

博士論文概要

論文題目

Elucidation of Food-Induced Entrainment
Mechanism in Mouse Peripheral Clocks

マウス末梢体内時計における
食餌性同調の作用機序解明

申請者

Yuko	IKEDA
池田	祐子

先進理工学専攻 電気・情報生命研究 B

2017年11月

本論文は、五章で構成される。第一章は序章であり、体内時計の分子機構、末梢時計の特徴、末梢時計の同調因子として知られる食餌、時間栄養学について、これまでの研究報告を背景として詳述する。以上の背景に基づき、本研究の目的と概要、意義を明記する。第二章では、新規の概念である時間運動学についての検討、第三章では末梢体内時計維持に対する食餌の位置づけ、第四章では末梢体内時計の新規同調機構の発見について報告する。

第一章：背景目的

我々は、24 時間周期を刻む明暗等の外部環境変化の中で生活しているが、外部刺激がない状態でもリズムを刻むことができ、これをサーカディアンリズムという。サーカディアンリズムは、動物では睡眠覚醒、摂食行動、自律神経活性や内分泌ホルモンなど、様々な生理機能やリズム制御に重要な役割を果たしている。特に哺乳類においては、視床下部に存在する視交叉上核(Suprachiasmatic nucleus, SCN)がリズム機構の中核を成しているため、SCN は中枢時計(主時計)と呼ばれる。中枢時計が機構の中核を成す体内時計機構は、種々の時計遺伝子によって形成されている。1997 年に哺乳動物から最初の時計遺伝子 *Clock* が発見され、同年に *Per1*、*Bmal1*、*Cry1* 遺伝子が発見された。これら時計遺伝子は、約 24 時間の周期的な発現を示し、サーカディアンリズムの中核を担っている。核内において、*CLOCK* と *BMAL1* がヘテロダイマーを形成し、*Per1*、*Cry1* 遺伝子の 5' 上流に存在する E-box (CACGTG) に結合することで、細胞質内に *PER1*、*CRY1* タンパク質が生成される。*PER1*/*CRY1* が負の因子として、*CLOCK*/*BMAL1* の転写活性を抑制するフィードバックループ機構を形成することで、約 24 時間の周期性を維持している。中枢時計に加え、各末梢臓器にも時計遺伝子が約 24 時間の周期で発現リズムを刻み、末梢時計と呼ばれる。哺乳類の体内時計の周期は、24 時間丁度ではないが、地球は 24 時間周期で自転しているため、体内時計の周期を 24 時間に合わせる必要がある。このように、サーカディアンリズムを 24 時間周期に合わせる機構を「同調機構」という。外界の明暗周期が網膜を通じて、中枢時計に伝わる光刺激によって同調が行われており、この事を「光同調」という。末梢時計は、それだけではリズム維持することが難しく、自律神経系、内分泌ホルモンや体温リズムなどを含む、様々な経路を通じて中枢時計から時刻情報を受け取っている。一方で、内分泌ホルモン、食餌や薬物などは中枢時計を介さず、末梢時計に直接影響を与える同調因子として働くことも明らかとなっている。また、栄養素の吸収や代謝に関わる酵素の遺伝子発現や活性の一部は体内時計の支配下にあり、24 時間周期のリズムを刻む。このように、栄養摂取の時間帯を考慮した学問の事を「時間栄養学」という。

第二章：時間運動学の提唱

当研究室の先行論文では、食餌摂取の時間帯と肥満抑制効果との関係を報告してきた。夕食よりも、朝食に比重を置いた方が、肥満抑制効果が強い事が明らかとなった。しかし、運動についての検討、つまり、いつ運動することが肥満抑制に最も効果的であるかは未解明である。そこで第二章では、マ

ウスを用いて、運動の時間帯と肥満抑制効果との関係を検討した。マウスの活動期(暗期 12 時間)を三等分し、活動期始めの 4 時間を”朝”、真ん中 4 時間を”昼”、終わり 4 時間を”夕”と定義し、それぞれ 4 時間だけ輪回し運動ができるように、一か月間飼育した。その結果、朝運動群よりも、昼・夕運動群において強い肥満抑制効果がみられた。さらに、昼・夕運動群において、より呼吸商の低下、エネルギー消費の増加が誘導されることを見出した。

