

ゴマ由来セサミン類の生理機能発現における
体内時計の役割解明

Elucidation of the role of circadian clock on the
physiological functions of sesame-derived
sesamin isomers

2020年 2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

および東京農工大学大学院生物システム応用科学府

共同先進健康科学専攻 薬物・栄養物効果解析学研究

立石 法史

Norifumi TATEISHI

目次

略号	p.4
第1章 緒言	p.6
1-1. 生理機能と体内時計の関係	
1-2. 時間栄養学と体内時計作用栄養学	
1-3. 脂質代謝と体内時計	
1-4. 体内時計の制御機構	
1-5. セサミン類、その生理機能と脂質代謝との接点	
1-6. 研究課題設定と具体的取り組み	
第2章 時間栄養学的アプローチによるセサミン類と体内時計の関係性検証	p.13
2-1. 高脂肪食負荷モデルラットにおけるセサミン類の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響の検証（1）7日間投与	
2-1.1. 序論	
2-1.2. 実験材料及び方法	
2-1.3. 結果	
2-1.3.1. コレステロール評価指標	
2-1.3.2. トリグリセライド評価指標	
2-1.3.3. その他指標	
2-1.3.4. 結果小括	
2-2. 高脂肪食負荷モデルラットにおけるセサミン類の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響の検証（2）28日間投与	
2-2.1. 序論	
2-2.2. 実験材料及び方法	
2-2.3. 結果	
2-2.3.1. コレステロール評価指標	
2-2.3.2. 転写因子 SREBP2 に対する機能解析	
2-2.3.3. トリグリセライド評価指標	
2-2.3.4. その他指標	
2-2.3.5. 結果小括	

- 2-3. セサミン類の動態に対する投与時刻の及ぼす影響の検証
 - 2-3.1. 序論
 - 2-3.2. 実験材料及び方法
 - 2-3.3. 結果
 - 2-3.3.1. SE の単回投与時の検証結果
 - 2-3.3.2. SE の 28 日間連続投与時の検証結果
 - 2-3.3.3. 結果小括
- 2-4. 高コレステロール負荷モデルラットにおけるセサミン類の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響の検証
 - 2-4.1. 序論
 - 2-4.2. 実験材料及び方法
 - 2-4.3. 結果
 - 2-4.3.1. 体重および摂餌量
 - 2-4.3.2. コレステロール評価指標
 - 2-4.3.3. トリグリセライド評価指標
 - 2-4.3.4. 結果小括
- 2-5. 考察
- 2-6. 小括

第3章 体内時計作用栄養学的アプローチによるセサミン類と

体内時計の関係性検証 p.75

- 3-1. PER2::LUC ノックインマウス *in vivo imaging* を用いたセサミン類の体内時計調節作用の検証
 - 3-1.1. 序論
 - 3-1.2. 実験材料及び方法
 - 3-1.3. 結果
- 3-2. PER2::LUC ノックインマウス MEF を用いた *in vitro* セサミン類の体内時計調節作用の検証
 - 3-2.1. 序論
 - 3-2.2. 実験材料及び方法
 - 3-2.3. 結果
- 3-3. 考察
- 3-4. 小括

第4章 総括 p.92

謝辞

掲載されたジャーナル

引用文献

略号

Abcb11 ; ATP-binding cassette, sub-family B member 11

Abcg5, 8 ; ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5, 8

Acadm ; Acyl-CoA dehydrogenase medium chain

Acat2 ; Acetyl-CoA acetyltransferase 2

Acox1 ; Acyl-CoA oxidase 1

AMP/ATP ; Adenosine monophosphate / Adenosine triphosphate ratio

ANOVA ; Analysis of variance

AUC ; Area under the each compound concentration-time curve

BMAL1 ; Brain and muscle Arnt-like protein

CCGs ; Clock-controlled-genes

Cd36 ; CD36 molecule (thrombospondin receptor)

Cyp7a1 ; Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1

cDNA ; complementary DNA

CLOCK ; Circadian locomotor output cycles kaput

C_{max} ; Maximum blood concentration

Cho ; Cholesterol

CRY ; Cryptochrome

CT ; Circadian time

Dgat1,2 ; Diacylglycerol O-acyltransferase 1,2

DMEM ; Dulbecco's Modified Eagle's Medium

E ; Episesamin

EC-1,-2 ; Episesamin catechol-1, -2

Fasn ; Fatty acid synthase

Gapdh ; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HCD ; High-cholesterol diet

HFD ; High-fat diet

HMGCR ; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

Ldlr ; Low density lipoprotein receptor

Lxr ; Liver X receptor

LC-MS/MS ; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MEF ; Mouse embryonic fibroblasts

MTP ; Microsomal triglyceride transfer protein

NPC1L1 ; Niemann-Pick C1 Like 1

PER2 ; Period 2

PPAR α ; Peroxisome proliferator activated receptor alpha

QRT-PCR ; Quantitative real-time polymerase chain reaction

RNA ; Ribonucleic acid

ROR ; Retinoic Acid-Related Orphan Receptors

S ; Sesamin

SC-1,2 ; Sesamin catechol-1,2

SREBP2 ; Sterol response element binding protein 2

SE ; Sesamin isomers, a mixture of sesamin and episesamin

TG ; Triglyceride

T_{max} ; Time to reach maximum blood concentration

T_{1/2} ; Half life

ZT ; Zeitgeber time

第1章 緒言

1-1. 生理機能と体内時計の関係

生物は地球の自転により、1日おおよそ24時間周期での生活を余儀なくされている。朝が来ると日が昇り、人間のような昼行性生物の場合、日の光が合図となり目が覚め、大半はいわゆるこの日中に活動することが多い。一方、夜には日が落ちて休息を摂り、明日以降の活動に備える。また我々はおおよそ決まった時間にお腹が減り、食事をすることで空腹を満たし、次へのエネルギーを獲得することも行っている。このように私たち生物は、地球の明暗サイクルに適応する形で、いわば無意識に活動、休息、食事等をリズムカルに行っている。それ以外にも、私たちの生理機能に目を向けると、例えば、体温、血流、血圧、尿の産生量等は特に活動時と休息（睡眠）時には大きく異なることが分かっている。メラトニン、コルチゾールなどのホルモン分泌も同様に大きく異なり、例えば前者が入眠時に高くなることから、睡眠ホルモンとして広く知られている (Hastings et al., 2007)。

これらに関連し、各種疾患症状も時間によって異なることが明らかになっている。例えばぜんそく発作やアレルギー疾患時の鼻汁の分泌などは早朝に、リウマチ患者の関節のこわばりも朝に強くなる。一方、がん細胞増殖、コレステロール合成酵素活性が夜間に高まること等もわかっている (Reiter et al., 2011)。このことは、疾患治療にはより望ましい効果的な投薬タイミングが存在するということであり、実際に近年医療の現場では「時間薬理」「時間治療」という概念で、上述の生体リズムに基づいた既存薬の投薬時間帯の最適化、あるいは製剤技術の導入による薬物放出の時間制御を狙った新規剤型の開発等が盛んにおこなわれており、一定の治療成果を挙げている (Ballesta et al., 2017)。また、別の切り口では、体内時計のリズムを担う機構に働きかけて、良質な睡眠を実現する医薬品、例えばラメルテオン(Ramelteon)も開発されている (Neubauer et al., 2008)。つまり、体内時計の観点で改めて整理すると、時間薬理のように疾患がいつ起こりやすいかを理解しその時間帯

を狙うアプローチと、体内時計制御のおおもとに作用し、時計の調節を介して疾患の根治を狙うアプローチに大別できる。

1-2. 時間栄養学と体内時計作用栄養学

先の医薬品の話をも食品に置き換え、食品と体内時計の関係を新たな概念として捉えることができる（図1）。生理機能が発現する時間帯に着目し食品成分のより効果的な摂り方を考える「時間栄養学」と、食品の体内時計機構への働きかけとそれに基づく新たな使い方を考える「体内時計作用栄養学」である（Shibata et al., 2011）。例えば、前者であれば、「食品成分○○の脂肪燃焼効果をより最大限発揮させるためには、朝、昼、夜いずれの摂取がより効果的なのか」という研究課題になるであろうし、後者であれば、「食品成分△△は体内時計調節作用を有するか否か」に始まり、さらには「食品成分△△はその体内時計調節作用に基づいて、健康効能◇◇の用途に応用できないか」等の研究課題になる。

