

博士論文概要

論文題目

Effect of Circadian Meal Pattern on Obesity and
Depressive-like Behavior in Mice
マウスの肥満やうつ様行動に対する
概日性食餌パターンの影響

申請者

Atsushi	HARAGUCHI
原口	敦嗣

先進理工学専攻 電気・情報生命研究 B

2017年 11月

本博士論文は、全四章で構成される。第一章では序論として、概日時計の仕組みや中枢時計・末梢時計、時間栄養学、概日時計と肥満・うつ病との関連について、これまでの先行研究に基づいて記述する。さらに本研究の背景・目的について記述することで当核分野における本研究の意義を示す。第二章では、高脂肪食を給餌する時間帯や給餌時間の長さとの関連について報告し、第三章では、乱れた食餌パターンと時刻特異的なうつ様行動との関連について報告する。第四章では、第二章と第三章を総括する。

第一章：序章

地球上の多くの動植物は、太陽の日の出・日の入りから構成される明暗周期の環境変化の中で生活を送っている。一方で、明暗周期がない恒暗条件下でも約 24 時間周期で生活を送ることができ、このような約 24 時間周期はサーカディアンリズム（概日リズム）と呼ばれている。睡眠・覚醒リズムや体温の日内変動、ホルモン分泌、食欲などの多くの生理機能は概日リズムを有しており、このように生理機能に概日リズムを持たせる機構のことを「概日時計」と呼ぶ。この概日時計は、十数種類に及ぶ時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群によって構成されており、ヒトを含めた哺乳類においては *Cry* や *Per*、*Bmal1*、*Clock* が時計遺伝子群の中核を成すことが知られている。具体的には、*CLOCK* と *BMAL1* が二量体となり、プロモーター領域である E-box に結合することでその下流に存在する *Per* や *Cry* の転写が活性化される。転写・翻訳により合成される *PER* と *CRY* は二量体を形成して核内に移行し、*CLOCK/BMAL1* に作用することで *Per* や *Cry* の転写を抑制する。このように、*Per* や *Cry* の mRNA 量やタンパク質量が約 24 時間周期で変動することで概日リズムが作り出されている。E-box の下流には時計遺伝子以外にも、糖代謝や脂質代謝、モノアミン代謝などの生理機能の活性化に関与する遺伝子が存在しており、これらの mRNA 量やタンパク質量も時計遺伝子と同様に概日性の変動をすることで、各種生理機能に概日リズムが確認されると考えられている。

ヒトを含めた哺乳類には、大きく分けて 2 種類の概日時計が存在する。視床下部にある視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus; SCN）に存在する中枢時計と、その他の脳の部位と各末梢臓器に存在する末梢時計である。網膜で受容された太陽光などの外部環境からの光シグナルが視神経を介して中枢時計に伝達され、中枢時計の時刻（位相）調整が行なわれる（同調）。その後「交感神経・副交感神経」や「ホルモンなどの液性因子」、「摂食リズムや行動リズム」などを通じて中枢時計が各末梢時計の位相を調節することで、中枢時計と末梢時計が同一の時刻情報を元に概日リズムを示す。そのため SCN を破壊した動物では、末梢時計を含めた全ての概日リズムが消失することが知られている。中枢時計は光にのみ同調することが知られているのに対して、末梢時計は中枢時計からの支配を受けるだけでなく、中枢時計を介さずに食事に同調することも知られている。実際にヒトを対象とした研究により、食事の時間を遅くすることで、血糖値や脂肪組織の時計遺伝子の発現リズムが後退することが報告さ

れている。またマウスを用いた研究により、耐糖能試験を行う時間帯によって、血糖値の上がり異なることが報告されている。このように、栄養・食事を摂るタイミングによって末梢時計の位相変動が引き起こされることと、反対に概日時計によって代謝機能が制御されていることから、食事を摂取する時間帯が体重や血糖値などへ及ぼす作用について研究する学問を「時間栄養学」と呼ぶ。時間栄養学は近年注目されており、ヒトを対象とした研究も多く行われている。「日本人の食事摂取基準(2015年版)」には朝食の重要性や食事のタイミングについて言及されている項目が初めて追加されていることから、概日リズムを考慮した食事パターンに関する研究の重要性が高いことが分かる。

肥満やうつ病の患者や、それらのモデル動物の概日時計が乱れているというこれまでの報告から、肥満やうつ病と概日時計の乱れ(位相変動やリズム性消失)には、互いに密接な関係にあることが推測される。概日時計、特に末梢時計は、概日性食事パターンの影響を受けるが、概日性食事パターンと肥満やうつ病との関連に関する報告はほとんどない。本博士論文は、以上の先行研究を背景とし、マウスを用いて概日性食餌パターンと肥満やうつ様行動との関連に注目して行われた。

