

博士論文審査報告書

マウス末梢体内時計への食餌性同調の栄養学的解明

Nutritional studies of food entrainment on mouse peripheral clock

申請者

平尾	彰子
Akiko	HIRAO

電気・情報生命専攻 薬理学研究

2013年 2月

ヒトの持っている1日のリズム周期はおよそ24.5時間のサーカディアンリズム（概日リズム）であり、生理機能（睡眠 - 覚醒、体温、摂食 - 排泄、ホルモンの分泌など）の多くにこのリズム現象が存在する。明暗刺激によりサーカディアンリズムは同調され、24時間周期の日内リズムを示すようになる。また、1997年に初めてマウスやヒトの体内時計遺伝子 *Clock* が見出され、体内時計の分子基盤の研究が盛んに行われ、時計遺伝子発現のパターンから、視交叉上核には中心時計が、それ以外の脳部位には脳時計が、末梢臓器には末梢時計があることがわかってきた。ところで、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を約1週間行くと、食餌の時間が近くなるにつれて夜行性のはずのマウスが昼間活動するようになり、食餌開始の2-3時間前から行動が活発になる予知行動リズムが見られるようになる。このような繰り返しの制限給餌による同調を食餌性同調と呼ぶ。実際、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な新陳代謝機能のリズムも食餌性同調を示す。この食餌性同調は中心時計の視交叉上核を破壊した状態でも肝臓などの末梢臓器や視交叉上核以外の脳部位の時計遺伝子の発現リズムの同調として出現する。つまり、この食餌性同調は末梢臓器や脳の時計遺伝子発現リズムに光以外の同調因子として強力に働くが、視交叉上核の時計には影響しない。制限給餌によるリズム同調機構を引き起こす因子の候補として、グルコース等の糖、ホルモン、味覚等の感覚、体温変化等が考えられ、現在も様々な議論がなされており、全貌は未解明のままである。

現在、体内時計の分野は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」が実践されるようになってきた。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」、「シフトワークは太る」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る。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られる。一方で、食餌のタイミングや食餌内容が、食餌による概日リズム同調にどのようなかわっているかについては、不明のままである。そこで、食餌による末梢時計の食餌性同調機構を解明することを目的として、食餌内容・食事間隔を変化させ、どの栄養成分や食餌タイミングが末梢時計の位相決定や同調効果に関与しているのかという観点のもと、本研究は行なわれた。本論文は四章で構成されており、以下に各章の要約と本論文の評価を記した。

第一章は序論であり、体内時計、末梢時計、時間栄養学についてこれまでの研究報告に基づいて詳述した。更に、本研究の背景と概要について述べ、当

該分野における本論文の意義を示した。

第二章は食餌性同調をひきおこす食餌内容について検討した。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時間前進することが報告されている。このことから、血中グルコース濃度すなわち血糖値が高いことが、末梢時計の位相前進を引き起こすことが示唆される。また、Rat-1線維芽細胞にグルコース添加すると *Per1*、*Per2* の遺伝子発現が低下すると報告された。そこで、グルコースに代謝される炭水化物の末梢時計同調促進効果について調べた。マウスには炭水化物、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) という完全栄養食を摂取させる。AIN-93M のそれぞれの栄養成分の一部分あるいは全体を他の栄養成分などに置換して、栄養素の食餌性同調効果を観察した。その結果、肝臓時計の同調には、栄養のバランスが取れた AIN-93M が一番有効であることがわかった。したがって、バランスのとれた食餌は単にその健康と新陳代謝の維持のためだけではなく位相維持にも大きく関与していると考えられた。炭水化物の種類に着目すると、血糖値を上げやすい消化の良いでん粉質で同調されやすいことがわかった。また、ブドウ糖単独よりもブドウ糖とカゼインなどのタンパク質組み合わせが良いことも明らかになった。以上、食餌性同調の栄養成分を始めて明らかにした画期的論文となった。