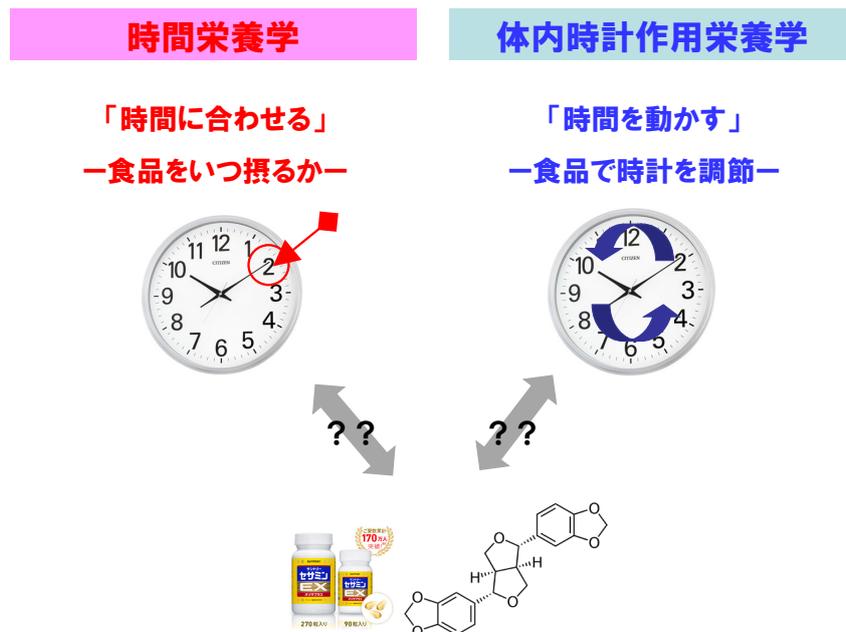


図1. 時間栄養学と体内時計作用栄養学

1-3. 脂質代謝と体内時計

脂質代謝と体内時計の接点に関しては、古くは、血中脂質に概日リズムが認められていることに端を発し (Kuzuya et al., 1972; Schlierf et al., 1973; Durrington et al., 1990)、多くの検証がなされ、糖や脂質の代謝、AMP/ATP 比を始めとする Matabolic Flux 等のエネルギー代謝も分子レベルでリズム性があることが証明され、その意味するところが推察されてきた (Bass et al., 2010; Schug et al., 2011; Gnocchi et al., 2015; McGinnis et al., 2016)。さらに、生活習慣の乱れ、特に食行動の乱れが体内時計機構の乱れを誘発し、生活習慣病の発症や悪性化に影響することも分かってきた (Bass et al., 2012; Bass et al., 2016; Chaix et al., 2014)。そもそも体内時計の存在は、エネルギー代謝、平たくはエネルギー出納の制御のため、と言っても過言ではない。生物は、生命活動を維持するために脂質を始めとするエネルギー源を摂取し、そして消費する。活動と休息が繰り返される中で、エネルギー源を実際に獲得できるのは活動時間帯のみである。一方で、生命活動、つまりエネルギー消費は昼夜問わず行われている。つまりエネルギーの獲得と消費には時間的なアンバランスが生まれており、そこを埋めるためには、エネルギー出納の時間的なめりはりが必要であり、いかに効率良くエネルギー源を吸収し、いかに上手に蓄えるか、そのシステムに体内時計が大きく関与しており、脂質代謝が概日性を持つ理由である。

コレステロール代謝と体内時計の接点も歴史が深い。コレステロール合成酵素である HMG-CoA reductase (HMGCR) の発現や活性にリズム性があること (Kandutsch et al., 1969; Edwards et al., 1972; Tujita et al., 1995)、またそれらの知見を活用しての時間薬理学的アプローチ、例えばコレステロール合成酵素阻害剤のより効果的な投与時刻の検証等が行われてきた (Plakogiannis et al., 2007, Izquierdo-Palomares et al., 2016)。

1-4. 体内時計の制御機構

我々の体の脳、肝臓、腸管、脂肪組織、筋肉、皮膚等あらゆる臓器が体内時計を有している。さらに言うと、私たちの体を構成している 60 兆個におよぶ細胞ひとつひとつに体内時計が存在しており、それらは自律的におおよそ 24 時間のリズムを発振し、またそれらが臓器内あるいは臓器間で連絡し合い、ハーモナイズしながら、上述の睡眠、活動等の行動パターンや、エネルギー代謝、ホルモン分泌などの各種生理機能を発揮している (Bass et al., 2010)。つまり、マイクロからマクロに順を追って考えると、各細胞のリズム発振⇒お互いのハーモナイズ⇒生理機能の出力、ということになる (図 2)。

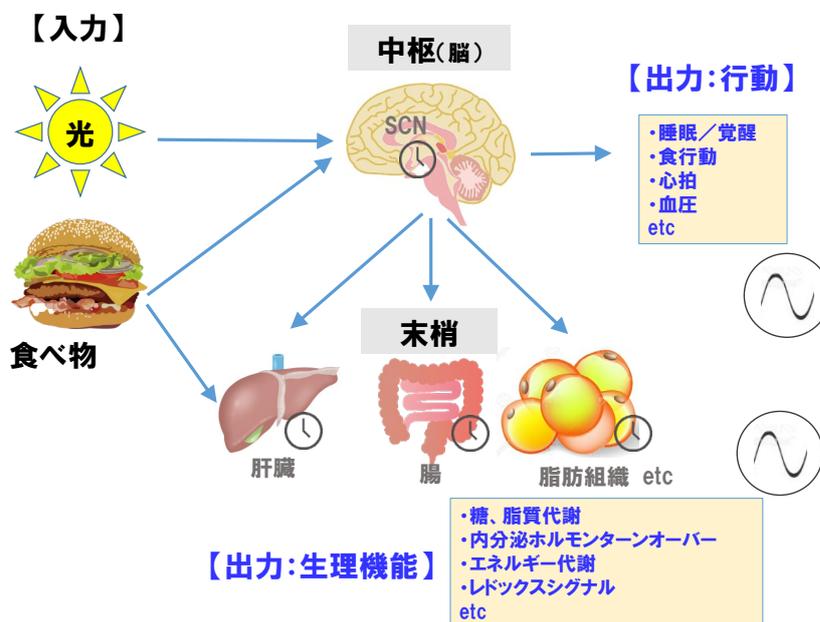


図 2. 中枢時計と末梢時計の連関および生理機能との関係

細胞それぞれがおおよそ 24 時間の周期性、つまり概日リズムを刻む分子機構に関しては、時計遺伝子と呼ばれる一連の分子群がその制御に関与している (図 3)。その中でも中心的な役割を示すのが、BMAL1、CLOCK と呼ばれる概日リズムを正に制御する転写因

子で、これらがヘテロダイマーを形成しその下流の遺伝子群を転写活性化する。*Per*や*Cry*はBMAL1、CLOCKの下流に存在し概日リズムを負に制御しており、これらがフィードバックループを形成することで、各細胞におよそ1日24時間という概日性がもたらされることになる。

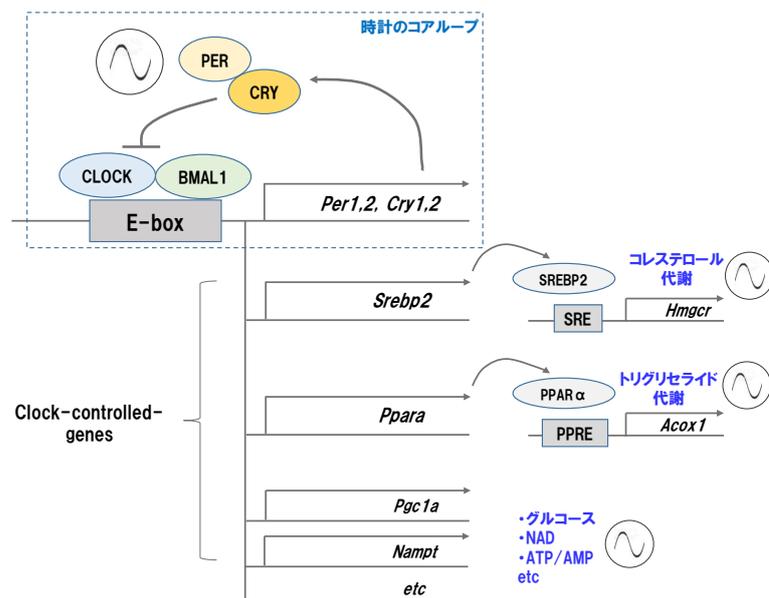


図3. 体内時計の分子機構、core clock およびそれに連動する周辺分子群

さらに、これら時計遺伝子の下流には、Clock-controlled-genes (CCGs)が存在しており、その発現は時計遺伝子に制御されており、結果、その機能にはリズム性がもたらされることになる (Bass et al., 2010; Bozek et al., 2009; Mazzocchi et al., 2012)。先述のコレステロール合成酵素 HMGCR や脂肪酸酸化酵素群は、それぞれ例えば、Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)や Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPAR α)等の転写調節因子で発現調節を受けているが、これら転写因子も CCG として体内時計の制御下にあるため、これら一連の機能発現にリズム性がもたらされる (Le et al., 2009; Oishi et al., 2005; Yang et al., 2006)。

