

博士論文審査報告書

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

2018年2月

多くの生物は 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自分自身でリズムを刻むことができ、これを概日リズム(サーカディアンリズム)と呼ぶ。サーカディアンリズムは、睡眠覚醒、摂食行動、自律神経活動や内分泌ホルモンなど、動物やヒトの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。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。中枢時計に加え、末梢時計と呼ばれる時計機構が各臓器にあり、時計遺伝子が発現リズムを刻んでいる。体内時計の周期は、24 時間よりずれているが、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。外界の明暗周期は網膜を通じて、中枢時計を同調しており、この事を「光同調」という。末梢時計は自律振動することが難しく、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、運動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。

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や運動について研究報告を背景として述べ、以上の背景に基づき、第一章では本研究の目的と概要、意義を明記した。第二章では、運動による抗肥満効果が朝・夕のいずれがより効果的かを調べた。第三章では末梢体内時計のリズム性維持に対し、臓器別の食餌と副腎皮質ホルモンのいずれが優勢に働くかについて調べた。第四章では末梢体内時計の食餌性の同調に、今までに知られていない新規な同調機構の発見について報告した。最後に本論文の総括と今後の展望について記載した。以下に具体的な研究内容とともに、公聴会での質疑応答の内容も含めて記載する。なお口頭発表と質疑応答は英語で行ったが、十分に意思疎通ができていた。

申請者が所属する研究室の先行論文では、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示されている。しかし、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った。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、その原因として昼・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。

末梢時計を同調させる刺激として食餌や内分泌ホルモンが知られている。内分泌ホルモンでは特に副腎皮質のコルチコステロンおよび副腎髄質のアドレナリンが確立された同調刺激ホルモンである。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「副腎皮質や副腎髄質由来ホルモン」を排除した条件のマウスの

末梢時計の発振状態を測定することで、それぞれの同調因子の末梢時計に対する役割を明らかにしようと試みた。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）、副腎を切除した ADX（Adrenalectomy）、ADX + 6 meals SF 条件の順で飼育し、それぞれの条件において *in vivo* モニター装置を用い末梢時計（腎臓・肝臓・顎下腺が測定可能臓器）の状態をリアルタイムで測定した。結果、特に肝臓において 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いることが分かった。以上の結果より、肝臓の時計の維持には、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が明らかとなった。公聴会では、その仕組みの違いの意味についての質問が有り的確に回答した。

次に第4章では肝臓における食餌性同調の新規なメカニズム発見に努めた成果を記載した。末梢時計の振動性の維持に重要である“食餌”に着目し、末梢時計同調の新規経路の解明に挑戦した。食餌は末梢時計の強い同調因子として働き、先行論文より、末梢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。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、より末梢時計を同調しやすいことを共著論文で明らかにしている。脂肪では 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、末梢時計同調に効果的であることも共著論文で示している。ところで、インスリン合成を不可逆的に抑制する薬剤である STZ（ストレプトゾトシン）で処置して作製した1型糖尿病モデルマウスにおいても、食餌性同調は維持されることが、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可能性がある。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(0%タンパク質+86%炭水化物)を準備した。この餌を明期の真ん中に2日間摂食させた後に *in vivo* モニター装置を用いて、末梢時計の発振状態を測定した。その結果、6P/80C、0P/86C、86P/0Cの順に同調効果を示した。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、摂食後の末梢時計の発振状態を測定した結果、タンパク質食による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、末梢時計の同調が引き起こされることを見出した。STZ 処置マウスでは、100P/0C 摂食の前後でグルカゴン濃度は変化がみられなかつ

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、末梢時計同調を促進すること、また IGF-1 の方がグルカゴンよりも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* 装置を用いて、末梢時計の発振状態を測定した結果、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した。システインは、Control 群と比較して肝臓中 IGF-1 濃度を上昇させた。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。公聴会では、アミノ酸の中でのシステインの意味、異性体の関与、正常と糖尿病などでの細胞内シグナルの使い分けの意味などの質問が出たが、すべての的確に回答した。

最後に第五章では第二～四章の研究成果を総括し、体内時計と運動との関係の知見や、末梢時計に対する新規同調機構の発見に基づいて、糖尿病やシフトワーク、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を提案するなど、今後の展望について記述した。以上、本論文は食餌性の体内時計の新規な同調機構を発見し、このことがヒトの正常な体内時計維持のための食事療法の新たな開拓につながる可能性を提案した。最近、体内時計の研究はヒトの生活や健康にもかかわる側面も新たな研究対象となっており、本研究の当該領域への貢献は大きいと考えられる。したがって、本論文は博士(理学)の学位論文として、十分価値のあるものであると判断できる。

2018 年 2 月

審査員

主査 早稲田大学教授 薬学博士 (九州大学) 柴田 重信

年 月 日

早稲田大学教授 博士 (理学) 京都大学 岡野 俊行

年 月 日

早稲田大学教授 博士 (理学) 早稲田大学 朝日 透

年 月 日

サントリーウエルネス株式会社、常務取締役

博士 (理学) 大阪大学 柴田 浩志

年 月 日