会 2010大会』, 東京大学駒場キャンパス(東京)
- [6] 平尾彰子、長浜敬樹、霜田愛美、糸川美紗、田原優、木村一郎、柴田重信、「マウス肝臓時計遺伝子に高GI食が与える影響」, 2010/5, 『第64回日本栄養・食糧学会大会』, アステイ徳島(徳島)
- [7] 布施悠太、平尾彰子、黒田大暁、大塚慎子、安藤加里奈、田原優、柴田重信、「食餌の成分・タイミングの相違がマウスの体重・体脂肪量ならびに遺伝子発現に及ぼす影響」, 2010/5, 『第64回日本栄養・食糧学会大会』, アステイ徳島(徳島)
- [8] 平尾彰子、「マウス組織において魚油が時計遺伝子および時計制御下の代謝、アレルギー関連遺伝子に与える影響」, 2010/8, 『国際・学際的連携教育プログラム』, 軽井沢セミナーハウス
- [9] 石井裕之、石青、宮城島峻介、今野紳一郎、文野翔吾、岡林誠士、飯田成敏、木村裕、田原優、平尾彰子、柴田重信、「小型移動ロボットを用いた精神疾患モデル動物の開発-精神疾患脆弱性仮説の検証-」, 2010/9, 『第28回日本ロボット学会学術講演会』, 名古屋工業大学(名古屋)
- [10] 平尾彰子、古谷直樹、長浜敬樹、糸川美紗、柴田重信、「花粉症において慢性魚油投与群における効果の違い」, 2011/3, 『日本農芸化学学会 2011大会』, 京都女子大学(京都)
- [11] 平尾彰子、古谷直樹、長浜敬樹、糸川美紗、柴田重信、「マウス組織において魚油がスギ花粉のアレルギー症状に与える影響」, 2011/5, 『第65回日本栄養・食糧学会大会』, 3G-08a、お茶の水女子大学(東京)

- [12] 平尾彰子、古谷直樹、長浜敬樹、糸川美紗、柴田重信、「マウス組織において魚油がスギ花粉のアレルギー症状に与える影響」、2011/5、『第 65 回日本栄養・食糧学会大会』, 3L-10p、お茶の水女子大学(東京)
- [13] 糸川美紗、平尾彰子、古谷直樹、長浜敬樹、平尾和子、柴田重信、「各澱粉含有食がマウス肝臓に及ぼす体内時計リセット効果」、2011/5、『第 65 回日本栄養・食糧学会大会』, 3I-07p、お茶の水女子大学(東京)
- [14] 平尾彰子、糸川美紗、長浜敬樹、大津定治、池田祐子、柴田重信、「魚油がマウス体内時計位相変動に与える新規パスウェイの構築」、2012/5、『第 66 回日本栄養・食糧学会大会』, 2F-03a、東北大学(仙台)
- [15] 今西拓麻、岡本真由美、田原優、平尾彰子、大津定治、清水功雄、柴田重信、「マウスやMEF 細胞の体内時計周期に対する[6]-ジングロールの作用」、2012/5、『第 66 回日本栄養・食糧学会大会』, 2F-04a、東北大学(仙台)
- [16] 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・夕食の摂取時刻の効果」、2012/5、『第 66 回日本栄養・食糧学会大会』, 2I-13p、東北大学(仙台)
- [17] 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「理想的な一週間の生活リズムの探求—マウスの体重及び摂餌量による評価—」、2012/5、『第 66 回日本栄養・食糧学会大会』, 2N-16p、東北大学(仙台)
- [18] 青木菜摘、浜口雄太郎、平尾彰子、柴田重信「Clock 変異マウスが食塩の嗜好性と含塩食物摂取が代謝機能に及ぼす影響」、2012/5、『第 66 回日本栄養・食糧学会大会』, 2O-15p、東北大学(仙台)
- [19] 平尾彰子、大津定治、池田祐子、柴田重信、「肥満予防のための理想的な生活スタイルの確立の検討」、2012/11、『第 46 回日本栄養・食糧学会大会 東北支部大会』、山形大学農学部(鶴岡)

学会発表(国内学会)(一般口演;ポスター)