1-5. セサミン類、その生理機能と脂質代謝との接点

セサミン (Sesamin、以下 S) はゴマ種子やゴマ油に含まれるリグナン類の一種であり、当初、高度不飽和脂肪酸であるジホモ γ リノレン酸からアラキドン酸へ変換する不飽和化酵素、 $\Delta 5$ -desaturase の阻害剤として同定された (Shimizu et al., 1989; Shimizu et al., 1991)。S は非焙煎ゴマ油の精製過程において異性化されることでエピセサミン (Episesamin、以下 E) が生成される (Fukuda et al., 1986, 図 4)。つまり、非焙煎ゴマ油は S および E を含み、それらの比率はおよそ 1 : 1 である。このセサミン類 (Sesamin(S)/Episesamin(E) の混合物、以下 SE) の生理作用に関しては、動物およびヒトを用いて過去に多くの研究がなされており (Dar et al., 2013)、抗酸化 (Ikeda et al., 2003)、抗ガン (Hirose et al., 1992)、抗高血圧 (Nakano et al., 2008; Miyawaki et al., 2009)、血中脂質低下作用 (Hirose et al., 1991; Ashakumary et al., 1999; Hirata et al., 1996; Nakabayashi et al., 1995) 等が報告されている。特に S、E、あるいは SE のコレステロール代謝改善効果や中性脂肪低下作用に関しては、その作用メカニズムとしてコレステロール合成酵素 HMGCR の発現抑制や脂肪酸酸化酵素をはじめとする代謝酵素の発現亢進が報告されている (Hirose et al., 1991; Ashakumary et al., 1999; Tsuruoka et al., 2005; Lim et al., 2007; Ide et al., 2009a; Ide et al., 2009b)。

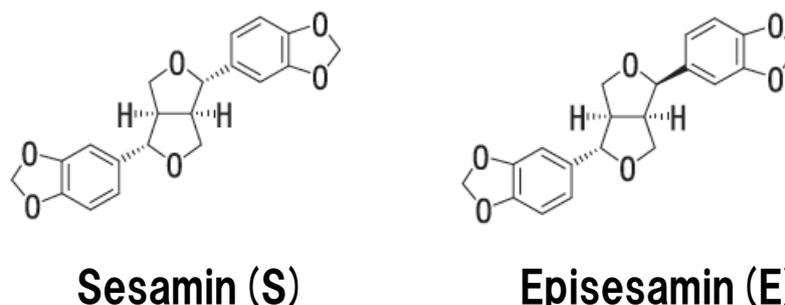


図 4. セサミン (Sesamin(S)) およびエピセサミン (Episesamin(E)) の構造式

1-6. 研究課題設定と具体的取り組み

以上のように、脂質代謝は体内時計との接点が強く、また SE は脂質代謝に影響していることが分かっていることから、SE の脂質代謝に対する作用は投与時刻に影響を受ける可能性が考えられるが、明らかになっていない。同様に、SE の体内時計に及ぼす影響、例えば時計遺伝子の発現に及ぼす影響も不明である。そこで本研究では、時間栄養学的アプローチ（第 2 章）および体内時計作用栄養学的アプローチ（第 3 章）で検証を進めた。

第 2 章では、ラット脂質代謝異常モデルラット（高脂肪食負荷モデル）を中心に、SE の脂質代謝に対する作用が投与時刻に影響を受けるか否か、を検証した。併せて、SE の動態が投与時刻に影響を受けるかも検証した。検証においては、2 つの投与期間（7 日間投与および 28 日間投与）を試験条件に用い、また、投与時刻として、活動期の始め（『朝』を想定）および活動期の終わり（『夕方』を想定）し、これらを比較検討した。

第 3 章では、時計遺伝子の下流にレポーター遺伝子がノックインされた PER2::*LUC* ノックインマウスを用い、*in vivo imaging* 法（検証 3-1）および *in vitro* 法（検証 3-2）にて、SE およびその関連化合物の体内時計調節作用の有無を検証した。

なお、本論文内にて表記する「セサミン類 (SE)」は化合物としての Sesamin(S) および Episesamin(E) のことを指し、健康食品として流通しているサプリメントの商品名とは異なる。

第2章 時間栄養学的アプローチによるセサミン類と体内時計の関係性検証

2-1. 高脂肪食負荷モデルラットにおけるセサミン類の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響の検証（1）7日間投与

2-1.1. 序論

第1章、緒言にて述べた通り、セサミン類（SE）が脂質代謝改善効果を示すこと、および、脂質代謝機構の多くは体内時計の制御下にあることから、SEの脂質代謝に対する作用は投与時刻に影響を受ける可能性が考えられる。そこで本研究では、ラット脂質代謝異常モデルラット（高脂肪食負荷モデル）を用い、SEの脂質代謝に対する作用が投与時刻に影響を受けるか否か、を検証した。まず始めに、投与期間として7日間投与を選択し、また投与時刻として、活動期の始め（ヒトの『朝』を想定）および活動期の終わり（ヒトの『夕方』を想定）し、これらを比較検討した。7日間という投与期間に関しては、過去の社内のラット試験において、正常食を中心とした検証でSEの7日間連続投与が脂肪酸 β 酸化の亢進が確認されていたこと、その β 酸化亢進は先述の通り、PPAR α 経路が密接に関わっており、体内時計制御との接点も強い分子であることから、本投与期間にて検証目的が達成するものと考え選択した。

2-1.2. 実験材料及び方法

【試験サンプル】

本実験では、SEとして sesamin (S) および episesamin (E) がおよそ 1:1 で含まれるセサミン異性体混合物を竹本油脂から購入して使用した。SEが総計でおよそ95%含まれること、SおよびEがおよそ1:1であることを事前にHPLCで確認した。

【実験動物および飼育環境】

全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)に基づき、サントリーホールディングス株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施された。

4 週齢の雄性 SD ラット (日本チャールスリバー (株)) を購入後、3 匹/飼育ケージにて、明暗制御の光環境、室温 23-25°C、湿度 50-70%の飼育環境下、自由摂食および自由飲水で飼育した。なお、Zeitgeber time (ZT)0 を明期開始時刻と定義し、ZT12 を明期終了時刻とした。すべてのラットは実験に使用するまで、最低 1 週間は本飼育環境下で馴化飼育を行った。

【高脂肪食負荷脂質代謝異常モデルラットの確立と SE の評価】

本研究には、脂質代謝異常モデルとして、高脂肪食 (High-fat diet、以下 HFD) 負荷モデルラットを用いた。つまり、4 週齢の雄性 SD ラットを入荷し、2 週間正常食 (CE-2) で環境馴化後、60 カロリー% (35 重量%) の市販 HFD、D12492 (Research Diet Inc.) を用いて HFD 負荷を開始した。

HFD 負荷を 14 日間行ったのち、負荷食は継続しながら、SE 処置群 (SE 群) にはオリーブオイルに加熱溶解し十分に冷ました SE を 100mg/動物体重 kg の用量で経口投与した。対照群には溶媒コントロールとしてのオリーブオイル (Control (CON)群) を経口投与した。投与時刻の影響を検証するため、SE 群、CON 群、それぞれをさらに 2 つに分け、朝投与は ZT13 (活動期の始めを想定)、夕投与は ZT23 (活動期の終わりを想定) とした。試験デザインを図 5 に示す。投与動物の解剖は、比較的短期間 (7 日間) での検証であることを鑑み、投与後のセサミン類の血中濃度が十分に高いことが予想された時間帯である、SE 最終投与後から速やかにサンプリングを開始した。つまり、各処置した動物を最終投与後 3、

6、9 および 12 時間と 3 時間毎に解剖し、採血および肝臓を採材した。N=3/各サンプリングポイントとした。遠心分離後の血漿および肝臓は液体窒素あるいはドライアイスで急速凍結し、-80°Cで保存した。これらはその後の生化学検査および遺伝子発現解析に使用した。

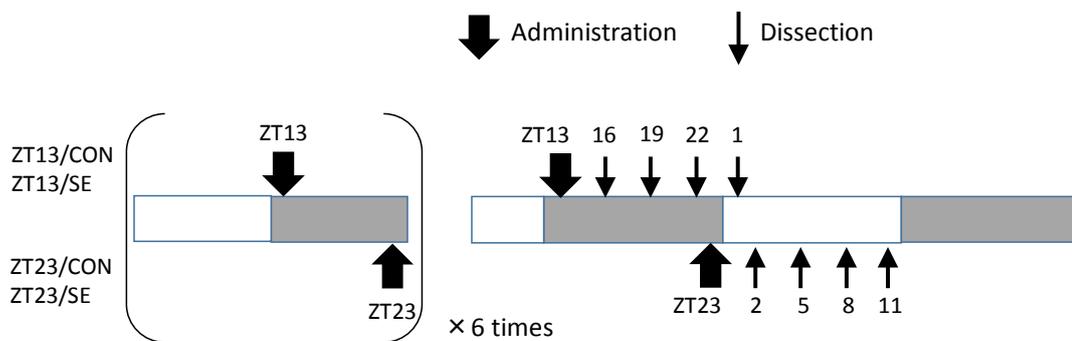


図5. 試験プロトコル (2-1. HFD ラット、SE7 日間連投)