第二章：高脂肪食の給餌時間帯や給餌時間と肥満との関連について

マウスを用いた先行研究により、高脂肪食の給餌できる時間を制限(制限給餌)して与えることで、摂食カロリー量を極端に制限することなく、高脂肪食による体重増加や末梢時計のリズム性消失を抑制できることが報告されている。しかし、これらの先行研究では高脂肪食を給餌する時間帯や給餌時間の長さが体重増加や末梢時計に与える影響について検証されていなかった。そこで、本章では1日2回(活動期と非活動期の真ん中の時間帯)の制限給餌条件下で、高脂肪食と通常食を用いた給餌パターン(高脂肪食を活動期と非活動期のどちらで給餌するか)の違いや各給餌時間の長さの違いによる生理機能や概日時計への影響について検証を行った。

その結果、明期と暗期の給餌時間を4時間に設定した場合は、給餌パターンに関係なく体重や内臓脂肪率が増加しないことを見出した。各給餌時間を短くした場合(2時間)は、給餌パターンに関係なく体重や内臓脂肪率が増加することを見出した。これは給餌時間を短くしたことで、短い時間で多くのカロリー量を摂取する、いわゆる「早食い」の状態になり、食後血糖値が上昇しやすくなっていることが原因であると考えられた。また各給餌時間を長くした場合(8時間)は、高脂肪食を非活動期に給餌した群で体重や内臓脂肪率が増加することを見出した。これは、非活動期の摂食カロリー量が活動期よりも多くなり、末梢時計が非活動期側に位相変動を起こしたことも原因の一つであることが考えられた。実際に、非活動期の高脂肪食の給餌時間を2時間に固定し、活動期の通常食の給餌時間を2時間から延ばすことで、体重や内臓脂肪率の増加や末梢時計の位相変動が抑制された。

以上の結果から、「早食い」のような食生活を送っていると食事パターンに関係なく体重や内臓脂肪率の増加(肥満)が引き起こされることが分かった。さらに非活動期の摂食カロリー量が活動期より

も多くなることで、末梢時計の位相変動や肥満が引き起こされる可能性が示唆された。ただし、4時間の給餌時間で高脂肪食を非活動期に給餌した群では末梢時計の位相変動は確認されたが、肥満は確認されなかったため、末梢時計の位相変動と肥満との関連については更なる検証が必要だと考えられる。

第三章：乱れた食餌パターンと時刻特異的なうつ様行動との関連について

食事リズムが乱れた病気の一つに「夜食症候群 (Night eating syndrome; NES)」という病気がある。NES 患者は夕食から入眠までの間に1日の総摂食カロリーの約25%を摂るという特徴がある。また通常のうつ病患者が朝にうつ症状を示すのに対して、NES 患者は夕方から夜にかけてうつ症状を示すことが知られている。そこで、乱れた食事リズムが時刻特異的なうつ症状を引き起こすのではないかと仮説のもと、実験を行なった。

本実験で使用した NES モデルマウスは、通常食を自由摂食させつつ非活動期の真ん中の時間帯に5分間だけ高脂肪食を給餌する条件下で飼育したマウスである。この条件で飼育することで、高脂肪食の摂食カロリーの量が1日の総摂食カロリーの約25%になること、マウスにとっての夕方に相当する非活動期開始時に強制水泳試験を行うと無動時間が対照群(通常食を自由摂食)と比較して増加すること(うつ様行動)が分かった。そこで次に高脂肪食を給餌する時間が2分の群を追加し、非活動期開始時における強制水泳試験と末梢時計の位相の測定を行なった。その結果、高脂肪食を2分間給餌した群では、対照群と同程度の無動時間と末梢時計の位相を示したのに対して、NES モデルマウスでは無動時間が延長することと末梢時計の位相が変動することを見出した。このことから、末梢時計の位相変動を引き起こす程のカロリーの量を非活動期に摂取することが、時刻特異的なうつ様行動を引き起こす原因となることが示唆された。

また、うつ様症状の原因の一つと考えられる海馬におけるセロトニン量を測定したところ、NES モデルマウスではストレス負荷に伴い、対照群と比較して海馬におけるセロトニン量は増大するが、セロトニンの代謝率は低下することが分かった。つまり、NES のような摂食リズムによって海馬におけるセロトニンの機能低下が引き起こされる可能性が示唆された。

以上の結果から、夜間に末梢時計の位相変動を引き起こす程のカロリーを摂取するような食生活を続けることで、末梢時計の位相変動や海馬におけるセロトニンの機能不全を引き起こし、その結果として時刻特異的なうつ症状が誘発されることが示唆された。