第三章：末梢体内時計維持に対する食餌の位置づけ

背景で述べたように、食餌や内分泌ホルモンは末梢時計の同調因子として知られている。しかし、いずれの経路がより強い支配力を持つのかは未解明である。そこで第三章では、末梢時計に入力される「食餌」と「内分泌ホルモン」を排除した条件のマウスの末梢体内時計を測定することで、それぞれの同調因子の末梢時計に対する位置づけの理解に挑戦した。同一個体のマウスを intact (無処置), 6 meals SF (1 日 6 回の等間隔等量制限給餌), グルココルチコイドを分泌している副腎を切除した ADX (Adrenalectomy), ADX + 6 meals SF 条件の順で飼育し、*in vivo* monitoring 装置によって、末梢体内時計を測定した。結果、全ての臓器において intact 群と比較して、6 meals SF 群の位相が有意に前進し、一方で ADX 群では有意な位相差は見られなかった。両条件を合わせた ADX + 6 meals SF 群においても、有意な位相前進が観測された。さらに、ADX 群では腎臓、6 meals SF 群では肝臓における振幅が有意に低下しており、各末梢時計が減弱していることが分かった。以上の結果より、特に肝臓時計の維持には、内分泌ホルモンよりも食餌のシグナルが重要な役割を果たしていることを見出した。

第四章：末梢体内時計の新規同調機構解明

末梢時計の維持に重要である“食餌”に着目し、末梢体内時計同調の新規経路の解明に挑戦した。背景で述べたように、食餌は末梢体内時計の強い同調因子として働くことが分かっている。当研究室の先行論文より、末梢体内時計の同調は食餌内容によって異なることが明らかとなっている。具体的には、グリセミック・インデックス(GI)値が高い、つまり血糖値、インスリンが上昇しやすい食餌が末梢体内時計を同調しやすい。また三大栄養素の一つである炭水化物の中では、消化が速く、インスリンを上昇させやすい α -ポテトスターチを含む食餌が、より末梢体内時計を同調しやすいことも明らかにしている。さらに、DHA, EPA を多く含む魚油、特にマグロ油がインスリン上昇を促し、末梢体内時計同調に効果的であることも示している。魚油に含まれる、DHA, EPA などの不飽和脂肪酸は大腸に発現している GPR (G protein-coupled receptor) 120 受容体のアゴニストとして働きインスリン分泌を促進する。先行論文では、インスリン分泌遮断薬 (Streptozotocin; STZ) で処置したマウスまたは、*Gpr120* 欠損マウスにおいては、魚油による末梢体内時計同調は抑制されることを示し、以上の結果から、魚油による末梢体内時計同調は GPR120 受容体に不飽和脂肪酸が結合し、インスリン分泌を促進させることで引き起こされていることを確認した。しかし、STZ で処置したマウスにおいても食餌性同調は機能することが、多くの研究グループから報告されている。すなわち、食餌による末梢体内時計同調に