HFD モデルラットにおける SE の脂質代謝への作用に対する投与時刻の及ぼす影響を評価した。詳細は「2-1.2. 実験材料及び方法」を参照。ZT13 あるいは ZT23 にて溶媒コントロールあるいは SE を 7 日間連続投与の後、経時的に解剖した。解剖は各ポイント、各群 3 例ずつ行った。白い帯が明期（非活動期）、グレイの帯が暗期（活動期）、太い矢印は投与時刻を、細い矢印は解剖時刻を示す。ZT13/CON：朝投与コントロール群、ZT13/SE：朝 SE 投与群、ZT23/CON：夕投与コントロール群、ZT23/SE：夕 SE 投与群。

【生化学分析】

血漿および肝臓ホモジネートサンプルを生化学分析に供した。総コレステロール (Total cholesterol、以下 Cho) および中性脂肪 (Triglyceride、以下 TG) は市販の測定キットを用いて定量した (Wako、Japan)。なお、本文内、特段の補足がない限り、Cho は総コレステロールを指す。

【定量的リアルタイム PCR (QRT-PCR) による遺伝子発現評価】

QRT-PCR は常法に従い、TaqMan Gene Expression Assays (ThermoFisher Scientific) システムを用い実施した。本法は、TaqMan プローブを用いて PCR 増幅産物を検出、定量するシステムである。本プローブは 5'末端を蛍光物質で、3'末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドから成り、アニーリングステップにて鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズしている際は、プローブ上の蛍光物質とクエンチャーが近い距離で存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制され、一方、伸長反応ステップでは、Taq DNA ポリメラーゼの 5'→ 3'エキソヌクレアーゼ活性によって鋳型にハイブリダイズした TaqMan プローブが分解され蛍光色素がプローブから遊離、クエンチャーからの距離が離れ、それによる蛍光抑制が解除されるため蛍光を検出できるシステムである。つまり、TaqMan プローブ由来の蛍光をモニターすることで、PCR 増幅産物を定量することが可能となる。

より具体的作業を以下に示す。-80°Cストックの各臓器から Isogen (日本ジーン、Japan) にて total RNA を抽出し、RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) にて精製した。精製後の total RNA 2.0 μ g を鋳型にランダムプライマーを用いた逆転写反応にて cDNA を調製した (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems, Foster City, CA)。遺伝子発現の定量解析のために、ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用い、QRT-PCR にて cDNA を増幅した。全てのプライマー、プローブは TaqMan Gene Expression Assays (ThermoFisher Scientific) より市販品を購入し使用した。使用したプライマーを table1 に示す。なお、table1 には検証 2-1 および 2-2 で用いたものを全て掲載した。なお、購入し table1 に掲載した全ての TaqMan プライマーの情報詳細は、TaqMan Primer ID を用いて Web サイト (<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html>) にて検索、入手可能である。

各サンプル、各遺伝子の発現レベルは Comparative Ct 法にて相対値として算出した。 *Gapdh* を内部標準に用いて各遺伝子発現をノーマライズした後、ZT13/CON group の最初の測定ポイントの遺伝子発現を 1 とした時の相対値を relative expression として表した。なお、代表的な結果とその解析プロセスの実例は「2-2.3. 結果」の項に示した。

Category	Official Symbol	Also known as	Gene ID	Taqman Primer Assay ID	Official Full Name
Cholesterol metabolism	<i>Hmgcr</i>	3H3M	25675	Rn00565598_m1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
Cholesterol metabolism	<i>Ldlr</i>	LDLRA	300438	Rn00598442_m1	low density lipoprotein receptor
Cholesterol metabolism	<i>Srebf2</i>	SREBP2; SREBP-2	300095	Rn01502638_m1	sterol regulatory element binding transcription factor 2
Cholesterol metabolism	<i>Acat2</i>	Acat3; Ab2-076	308100	Rn01526241_g1	acetyl-CoA acetyltransferase 2
Cholesterol metabolism	<i>Abcg5</i>		114628	Rn00587092_m1	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 5
Cholesterol metabolism	<i>Abcg8</i>		155192	Rn00590367_m1	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 8
Cholesterol metabolism	<i>Cyp7a1</i>	CHAP; CYP7; CYP7S1	25428	Rn00564065_m1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1
Cholesterol metabolism	<i>Nr1h3</i>	LXRalpha	58852	Rn00581185_m1	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
Cholesterol metabolism	<i>Npc1l1</i>	NPC1-like 1	432367	Rn01443503_m1	NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1
Triglyceride metabolism	<i>Acadm</i>	MCAD	24158	Rn00566390_m1	acyl-CoA dehydrogenase medium chain
Triglyceride metabolism	<i>Acox1</i>	aCoA; RATACOA1	50681	Rn01645311_g1	acyl-CoA oxidase 1
Triglyceride metabolism	<i>Fasn</i>		50671	Rn00569117_m1	fatty acid synthase
Triglyceride metabolism	<i>Ppara</i>	PPARα	25747	Rn00566193_m1	peroxisome proliferator activated receptor alpha
Triglyceride metabolism	<i>Cd36</i>	Fat; RGD1562323	29184	Rn00580728_m1	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
Triglyceride metabolism	<i>Dgat1</i>	ARAT; Dgat	84497	Rn00584870_m1	diacylglycerol O-acyltransferase 1
Triglyceride metabolism	<i>Dgat2</i>	ARAT; Dgat	252900	Rn01506787_m1	diacylglycerol O-acyltransferase 2
Triglyceride metabolism	<i>Mtp</i>	MTP	310900	Rn01522963_m1	microsomal triglyceride transfer protein
Internal standard	<i>Gapdh</i>	GAPDH	24383	Rn01775763_g1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Table 1. プライマーリスト

【統計解析】

データは平均値±標準誤差で表した。経時変化の各ポイントにおける群間比較は、unpaired two-tailed t test にて実施した。経時変化全体の群間比較は、two-way ANOVA にて有意差検定を行った。 $P<0.05$ を統計学的有意差ありとした。

2-1.3. 結果

2-1.3.1. コレステロール (Cho) 評価指標

血中総 Cho に関しては朝投与でのみ SE 処置による有意な低値が確認された ($P < 0.01$, 2-way ANOVA)。一方、肝中総 Cho は夕投与でのみ有意な低値 ($P < 0.05$, 2-way ANOVA)を示した(図 6a,b)。遺伝子発現解析においては、Cho 合成の律速酵素である *Hmgcr* が SE 朝投与で低値傾向 ($P < 0.1$, 2-way ANOVA)、LDL の肝臓内取り込みに寄与する low density lipoprotein receptor (*Ldlr*) が SE 投与で朝夕ともに低値傾向 ($P < 0.1$, 2-way ANOVA)、また *Hmgcr* や *Ldlr* の発現を制御する転写因子 *Srebp2* は SE の夕投与で有意な低値 ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) が認められた (図 6c,d,e)。