ところで、血糖値を上げやすいということは同時にインシュリンを分泌している可能性があるという仮説のもと、また、栄養成分の脂質にも注目して以下の研究を展開した。魚油は DHA (ドコサヘキサエン酸)、EPA (エイコサペンタエン酸) を豊富に含む。DHA、EPA などの不飽和脂肪酸は下部小腸や大腸に発現する *GPR120* 受容体のリガンドとして GLP-1 を上昇させインスリン分泌を促すことが分かっている。そこで、魚油を含む餌が肝臓における時計遺伝子発現の食餌性同調をもたらすかどうかを調べた。その結果、魚油の中でも、マグロなどの DHA・EPA 比率の高い油の方が位相同調作用、GLP-1 分泌、インシュリン分泌、時計遺伝子の一過性の発現のいずれも強力であった。また、この作用は *GPR120* の遺伝子変異マウスでは消失されることがわかった。このように、魚油や DHA/EPA の新たな機能を発見する研究成果であった。

第三章は食餌性同調の要因としての食餌の量と給餌間隔との組み合わせに着目して研究を行った。ラットの予知行動リズムは食餌の量に依存して位相シフトをもたらす可能性が調べられ、1日1回の食餌を与える条件において、食餌の量が重要な因子であることがわかった。そこで、本章では1日2食によって同調される肝臓体内時計の位相が、食餌の量と給餌間隔との組み合わせに依存している可能性について調べた。まず、はじめに12時間間隔の1日2食の条件で朝食と夕食の量の比率を変えてマウスに餌を与えた。その結果食事量の多さに比例して位相が引っ張られ、等量だと中間地点の昼間に位相が来ることも見出した。次に、マウスに8時間:16時間もしくは16時間:

8 時間の間隔で 1 日 2 食与えた場合、肝臓体内時計の位相は、長い方の絶食間隔で給餌されたときの肝臓体内時計の位相と合っていた。そのため、「絶食後に最初に摂る」食事が肝臓体内時計をリセットするのに有効な信号であると考えた。この同調果を「朝食 (breakfast: 絶食を破る食事) 効果」と呼ぶことにした。16 時間 : 8 時間で、餌の量比を変えた場合、朝食効果の働きで 16 時間側では、餌が少なめでも位相を引っ張ってくる効果が見られた。マウス肝臓内の *Per2*、*Dec1* 及び *Bmal1* 遺伝子発現が絶食後の給餌によって上昇するので、8 時間又は 16 時間の絶食間隔後の *Per2*、*Dec1* 及び *Bmal1* 遺伝子発現を比較した。その結果、これら遺伝子発現は、8 時間絶食に比較して 16 時間絶食後に増大した。これらの結果から、絶食時間を長く取り、適切な量の食餌を取ると、末梢の体内時計が同調されやすいことがわかった。末梢の体内時計の食餌性同調には、朝食が必要であるという、人にもすぐに応用できる研究成果を出すことができ、社会的にも注目された。

第四章は総括として第二章、第三章のまとめと考察事項を記述するとともに食育に結びつく食事メニューの考案やシフトワーカーの食事などの人の実社会での応用に基づいた今後の展望について記述した。人のライフスタイルを考えると、適切な量の朝食は、肝臓体内時計の位相を維持するのに大切なことである。逆に、異常な食習慣は、肝臓体内時計の位相を望ましくないものにする原因となりうるものが強く示唆された。

以上、本論文では、食餌性同調における食餌内容を詳細に調べ、三大栄養素の役割について明らかにすることができた。特に、完全食の有用性、さらに澱粉の性質、カゼインの役割、さらに、魚油に含まれる DHA/EPA などの脂肪酸の有用性を示すことができた。また、「早寝早起き朝ごはん」運動における朝ごはんの有用性を科学的に示すことができた。これらの研究成果は、末梢臓器の体内時計の食餌性同調の仕組みを理解する上で大変価値あるものであり、当該分野でも高い評価を得ている。以上より、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値のあるものと認める。

2013 年 1 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授
早稲田大学教授
早稲田大学教授

薬学博士 (九州大学)
博士 (理学) 京都大学
理学博士 (東京都立大)

柴田 重信
岡野 俊行
井上 宏子