

博士論文審査報告書

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

2018年2月

多くの動植物は、太陽の日の出と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、実験室のマウスなどは明暗周期がない恒暗条件下でも約 24 時間周期で活動リズム等を示すことが知られており、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時計の働きによって概日リズム変動を示すことが知られている。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。また、時計遺伝子は体内時計制御遺伝子を通して、その下流遺伝子の発現をリズム性に調節している。体内時計制御遺伝子は糖代謝や脂質代謝などエネルギー代謝に関わる遺伝子群の多くを制御するのみならず、セロトニンやノルアドレナリンといったモノアミン代謝に関わる酵素を産生する遺伝子群のなどを制御している。つまり、生理機能の多くは体内時計制御遺伝子を介して日内リズムを示すといえる。

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。中枢時計は、「交感神経・副交感神経」や「ホルモンなどの液性因子」、「摂食行動や運動」などを通して各末梢時計の位相を調節する。すなわち生体は中枢時計と末梢時計が調和した時刻情報を共有することで正常な生理機能を営んでいる。中枢時計は光に強く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はなく、中枢時計を介さずに食事のリズムに同調することも知られている。ヒトを対象とした研究では、食事の時間を遅くすることで、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、血糖値の上がり方が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、一方で概日時計によって代謝機能が制御されていることから、体内時計と食・栄養は相互に影響しあうと考えられている。

肥満やうつ病の患者や、それらのモデル動物の概日時計は乱れているという報告や、逆に *Clock* 変異マウスなど概日リズムが乱れると肥満やうつ病になりやすいという報告があり、両者は互いに密接な関係にある。しかしながら、非活動の給餌、1 日 2 食のモデル食など概日性食事パターンを変えた時の肥満やうつ病との関連に関する報告はほとんどない。本博士論文では、以上の先行研究を含めた背景が第一章に述べられており、第二章以下では、申請者らがマウスを用いて行った、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た研究について述べられている。

第二章では 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（2 時間から 8 時間）の違いが肥満や生理機能や概日時計へどのように影響するかについて調

べた。その結果、活動期と非活動期の給餌時間を 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は増加しなかった。すなわち 4 時間の給餌は高脂肪食を活動期・非活動期のいずれに摂食してもエネルギーの出納バランスが取れた状態となり体重に影響しなかったと推察された。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、脂肪蓄積を加速す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）では、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ることと、末梢時計が非活動期側に位相変動を起こすことの、この 2 つが原因であると考えた。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 8 時間まで延ばすことで、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、位相変動とエネルギー代謝の出納どのよう関わってこのような結果が現れたかを将来的に解明する必要がある。

食事リズムが乱れた病気の一つに「夜食症候群 (Night eating syndrome; NES)」という疾病がある。NES 患者は夕食から入眠までの間にむちゃ食いを行い、そのため 1 日の総摂食カロリー量の約 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いう仮説のもと第三章では、概日性食事パターンが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調べるために NES モデルマウスを開発し、その特徴を調べた。

通常食を自由摂食させつつ非活動期の初期・中期・終期あるいは活動期の時間帯に 5 分間の高脂肪食与えた場合、また非活動期の中期に 60 分から 1 分まで高脂肪食を与えた場合など、各種の給餌条件を検討した。その結果、高脂肪食を非活動期の中期に 5 分間だけ給餌する条件下で飼育したマウスで臨床症状に合致する NES モデルマウスが作成できた。この条件の飼育で、高脂肪食の摂食カロリー量が 1 日の総摂食カロリー量の約 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。次に高脂肪食の摂取量減らすため、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、5 分間給餌の 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。次に、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 をもたらす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。質疑応答では、セロトニンと代謝物の測定の意義、臨床での NES の治療薬を今回の系でも試してみたかどうか、また、NES と躁病との関連はあるのか等が質問された。これらの質問に対して申請者は適宜、適切に回答していた。

第四章では、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、本研究で使用した概日性食事パターンの手法を体内時計と食・栄養との関連性を研究する時間栄養学へ応用することや、本研究成果の NES 患者への応用研究への可能性や意義など、今後の展望について記述した。

以上、概日性食餌パターンの変化が肥満やうつ症状の発症に関わる可能性をマウスのモデル等を作成しながら追求した。特に「早食い肥満モデルの作成」や、「NES モデルの作成」など、申請者の研究アイデアが活かされたモデルとなっており、これらのモデルマウスはこの領域の研究者に利用される可能性が大いにある。最近では体内時計の研究はヒトの健康維持や疾病予防の分野や研究領域に広がりを持ってきており、そのため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
	早稲田大学教授	博士 (理学) 京都大学	岡野 俊行
	早稲田大学教授	博士 (理学) 早稲田大学	朝日 透
	キリン (株) R&D 本部、健康技術研究所、所長 農学博士 (東北大学)		近藤 恵二