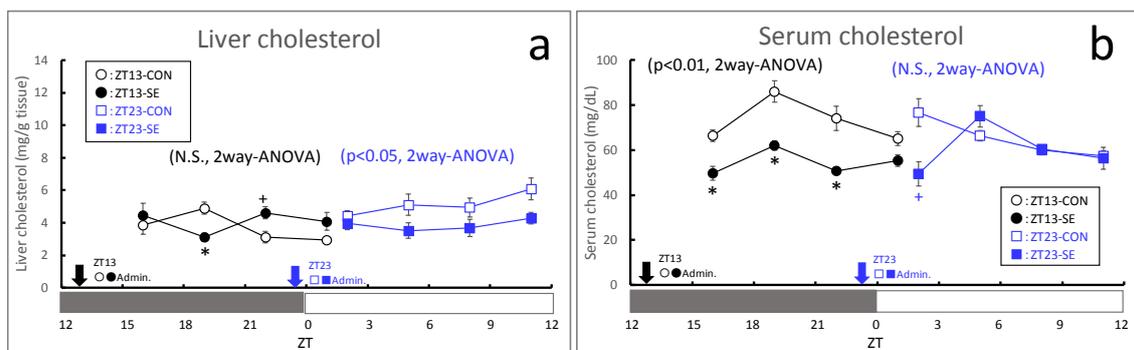


図 6. HFD ラットのコレステロール評価指標および同関連遺伝子発現

に対する SE の投与時刻の影響 <7 日間連続投与>

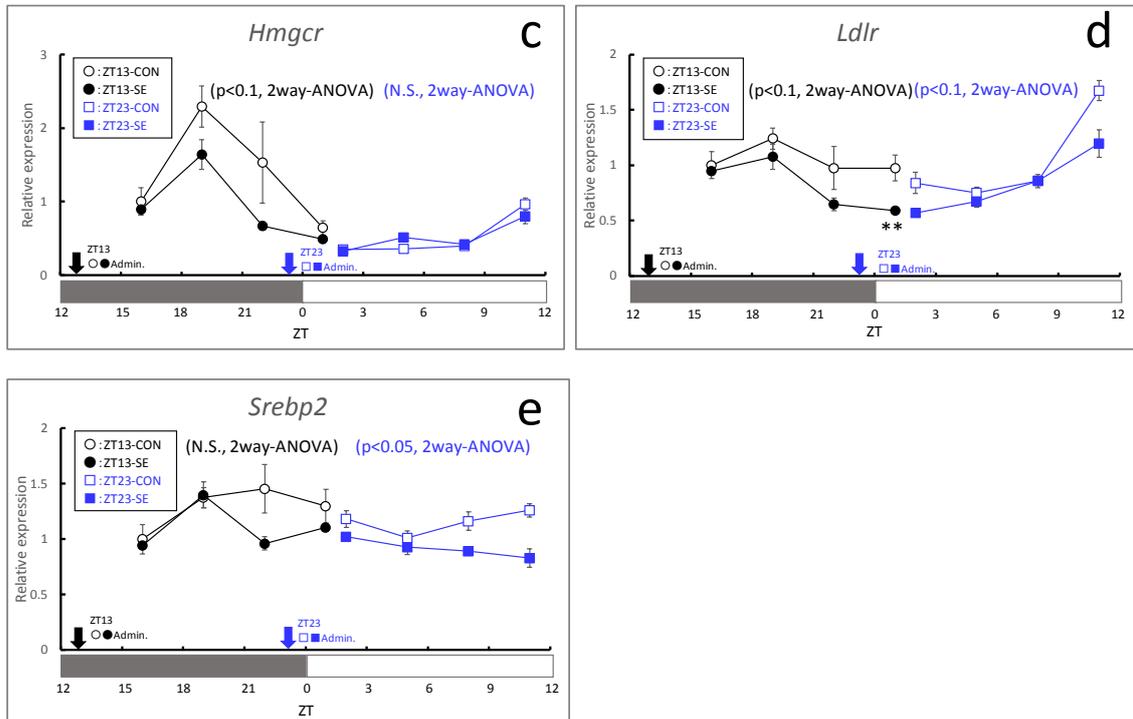


図6. 続き

(a) 肝中総コレステロール、(b) 血中総コレステロール、(c) 肝臓 *Hmgcr* 遺伝子発現、(d) 同 *Ldlr*、(e) 同 *Srebp2*。ZT13 あるいは ZT23 にて溶媒コントロールあるいは SE を 7 日間連続投与の後、経時的に解剖した。詳細は「2-1.2. 実験材料及び方法」を参照。白い帯が明期 (非活動期)、グレイの帯が暗期 (活動期)、黒矢印は朝処置群の投与時刻を、青矢印は夕処置群の投与時刻を示す。黒○ : ZT13-CON (朝投与コントロール群)、黒● : ZT13-SE (朝 SE 投与群)、青□ : ZT23-CON (夕投与コントロール群)、青■ : ZT23-SE (夕 SE 投与群)。平均値 ± 標準誤差、n=3/各サンプリングポイント。** $P<0.01$, * $P<0.05$, + $P<0.1$ vs 各 CON。図内カッコは 2way-ANOVA によるグループ間の検定結果。

2-1.3.2. トリグリセライド (TG) 評価指標

血中 TG は朝夕投与時刻いずれにおいても SE 投与の影響は無かった。肝中 TG は SE 夕投与でのみ低値傾向 ($P<0.1$, 2-way ANOVA) を示したものの、その作用は明確ではなかった (図 7a,b)。遺伝子発現解析においては、脂肪酸 β 酸化系酵素の遺伝子、Acyl-CoA dehydrogenase medium chain (*Acadm*) および Acyl-CoA oxidase 1 (*Acox1*) は朝夕いずれの投与時刻においても SE で有意かつ顕著な高値を ($P<0.01$, 2-way ANOVA)、脂肪酸合成系遺伝子である Fatty acid synthase (*Fasn*) も朝夕両投与時刻においても SE 投与で有意な低値を示した ($P<0.01$, 2-way ANOVA, 図 7c,d,e)。

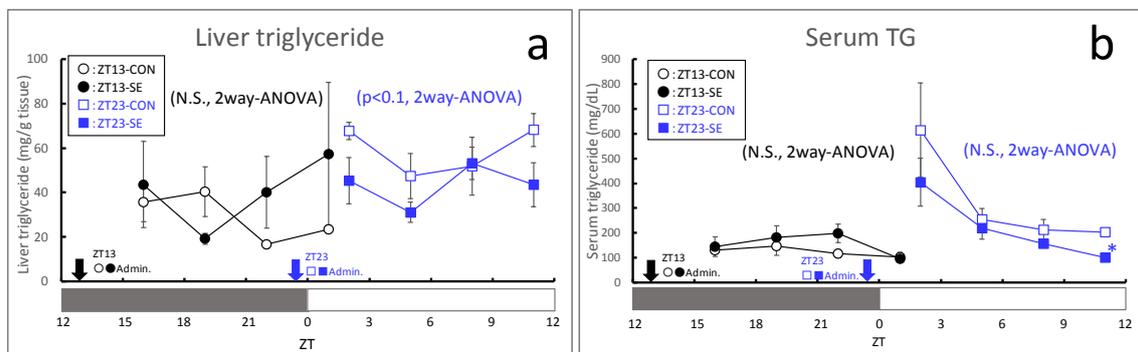


図 7. HFD ラットのトリグリセライド評価指標および同関連遺伝子発現
に対する SE の投与時刻の影響 <7 日間連続投与>

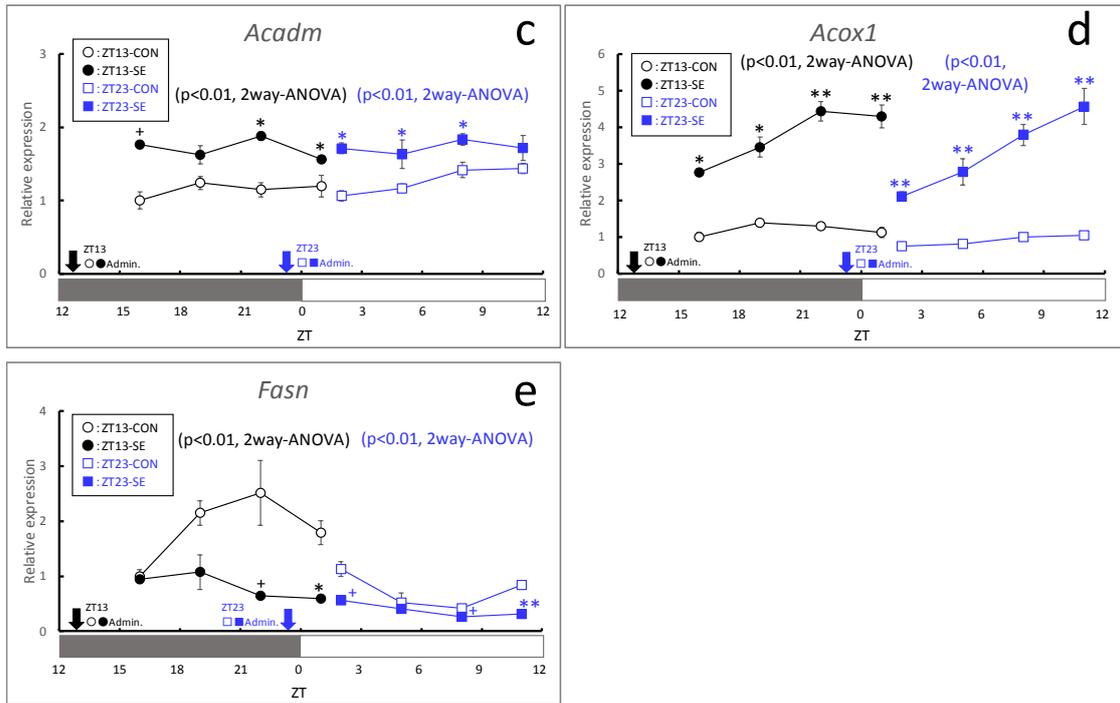


図7. 続き

(a) 肝中トリグリセライド、(b) 血中トリグリセライド、(c) 肝臓 *Acadm* 遺伝子発現、(d)

同 *Acox1*、(e) 同 *Fasn*。その他図表内説明は「図6」を参照。

2-1.3.3. その他指標

摂餌量は SE の朝投与で低値傾向にあったが、体重、摂餌量に関して SE およびその比較対照の間で、あるいは投与時刻によって有意な影響を受けなかった (図 8a,b)。また、相対肝重量が SE 投与で有意な高値が認められたが、投与時刻の影響は確認されなかった (図 8,c)。