第四章：総括

ここでは、第二章と第三章で示した研究結果を総括し、概日性食事パターンと肥満、うつ症状との関係の重要性を示した。さらに、本研究で使用した給餌条件の時間栄養学的研究への応用や、本研究の臨床応用への意義など、今後の展望について記述した。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 原口 敦嗣 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>Haraguchi, A., Fukuzawa, M., Iwami, S., Nishimura, Y., Motohashi, H., Tahara, Y. & Shibata, S. Night eating model shows time-specific depression-like behavior. <i>Sci Rep.</i> 8, 1081 (2018).</p>
○	<p>Haraguchi, A., Aoki, N., Ohtsu, T., Ikeda, Y., Tahara, Y. & Shibata, S. Controlling access time to high fat diet during inactive period protects against obesity and abnormal phase-shift of peripheral clock in mice. <i>Chronobiol Int.</i> 31, 935-944 (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>Sci Rep.</i> 8, 1395 (2018).</p> <p>Wada, M., Orihara, K., Kamagata, M., Hama, K., Sasaki, H., Haraguchi, A., Miyakawa, H., Nakao, A. & Shibata, S. Circadian clock-dependent increase in salivary IgA secretion modulated by sympathetic receptor activation in mice. <i>Sci Rep.</i> 7, 8802 (2017).</p> <p>Motohashi, H., Sukigara, H., Tahara, Y., Saito, K., Yamazaki, M., Shiraishi, T., Kikuchi, Y., Haraguchi, A. & Shibata, S. Polyporus and Bupleuri radix effectively alter peripheral circadian clock phase acutely in male mice. <i>Nutr Res.</i> 43, 16-24 (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 Fibroblasts. <i>PLoS One.</i> 12, e0170904 (2017).</p> <p>Tahara, Y., Takatsu, Y., Shiraishi, T., Kikuchi, Y., Yamazaki, M., Motohashi, H., Muto, A., Sasaki, H., Haraguchi, A., Kuriki, D., Nakamura, T. J. & Shibata, S. Age-related circadian disorganization caused by sympathetic dysfunction in peripheral clock regulation. <i>NPJ Aging Mech Dis.</i> 3, 16030 (2017).</p> <p>Takahashi, M., Haraguchi, A., Tahara, Y., Aoki, N., Fukuzawa, M., Tanisawa, K., Ito, T., Nakaoka, T., Higuchi, M. & Shibata, S. Positive association between physical activity and PER3 expression in older adults. <i>Sci Rep.</i> 7, 39771 (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>Sci Rep.</i> 6, 34665 (2016).</p> <p>Tahara, Y., Yokota, A., Shiraishi, T., Yamada, S., Haraguchi, A., Shinozaki, A. & Shibata, S. In vitro and in vivo Phase Changes of the Mouse Circadian Clock by Oxidative Stress. <i>Journal of Circadian Rhythms.</i> 14, 1-7 (2016).</p> <p>Tanabe, K., Kitagawa, E., Wada, M., Haraguchi, A., Orihara, K., Tahara, Y., Nakao, A. & Shibata, S. Antigen exposure in the late light period induces severe symptoms of food allergy in an OVA-allergic mouse model. <i>Sci Rep.</i> 5, 14424 (2015).</p> <p>Hamaguchi, Y., Tahara, Y., Kuroda, H., Haraguchi, A. & Shibata, S. Entrainment of mouse peripheral circadian clocks to <24 h feeding/fasting cycles under 24 h light/dark conditions. <i>Sci Rep.</i> 5, 14207 (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	<p>Tahara, Y., Shiraishi, T., Kikuchi, Y., Haraguchi, A., Kuriki, D., Sasaki, H., Motohashi, H., Sakai, T. & Shibata, S. Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. <i>Sci Rep.</i> 5, 11417 (2015).</p> <p>Ohnishi, N., Tahara, Y., Kuriki, D., Haraguchi, A. & Shibata, S. Warm water bath stimulates phase-shifts of the peripheral circadian clocks in PER2::LUCIFERASE mouse. <i>PLoS One.</i> 9, e100272 (2014).</p>