- [1] 平尾彰子、田原優、本間さと、本間研一、柴田重信、「栄養素摂取によって引き起こされるマウス肝臓時計遺伝子発現リズム」, 2008/3, 『第 85 回生理学会大会』, 3P-F-091、京王プラザホテル(東京)
- [2] 田原優、平尾彰子、坪井琢磨、田中麻貴、吉田晶子、柴田重信、「マウス視交叉上核と網膜における光誘導性の位相変動に関するグリシンの c-fos 発現への影響」, 2008/3, 『第 85 回生理学会大会』, 1P-G-117、京王プラザホテル(東京)
- [3] 平尾彰子、田原優、平尾美朱帆、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に対する量とタイミングの効果」, 2008/10, 『第 15 回日本時間生物学会学術大会』, O-014、岡山大学
- [4] 田原優、平尾彰子、平尾美朱帆、守屋孝洋、柴田重信、「末梢臓器の給餌性リズム形成における DMH の役割と予期行動の意味」, 2008/10, 『第 15 回日本時間生物学会学術大会』, P-054、岡山大学
- [5] 糸川未紗、平尾彰子、古谷直樹、長浜敬樹、田原優、柴田重信、「マウス末梢時計の給餌性リズム同調におけるスターチの影響」, 2010/11, 『第 17 回日本時間生物学会学術大会』, P 087、早稲田大学国際会議場(東京)
- [6] 古谷直樹、平尾彰子、糸川未紗、長浜敬樹、田原優、柴田重信、「マウスにおけるスギ花粉感作時間の変化がアレルギー反応に与える影響」, 2010/11, 『第 17 回日本時間生物学会学術大会』, P065、早稲田大学国際会議場(東京)
- [7] 田原優、黒田大暁、平尾彰子、柴田重信、「インビボ・イメージングによるマウス末梢時計の測定法確立と末梢時計の中枢性制御」【本大会優秀ポスター賞受賞】, 2010/11, 『第 17 回日本時間生物学会学術大会』, P097、早稲田大学国際会議場(東京)
- [8] 平尾彰子、長浜敬樹、糸川未紗、大津定治、田原優、柴田重信、『魚油がマウス肝臓体内時計位相後退作用に及ぼすメカニズムの解明』2011/11, 『第 18 回日本時間生物学会学術大会』, P056、名古屋大学(名古屋)
- [9] 大津定治、大久保理沙、糸川未紗、今西拓麻、平尾彰子、柴田重信、『リモネンとレモン果汁の同時摂取による時計遺伝子発現量への影響』2011/11, 『第 18 回日本時間生物学会学術大会』, P057、名古屋大学(名古屋)
- [10] 大久保理沙、大津定治、今西拓麻、平尾彰子、柴田重信、『リモネンやリナロールの匂い刺激がマウスの時計遺伝子発現に及ぼす影響』2011/11, 『第 18 回日本時間生物学会学術大会』, P058、名古屋大学(名古屋)

- [11] 平尾彰子、糸川未紗、大津定治、池田祐子、青木菜摘、柴田重信、『魚油摂取時のマウス肝臓の位相後退作用において GPR120 を介した新しい経路の確立』2012/9, 『第 19 回日本時間生物学会学術大会』, P073、北海道大学(札幌)
- [12] 平尾彰子、柴田かほり、鈴木裕太、大津定治、池田祐子、柴田重信、『漬物がマウス肝臓体内時計遺伝子に与える影響』2012/9, 『第 19 回日本時間生物学会学術大会』, P074、北海道大学(札幌)
- [13] 池田祐子、大津定治、栗城大輔、平尾彰子、柴田重信、『GPR120 遺伝子発現リズムとインスリン分泌に魚油が及ぼす影響』2012/9, 『第 19 回日本時間生物学会学術大会』, P072、北海道大学(札幌)
- [14] 大津定治、池田祐子、栗城大輔、平尾彰子、柴田重信、『1 週間リズム(Infradian rhythm)での光運動、高脂肪食によるマウスの体重に与える影響』2012/9, 『第 19 回日本時間生物学会学術大会』, P075、北海道大学(札幌)

教育に関わる補助業務

- [1] 電生実験 A(電気・情報生命工学)TA, 2008
- [2] 品川女子学園で模擬講義実施, 2011,10,05

教育に関わる社会貢献

- [1] 第 4 回 IVIS ユーザー会に代表として参加 (学科長推薦), 2009/9/30
- [2] NHK 明日のすイエんサー 出演;中高生に向けた教育番組(大学の代表選抜), 2011,12,13