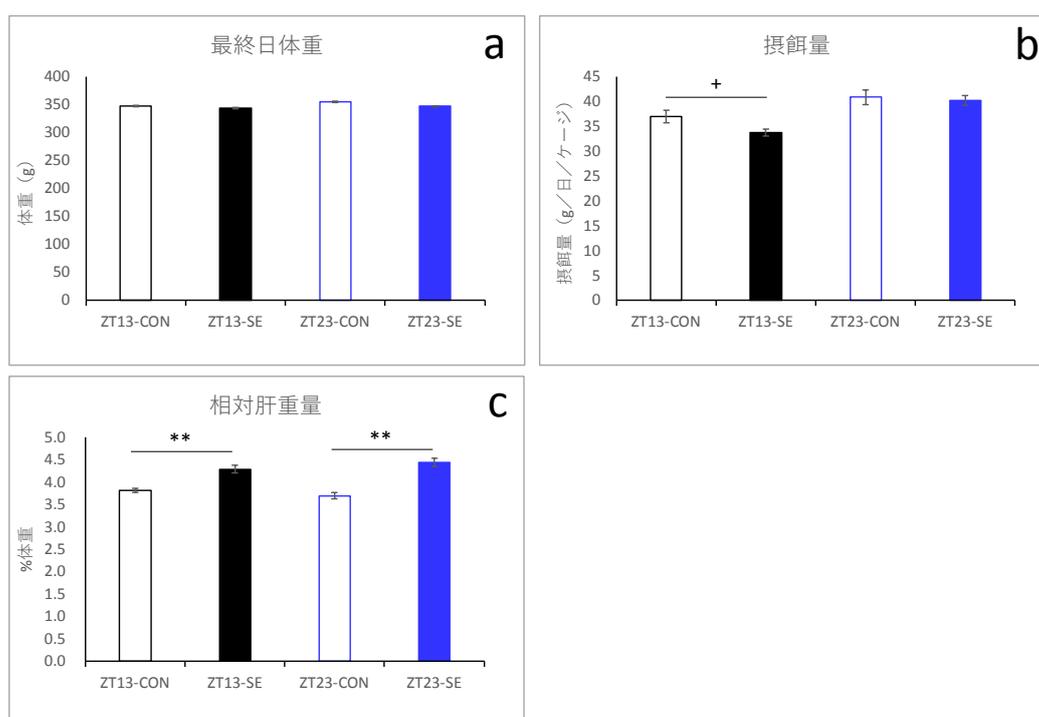


図 8. HFD ラットの体重、摂餌量、相対肝重量に対する SE の投与時刻の影響

<7 日間連続投与>

(a) 最終日体重、(b) 摂餌量、(c) 相対肝重量。図内カラム左から、ZT13-CON (朝投与コントロール群)、ZT13-SE (朝 SE 投与群)、ZT23-CON (夕投与コントロール群)、ZT23-SE (夕 SE 投与群)。平均値±標準誤差、n=12/各群 (9a,9c)、n=4/各群 (9b)。** $P<0.01$, + $P<0.1$ 、各 CON に対する T-test。

2-1.3.4. 結果小括

Cho および TG 評価指標の結果のまとめを table2 に示す。本 7 日間投与条件においては、SE で Cho 代謝指標を全般に変化させる方向にあるもののその作用は顕著ではなく、投与時刻依存性についても一定の方向性は認めがたかった。また TG 指標については血中および肝臓のそれに対し明らかな影響を示さなかった。一方で、特に脂肪酸酸化系遺伝子の発現は SE で顕著な亢進を示したが、投与時刻依存性は認めなかった。

以上、本試験結果からは、SE の脂質代謝に対する作用における投与時刻依存性の判断には至らなかった。

			朝投与 (ZT13)		夕投与 (ZT23)
コレステロール 代謝	主評価	肝中Cho	影響無し	<	低値(p<0.05)
		血中総Cho	低値(p<0.01)	>	影響無し
	遺伝子発現	合成 (<i>Hmgcr</i>)	抑制傾向(p<0.1)	>	影響無し
		取り込み (<i>Ldlr</i>)	抑制傾向(p<0.1)	=	抑制傾向(p<0.1)
		転写因子 (<i>Srebp2</i>)	影響無し	<	低値(p<0.05)
	トリグリセライド 代謝	主評価	肝中TG	影響無し	<
血中TG			影響無し	=	影響無し
遺伝子発現		β酸化 (<i>Acadm</i>)	低値(p<0.01)	=	低値(p<0.01)
		β酸化 (<i>Acox1</i>)	低値(p<0.01)	=	低値(p<0.01)
		合成 (<i>Fasn</i>)	低値(p<0.01)	=	低値(p<0.01)

Table 2. 7 日間投与実験における Cho および TG 評価指標のまとめ

不等号は各評価指標に対しての朝あるいは夕投与の SE の影響の大小を意味する。

2-2. 高脂肪食負荷モデルラットにおけるセサミン類の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響の検証（2）28日間投与

2-2.1. 序論

2-1の検討において、本モデルラットの各評価指標はSEの7日間投与ではその変化は大きくなく、結果、SEの投与時刻依存性の判断も難しかった。これを受けて、SEのラットの先行研究情報を再度洗い直し(Ashakumary et al., 1999; Lim et al., 2007; Ide et al., 2009)、7日間という投与期間はSEの生理学的影響を確認する上ではやや短かった可能性を考え、SEの作用がより明確に検出されることを期待し、投与期間を28日間に延長し、評価項目も一部改変、追加して、次の実験に進んだ。

2-2.2. 実験材料及び方法

【試験サンプル】

第2章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【実験動物および飼育環境】

全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)に基づき、サントリーホールディングス株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施された。以下、第2章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【高脂肪食負荷脂質代謝異常モデルラットの確立とSEの評価】

基本操作は、第2章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。投与時刻に関しては、朝投与はZT14(活動期の始めを想定)、夕投与はZT22(活動期の終わりを想定)とした。試験デザインを図9に示す。投与動物の解剖に関しては、検証2-1と比較

して本条件では長期連投（28日間）後の動物であることを考慮し、最終投与後の血中 SE が高すぎることによる生理作用の高止まり、その結果としての投与時刻依存性の差異が見えにくくなることも予想されたため、2-1.2.と異なり、最終投与から8時間間隔を空けて、SEの連続投与後の直接的な影響を排除できるような解剖とした。つまり、各処置した動物を最終投与後8、12、16 および20 時間と4 時間毎に解剖し、採血および各臓器（肝臓、精巣周囲脂肪、腸）を採材した。N=3~5/各サンプリングポイントとした。その他の操作は第2章2-1.2.「実験材料及び方法」の項で記載の通り。

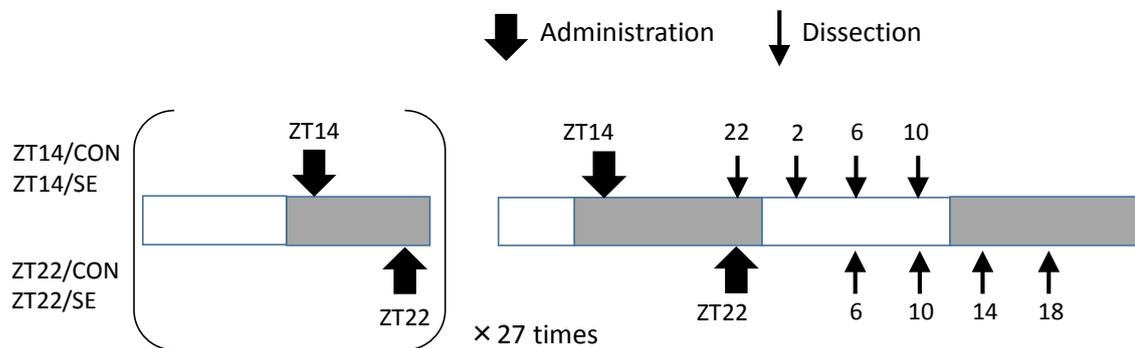


図9. 試験プロトコル (2-2. HFD ラット、SE28 日間連投)

HFD モデルラットにおける SE の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響を評価した。詳細は「2-2.2. 実験材料及び方法」を参照。ZT14 あるいは ZT22 にて溶媒コントロールあるいは SE を 28 日間連続投与の後、経時的に解剖した。解剖は各ポイント、各群 3-5 例ずつ行った。その他の図表内説明は「図5」を参照。ZT14/CON：朝投与コントロール群、ZT14/SE：朝 SE 投与群、ZT22/CON：夕投与コントロール群、ZT22/SE：夕 SE 投与群。

【生化学分析】

第2章 2-1.2.「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【定量的リアルタイム PCR (QRT-PCR) による遺伝子発現評価】

第2章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。ただし、検証 2-2 においては、ZT14/CON group の最初の測定ポイントの遺伝子発現を 1 とした時の相対値を relative expression として表した。