は、インスリン以外の経路もおそらく存在する。本研究では、インスリン分泌上昇への寄与率が低い、タンパク質・アミノ酸を用いて、末梢体内時計同調の新規経路解明のために、大きく 3 つの実験を行った。①マウスの通常食には 14%ミルクカゼインタンパク質(72%炭水化物)含有餌が用いられる。そこで本研究では、タンパク質と炭水化物の含有比率を変動させた 3 種類の餌、86P/0C (86%タンパク質+0%炭水化物)、6P/80C、0P/86C を準備した。その際、タンパク質と炭水化物以外の栄養素(14%)は固定した。以上の餌を明期の真ん中に 2 日間摂食させた後に *in vivo monitoring* 装置を用いて、末梢体内時計の時刻を測定した。結果、86P/0C と比較して低タンパク質食である 6P/80C の方が強い同調効果を示した一方で、6P/80C と比較して 0P/86C の方が同調効果は弱いことが分かった。つまり、タンパク質も食餌性同調に重要な要因であることを見出した。②タンパク質と炭水化物以外の栄養素の影響を排除するため、100P/0C(100%タンパク質食)を準備した。同様に、明期の真ん中に 2 日間 100P/0C を摂食させた後、末梢体内時計を測定した結果、同調効果が確認された。Control 群は、暗期に通常食を摂食しているマウスとした。100P/0C 摂食により、血清グルカゴン濃度、肝臓中 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 濃度が有意に上昇すること、またグルカゴン、IGF-1 投与によって *in vivo, in vitro* 共に肝臓時計の同調効果を発揮することを明らかにした。また、STZ で処置したマウスにおいても 100P/0C 摂食によって、末梢体内時計の同調が引き起こされることを見出した。100P/0C 摂食後の STZ 処置マウスでは、グルカゴン濃度は変化がみられなかったが、血清・肝臓中 IGF-1 濃度は有意に上昇した。さらに、グルカゴン受容体、IGF-1 受容体の両ブロッカーを同時に処置したマウスでは、100P/0C 摂取による同調効果は抑制されることを示した。以上の結果からタンパク質食はグルカゴン、IGF-1 産生の上昇を介して、末梢体内時計同調を促進すること、また IGF-1 の方がより強い効果を持つ事を発見した。③タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸に着目した。各アミノ酸 5mmol/kg を明期の真ん中に 3 日間連続で強制経口投与を行い、その後 *in vivo monitoring* 装置を用いて、末梢体内時計の測定をした結果、システイン、ロイシン、ヒスチジンが同調効果を示し、中でもシステインが最も強い同調効果を有することが明らかとなった。またシステインは IGF-1 産生を促すことが報告されているため、本研究でも肝臓中 IGF-1 濃度を測定した結果、Control 群と比較し、1 日を通して高いレベルを維持していることが分かった。さらに、IGF-1 受容体アンタゴニスト処置マウスにおいては、システインによる同調効果は抑制されることを示した。以上の結果から、20 種のアミノ酸の中で最も強い同調効果を持つシステインは、IGF-1 産生を介して末梢体内時計同調を促進することを発見した。以上①～③の結果より、末梢体内時計同調の新規経路として、グルカゴン、IGF-1 の関与を発見することに成功した。

第五章：総括

最後に第五章では第二～四章の研究成果を総括する。時間運動学の知見や、末梢体内時計に対する新規同調機構の発見によって、糖尿病患者やシフトワーカー、時差ボケに対する運動・食事療法やサプリメント処方方法の提案などを踏まえ、今後の展望について記述する。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 池田 祐子 印