総説	<p>柴田 重信, 池田 祐子, 原口 敦嗣. 食行動と概日リズム調節機構. <i>医薬ジャーナル</i>. 株式会社 医薬ジャーナル社. 第 50 巻・第 6 号. 2014 年 6 月.</p>
講演	<p>Haraguchi, A., Fukuzawa, M., Nishimura, Y., Motohashi, H., Iwami, S. & Shibata, S. Night eating syndrome's feeding pattern causes depression-like behavior with time-dependence by using a model mouse with night eating syndrome. the XV European Biological Rhythms Society Congress (EBRS 2017). P.27. Academic Medical Centre (Netherlands). August 2017.</p> <p>Haraguchi, A., Fukuzawa, M., Nishimura, Y., Motohashi, H., Iwami, S. & Shibata, S. Night eating syndrome's feeding pattern causes depression-like behavior depends on time by using a model mouse with night eating syndrome. 第 23 回日本時間生物学会学術大会. P094. 名古屋大学. 2016 年 11 月.</p> <p>原口 敦嗣, 高橋 将記, 依田 卓也, 細川 正人, 谷澤 薫平, 樋口 満, 竹山 春子, 柴田 重信. 毛包細胞を用いた時計遺伝子発現パターン解析. 第 3 回アクティブ・エイジング研究所シンポジウム～超高齢社会におけるパラダイムシフト～. アクティブ・エイジング研究所融合研究. 早稲田大学東伏見キャンパス 79 号館(東京). 2015 年 10 月.</p> <p>Haraguchi, A., Nishimura, Y., Fukuzawa, M. & Shibata, S. Effect of social jetlag on rhythm of locomotor activity and biological clock using by social jetlag model mice. UCLA-Waseda University International Training Program 2015. student presentations (1). UCLA (USA). October 2015.</p> <p>Haraguchi, A., Fukuzawa, M., Nishimura, Y., Shibata, S. & Shibata, S. A model mouse with night eating syndrome affects the metabolic energy homeostasis and the central monoamine/peripheral circadian clock system. The 2015 Cold Spring Harbor Asia Conference. Suzhou (China). October 2015.</p> <p>原口 敦嗣, 西村 裕太郎, 高橋 将記, 柴田重信. モデルマウスを用いた社会的時差ボケが体内時計や行動リズムに与える影響に関する検証. 第 26 回霧島神経薬理フォーラム. 一般演題 B-6. 霧島国際ホテル(鹿児島). 2015 年 8 月.</p> <p>原口 敦嗣, 西村 裕太郎, 柴田 重信. 食事時間帯と social jet lag. 日本睡眠学会第 40 回定期学術集会. シンポジウム 2-3. 栃木県総合文化センター. 2015 年 7 月.</p> <p>Haraguchi, A., Shinozaki, A., Yokota, A. & Shibata, S. A model mouse with night eating syndrome affects the metabolic energy homeostasis and the peripheral clock. 第 20 回日本時間生物学会学術大会. P-74. 九州大学医学部 百年講堂(福岡). 2014 年 11 月.</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）
講演	<p>Haraguchi, A., Aoki, N., Ohtsu, T., Ikeda, Y., Tahara, Y. & Shibata, S. Controlling access time to high fat diet during inactive period protects against obesity and abnormal phase-shift of peripheral clock in mice. SRBR 2014. P167. Montana (USA). June 2014.</p> <p>原口 敦嗣, 佐々木 裕之, 田原 優, 柴田 重信. 高脂肪食の摂食量および時間帯のマウス代謝リズムに対する作用. 第 91 回日本生理学会大会. 3P-099. 鹿児島大学. 2014 年 3 月.</p> <p>原口 敦嗣, 斎藤 恵祐, 阿部 真太郎, 中尾 洋一, 井上 真郷, 柴田 重信. 医療用漢方処方箋 100 種の時計遺伝子発現を指標とした多変量解析. 第 6 回生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成支援事業シンポジウム. FBT-1223. 早稲田大学西早稲田キャンパス(東京). 2013 年 12 月.</p> <p>原口 敦嗣, 田原 優, 柴田 重信. in vivo 概日時計測定法と AAV ベクターによる二色同時発光測定系の構築. in vivo イメージングフォーラム 2013. コクヨホール(東京). 2013 年 9 月.</p> <p>原口 敦嗣, 青木 菜摘, 大津 定治, 柴田 重信. 高脂肪食の摂取時刻や摂取タイミングによる体重や脂肪率、末梢時計への影響. 第 67 回 日本栄養・食糧学会大会. 3K-03p. 名古屋大学. 2013 年 5 月.</p> <p>原口 敦嗣, 青木 菜摘, 大津 定治, 柴田 重信. 高脂肪食の摂取時刻や摂取タイミングによる体重や脂肪率、末梢時計への影響. 第 90 回日本生理学会大会. 3PK-186. タワーホール船堀(東京). 2013 年 3 月.</p> <p>原口 敦嗣, 青木 菜摘, 大津 定治, 浜口 雄太郎, 柴田 重信. 高脂肪食の摂食時刻・持続時間の体重や脂肪および末梢時計リズムへの影響. 第 19 回日本時間生物学会学術大会. P077. 北海道大学学術交流会館. 2012 年 9 月.</p>