【SREBP2 経路の活性化評価】

SE の構成成分である S および E について、コレステロール代謝関連分子の発現制御に深くかかわる SREBP2 機能に対する影響を評価するため、PathHunter® eXpress SREBP2 Nuclear Translocation Assay system (Eurofin DiscoverX Co.) を使用した。本システムは SREBP2 経路が活性化する際の必須のイベントである、SREBP2 分子の細胞質から核内への移行をモニターできるもので (図 10)、試験サンプルが SREBP2 経路と相互作用しうるかを評価できるものである。本システムにおいて、S および E の作動活性および作動拮抗活性を評価した。

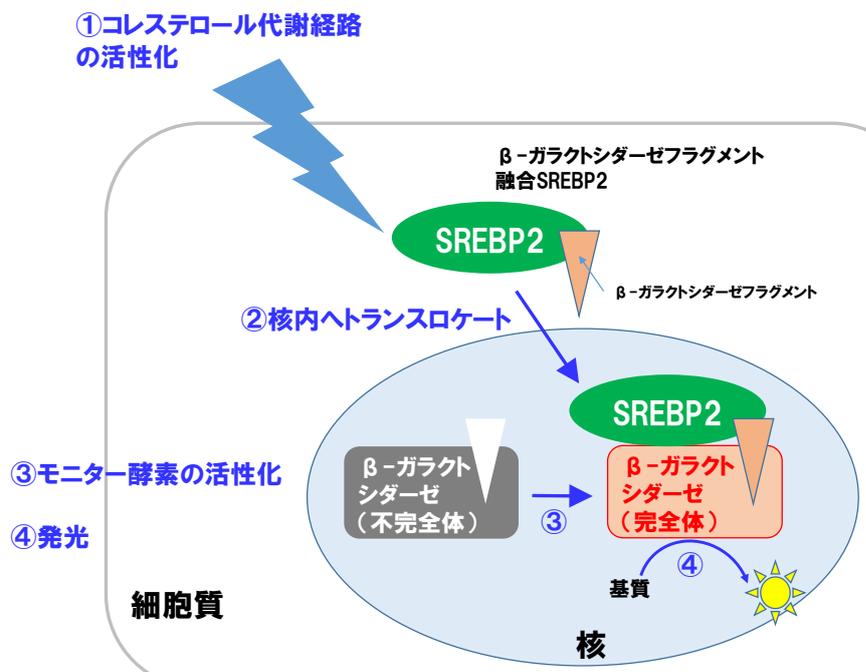


図 10. SREBP2 Nuclear Translocation Assay system

【統計解析】

データは平均値±標準誤差で表した。経時変化の各ポイントにおける群間比較は、unpaired two-tailed t test にて実施した。経時変化全体の群間比較は、two-way ANOVA にて有意差検定を行った。 $P<0.05$ を統計学的有意差ありとした。

2-2.3. 結果

2-2.3.1. コレステロール (Cho) 評価指標

Cho 代謝指標は 2-1.の 7 日間連続投与時の結果と比較して全般的に SE の影響をより顕著に受けた。つまり、肝中総 Cho は朝夕両時刻帯での SE 投与で有意な低値 ($P<0.01, 2\text{-way ANOVA}$) を示し、その抑制率は朝投与でより大きかった (朝: 46%阻害、夕: 40%阻害)。血中総 Cho に関しては朝投与でのみ SE 処置による有意な低値が確認された ($P<0.01, 2\text{-way ANOVA}$, 図 11a,b)。

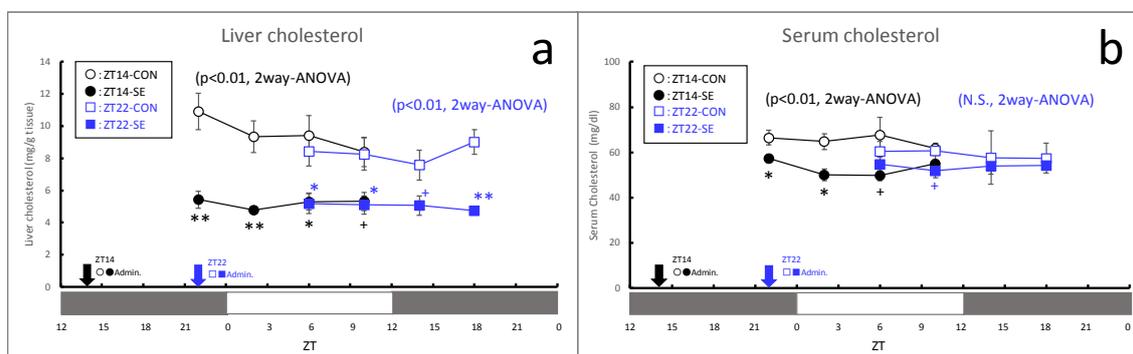


図 11. HFD ラットのコレステロール評価指標に対する SE の投与時刻の影響

< 28 日間連続投与 >

(a) 肝中コレステロール、(b) 血中コレステロール。ZT14 あるいは ZT22 にて溶媒コントロールあるいは SE を 28 日間連続投与の後、経時的に解剖した。詳細は「2-2.2. 実験材料及び方法」を参照。黒○: ZT14-CON (朝投与コントロール群)、黒●: ZT14-SE (朝 SE 投与群)、青□: ZT22-CON (夕投与コントロール群)、青■: ZT22-SE (夕 SE 投与群)。平均値±標準誤差、n=3-5/各サンプリングポイント。** $P<0.01$, * $P<0.05$, + $P<0.1$ vs 各 CON。図内カッコは 2way-ANOVA によるグループ間の検定結果。その他の図表内説明は「図 6」を参照。

遺伝子発現解析の結果提示に先立ち、遺伝子解析プロセスを *Hmgcr* の解析を実例に以下図 12 に示す。

TaqMan Gene Expression Assays を用い、標的遺伝子 *Hmgcr* の PCR 増幅産物指標である蛍光シグナル曲線を得た (図 12a)。増幅がプラトーになる前の線形性を示す部分で Threshold を設定し、そこに至るまでの増幅サイクル数である Ct 値を得た (図 12b,c)。内部標準遺伝子である *Gapdh* についても同様のプロセスを経て Ct 値を得た (図 12d,e,f)。標的遺伝子の Ct 値と内部標準遺伝子の Ct 値の差分から、標的遺伝子の相対的な発現量をノーマライズ、数値化し (図 12g,h)、さらに、ZT14/CON group の最初の測定ポイントの遺伝子発現を 1 とした時のそれぞれの遺伝子発現レベルの相対値を算出(図 12h 内、赤棒)、relative expression として表し、本数字を基にグラフ化した (図 13a)。本論文内の遺伝子解析の結果はいずれも上述と同様の解析プロセスを経て得られたものである。