(2018年1月現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文 ○	<p>Ikeda Y., Kamagata M., Hirao M., Yasuda S., Iwami S., Sasaki H., Tsubosaka M., Hattori Y., Todoh A., Tamura K., Shiga K., Ohtsu T., Shibata S. “Glucagon and/or IGF-1 production regulates resetting of the liver circadian clock in response to a protein or amino acid-only diet.” <i>EBioMedicine</i>, in press.</p> <p>○ Ikeda Y., Sasaki H., Ohtsu T., Shiraishi T., Tahara Y., Shibata S. “Feeding and adrenal entrainment stimuli are both necessary for normal circadian oscillation of peripheral clocks in mice housed under different photoperiods.” <i>Chronobiology International</i>. 32(2), 195-210, 2015.</p> <p>○ Sasaki H., Ohtsu T., Ikeda Y., Tsubosaka M., Shibata S. “Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice.” <i>Chronobiology International</i>. 31(9), 959-975, 2014.</p> <p>Tahara Y., Yamazaki M., Sukigara H., Motohashi H., Sasaki H., Miyakawa H., Haraguchi A., Ikeda Y., Fukuda S., Shibata S. “Gut microbiota-derived short chain fatty acids induce circadian clock entrainment in mouse peripheral tissue.” <i>Scientific Reports</i>. 8(1):1395, 2018.</p> <p>Kamagata M., Ikeda Y., Sasaki H., Hattori Y., Yasuda S., Iwami S., Tsubosaka M., Ishikawa R., Todoh A., Tamura K., Tahara Y., Shibata S. “Potent synchronization of peripheral circadian clocks by glucocorticoid injections in PER2::LUC-Clock/Clock mice.” <i>Chronobiology International</i>. 13, 1-16, 2017.</p> <p>Shinozaki A., Misawa K., Ikeda Y., Haraguchi A., Kamagata M., Tahara Y., Shibata S. “Potent effects of flavonoid nobiletin on amplitude, period, and phase of the circadian clock rhythm in PER2::LUCIFERASE mouse embryonic fibroblast.” <i>PLoS One</i>. 12(2), e0170904, 2017.</p> <p>Fukuda T., Haraguchi A., Kuwahara M., Nakamura K., Hamaguchi Y., Ikeda Y., Ishida Y., Wang G., Shirakawa C., Tanihata Y., Ohara K., Shibata S. “L-Ornithine affects peripheral clock gene expression in mice.” <i>Scientific Reports</i>. 6:34665, 2016.</p> <p>Sasaki H., Hattori Y., Ikeda Y., Kamagata M., Iwami S., Yasuda S., Tahara Y., Shibata S. “Forced rather than voluntary exercise entrains peripheral clocks via a corticosterone/noradrenaline increase in PER2::LUC mice.” <i>Scientific Reports</i>. 6:27607, 2016.</p> <p>Sasaki H., Hattori Y., Ikeda Y., Kamagata M., Iwami S., Yasuda S., Shibata S. “Phase shifts in circadian peripheral clocks by exercise are dependent on the feeding schedule in PER2::LUC mice.” <i>Chronobiology International</i>. 33(7), 849-862, 2016.</p> <p>Furutani A.*, Ikeda Y.*, Itokawa M., Nagahama H., Ohtsu T., Furutani N., Kamagata M., Yang ZH., Hirasawa A., Tahara Y., Shibata S. (*These authors equally contributed this work.) “Fish oil accelerates diet-induced entrainment of the mouse peripheral clock via GPR120.” <i>PLoS One</i>. 10(7), e0132472, 2015.</p> <p>Sasaki H., Hattori Y., Ikeda Y., Kamagata M., Shibata S. “Eating meals before wheel-running exercise attenuate high fat diet-driven obesity in mice under two meals per day schedule.” <i>Chronobiology International</i>. 32(5), 677-886, 2015.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	Narishige S., Kuwahara M., Shinozaki A., Okada S., <u>Ikeda Y.</u> , Kamagata M., Tahara Y., Shibata S. "Effects of caffeine on circadian phase, amplitude and period evaluated in cells <i>in vitro</i> and peripheral organs <i>in vivo</i> in PER2::LUCIFERASE mice." <i>British J Pharmacology</i> . 171(24), 5858-5869, 2014.
	Haraguchi A., Aoki N., Ohtsu T., <u>Ikeda Y.</u> , Shibata S. "Controlling access time to a high-fat diet during the inactive period protects against obesity in mice." <i>Chronobiology International</i> . 31(8), 935-944, 2014.
総説 (以下同)	柴田 重信、 <u>池田 祐子</u> 「脂質の時間栄養学」、日本脂質栄養学会、第 24 巻 1 号、2015 年
	柴田 重信、 <u>池田 祐子</u> 、原口 敦嗣「食行動と概日リズム調節機構」特集：睡眠・眠りの基礎と臨床、医薬ジャーナル、第 50 巻 6 号、2014 年
	柴田 重信、佐々木 裕之、 <u>池田 祐子</u> 「時間栄養学と時間運動学」特集：概日リズムと疾患～病態・診断・治療の最新知見～、日本臨牀、第 71 巻 12 号、2013 年
講演 (以下同)	〈国内会議 シンポジウム〉 <u>池田 祐子</u> 、柴田 重信「Elucidation of mechanism on entrainment of mouse peripheral clocks of protein and amino acids intake.」第 137 回日本薬学会年会 大学院生シンポジウム”革新的創薬・育薬を目指す若手研究者によるトランスレーショナルリサーチの最前線”（オーガナイザー）、GS03-1、東北大学、2017 年 3 月
	<u>池田 祐子</u> 、柴田 重信「Effects of macronutrients of mouse diet and human foods on circadian entrainment.」第 22 回日本時間生物学会学術大会 ”Chrono-nutrition:マウスからヒトまで”、S6-2、東京大学、2015 年 11 月
	〈国内会議 口頭発表〉 <u>池田 祐子</u> 、鎌形 真世、佐々木 裕之、坪坂 美来、服部 雄太、安田 晋之介、岩見 志保、東藤 愛、柴田 重信「タンパク質・アミノ酸を用いたマウス末梢体内時計同調の作用機序解明」第 27 回霧島神経薬理フォーラム、一般演題 3-1、休暇村志賀島、2016 年 8 月
	<u>池田 祐子</u> 、安田 晋之介、岩見 志保、服部 雄太、佐々木 裕之、鎌形 真世、東 誠一郎、野間 晃幸、伊藤 裕之、柴田 重信「酸性乳がマウス末梢体内時計同調に及ぼす影響」第 70 回日本栄養食糧学会大会、2F-03p、武庫川女子大学、2016 年 5 月
	<u>池田 祐子</u> 、大津 定治、平尾 美朱帆、佐々木 裕之、坪坂 美来、服部 雄太、鎌形 真世、柴田 重信「マウス末梢体内時計を同調させる、タンパク質やアミノ酸食の探索」第 68 回日本栄養食糧学会大会、3O-07a、酪農学園大学、2014 年 6 月
	<u>池田 祐子</u> 、大津 定治、栗城 大輔、佐々木 裕之、平尾 彰子、柴田 重信「インスリン分泌を介して末梢時計の同調を促進させるタンパク質食の開発」第 67 回日本栄養食糧学会大会、2G-06p、名古屋大学、2013 年 5 月

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 (以下同)	<p>〈国際会議 ポスター発表〉 他 2 件</p> <p>Ikeda Y., Kamagata M., Sasaki H., Tsubosaka M., Hattori Y., Yasuda S., Iwami S., Shibata S. 「Protein entrains mice peripheral clocks via glucagon secretion」 7th Annual UCSD Center for Circadian Biology Symposium "From Cells to Clinic", UCSD, USA, February 2016.</p> <p>Ikeda Y., Kamagata M., Sasaki H., Tsubosaka M., Hattori Y., Yasuda S., Iwami S., Shibata S. 「Effects of proteins and amino acids on entrainment of mouse peripheral clock evaluated by <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>」 Cold Spring Harbor Asia Chronobiology Conference 2015, Suzhou, China, October 2015.</p> <p>Ikeda Y., Sasaki H., Hattori Y., Kamagata M., Shibata S. 「Interaction between circadian rhythm and chocolate intake in mice」 ACN 2015, Yokohama, Japan, May 2015.</p> <p>〈国内会議 ポスター発表〉 他 1 件</p> <p>池田 祐子, 鎌形 真世, 服部 雄太, 安田 晋之介, 岩見 志保, 東藤 愛, 柴田 重信「タンパク質・アミノ酸を用いた、マウス末梢体内時計同調の作用機序解明」第 71 回日本栄養食糧学会大会、2A-A21、沖縄コンベンションセンター、2017 年 5 月</p> <p>池田 祐子, 鎌形 真世, 佐々木 裕之, 服部 雄太, 安田 晋之介, 岩見 志保, 東藤 愛, 柴田 重信「Effects of proteins on entrainment of mouse peripheral clock」第 93 回日本生理学会大会、AC-34、札幌コンベンションセンター、2016 年 3 月</p> <p>池田 祐子, 鎌形 真世, 平尾 美朱帆, 佐々木 裕之, 坪坂 美来, 服部 雄太, 大津 定治, 柴田 重信「Involvement of proteins and amino acids in the food-induced entrainment of the mouse peripheral clocks」第 21 回日本時間生物学会学術大会、P-71、九州大学、2014 年 11 月</p> <p>池田 祐子, 大津 定治, 平尾 美朱帆, 佐々木 裕之, 坪坂 美来, 柴田 重信「Search of the suitable protein content and kinds of amino acid which entrains mouse peripheral clocks」第 91 回日本生理学会大会、3P-101、鹿児島大学、2014 年 3 月</p> <p>池田 祐子, 大津 定治, 栗城 大輔, 平尾 彰子, 柴田 重信「Combination food of carbohydrate and protein entrains mouse peripheral clocks through insulin secretion」第 90 回日本生理学会大会、3PK-187、タワーホール船堀、2013 年 3 月</p>
その他	<p>〈受賞歴〉</p> <p>第 1 回 TWIns 研究交流会 ポスター賞受賞、2014 年 10 月</p> <p>The 24th Society for Research on Biological Rhythms (SRBR) Research Merit Award 受賞、2014 年 6 月</p> <p>第 68 回 日本栄養食糧学会大会 トピックス演題選定、2014 年 6 月</p> <p>第 90 回 日本生理学会大会 Junior Investigator's Award 受賞、2013 年 3 月</p>