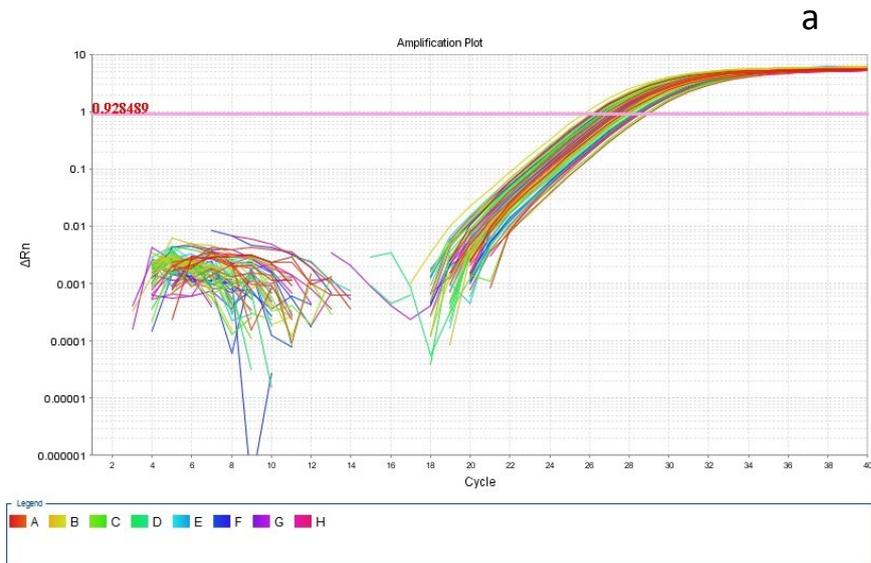


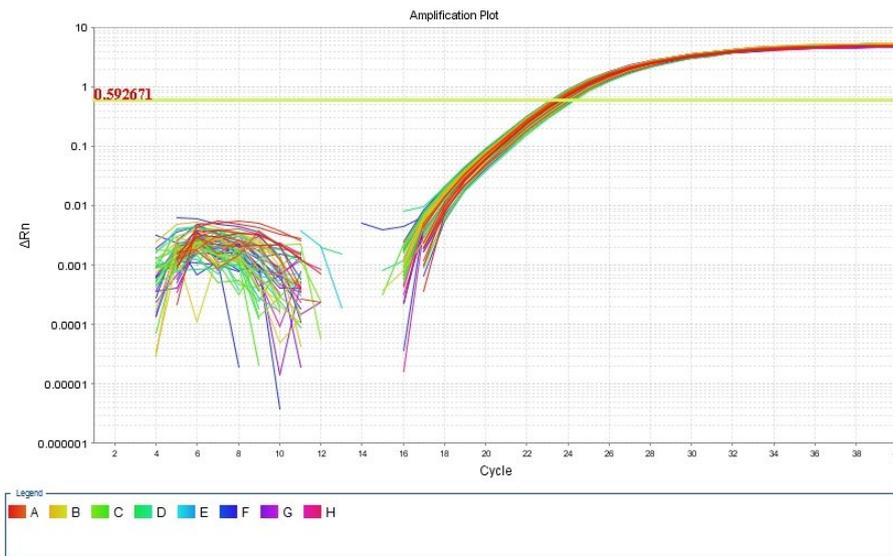
図 12a. 標的遺伝子 *Hmgcr* の PCR 増幅産物 蛍光量曲線



図 12b. 標的遺伝子 *Hmgcr* の Ct 値 (Threshold Cycle 数) と Plate 配置

Sample No	Target	Na Task	Reporter	Quencher	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	Ct Mean	Ct SD	Act1	Act1 Mean	Act1 SE	HK Control	HK Control	AutoCt	Automatic	Ct Thresh	Automatic	Baseline	S Baseline	E Efficiency	Comments
A1	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.11938	26.11938								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
A3	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.66011	27.66011								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B3	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.20079	27.20079								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B11	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.33333	26.33333								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
B19	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.32588	27.32588								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C3	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.76546	26.76546								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D2	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.88504	26.88504								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
D18	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.29988	27.29988								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
A4	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.9523	26.9523								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
B4	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.55679	27.55679								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
A10	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.30433	27.30433								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B12	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.77421	27.77421								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C1	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.60067	27.60067								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C9	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.0541	26.0541								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D3	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.87127	27.87127								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
D11	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				25.87184	25.87184								TRUE	0.928489	TRUE	3	18	1	
D19	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.38736	26.38736								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
A3	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.81788	26.81788								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
A11	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.50462	27.50462								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B5	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.33811	27.33811								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B13	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.61999	27.61999								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C2	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.88164	26.88164								TRUE	0.928489	TRUE	3	22	1	
C18	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.94268	26.94268								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D4	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.71856	26.71856								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
D12	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.32389	26.32389								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D20	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.6086	26.6086								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
A4	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.76305	26.76305								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
A12	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.26629	27.26629								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
B6	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.32264	26.32264								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
B14	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.00055	26.00055								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C3	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.76933	27.76933								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C11	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.04391	26.04391								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D5	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.83887	27.83887								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
D13	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.80206	26.80206								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
A5	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.15217	27.15217								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
A13	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.20787	27.20787								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B7	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.81855	27.81855								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B15	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.33833	26.33833								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
C4	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.78384	27.78384								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
C12	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.30045	26.30045								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D6	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.2204	27.2204								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
D14	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.50073	26.50073								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
A6	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.27788	26.27788								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
A14	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.30414	27.30414								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B8	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.34835	26.34835								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
B16	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.18818	26.18818								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
C5	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.70191	27.70191								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C13	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.45488	26.45488								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
D7	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.44047	27.44047								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
D15	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.52202	26.52202								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
A7	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.1036	27.1036								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B1	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.49779	26.49779								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
B9	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.36473	26.36473								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
B17	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.80727	27.80727								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
C6	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.1201	26.1201								TRUE	0.928489	TRUE	3	18	1	
C14	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.24206	26.24206								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D8	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.22209	27.22209								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
D16	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.85466	26.85466								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
B2	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.45509	27.45509								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B10	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.02501	27.02501								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	
B18	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.46887	26.46887								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
C7	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.04211	27.04211								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D1	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.80787	26.80787								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D9	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				26.50718	26.50718								TRUE	0.928489	TRUE	3	21	1	
D17	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.04371	27.04371								TRUE	0.928489	TRUE	3	19	1	
D17	Hmgcr	UNKNOW	FAM	NFQ-MGE				27.03014	27.03014								TRUE	0.928489	TRUE	3	20	1	

図 12c. 標的遺伝子 *Hmgcr* の Ct 値リスト



d

図 12d. 内部標準遺伝子 *Gapdh* の PCR 増幅産物 蛍光量曲線

e

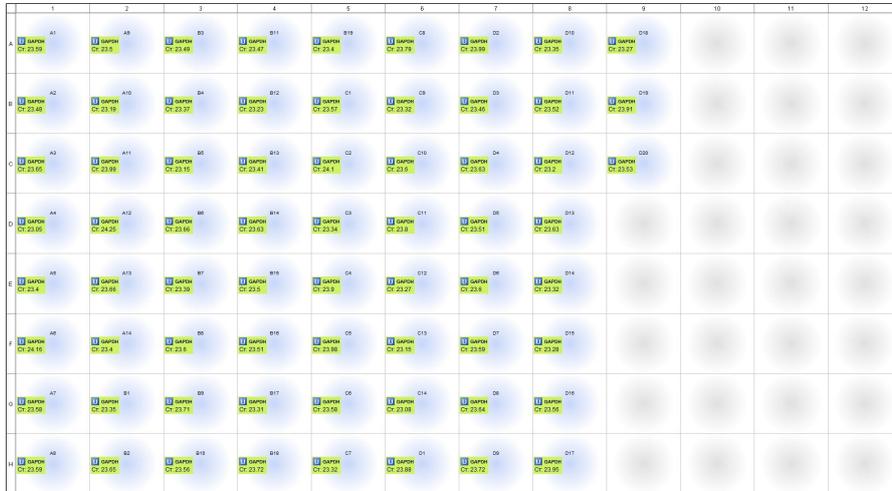


図 12e. 内部標準遺伝子 *Gapdh* の Ct 値 (Threshold Cycle 数) と Plate 配置

Well	Sample No	Target Name	Task	Reporter	Quaracter	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	Ct Mean	Ct SD	ACT	ACT Mean	ACT SE	HK Control	HK Control	AutoGate	Ct Threshold	Automatic	Baseline	Efficiency	Comments	
A1	A1	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5866	23.5866								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
B1	A2	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4508	23.4508								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
C1	A3	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.6576	23.6576								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
D1	A4	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.0459	23.0459								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
E1	A5	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4011	23.4011								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
F1	A6	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					24.1537	24.1537								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
G1	A7	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5008	23.5008								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
H1	A8	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5927	23.5927								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
I1	A9	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4968	23.4968								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
J1	A10	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.1943	23.1943								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
K1	A11	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.9051	23.9051								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
L1	A12	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					24.2547	24.2547								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
M1	A13	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.0505	23.0505								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
N1	A14	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4038	23.4038								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
O1	B1	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3476	23.3476								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
P1	B2	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8462	23.8462								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
Q1	B3	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4902	23.4902								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
R1	B4	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3703	23.3703								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
S1	B5	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.1644	23.1644								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
T1	B6	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8930	23.8930								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
U1	B7	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3942	23.3942								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
V1	B8	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8048	23.8048								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
W1	B9	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.7981	23.7981								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
X1	B10	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5649	23.5649								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
Y1	B11	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4871	23.4871								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
Z1	B12	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.2278	23.2278								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AA1	B13	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4828	23.4828								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AB1	B14	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.6203	23.6203								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AC1	B15	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.9203	23.9203								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AD1	B16	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5142	23.5142								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AE1	B17	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.9051	23.9051								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AF1	B18	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.7249	23.7249								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AG1	B19	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3854	23.3854								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AH1	C1	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.9727	23.9727								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AI1	C2	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					24.0907	24.0907								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
AJ1	C3	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3402	23.3402								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AK1	C4	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.9051	23.9051								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
AL1	C5	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8028	23.8028								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
AM1	C6	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5841	23.5841								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AN1	C7	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3789	23.3789								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AO1	C8	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.7936	23.7936								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AP1	C9	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.2238	23.2238								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AQ1	C10	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5979	23.5979								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AR1	C11	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.7977	23.7977								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AS1	C12	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.2693	23.2693								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AT1	C13	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.1404	23.1404								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AU1	C14	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.0798	23.0798								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AV1	D1	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8609	23.8609								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
AW1	D2	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.9911	23.9911								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
AX1	D3	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.4505	23.4505								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AY1	D4	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8324	23.8324								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
AZ1	D5	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.9051	23.9051								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BA1	D6	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8038	23.8038								TRUE	0.92071	TRUE	3	17	1
BB1	D7	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8054	23.8054								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BC1	D8	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8405	23.8405								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BD1	D9	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.7162	23.7162								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BE1	D10	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3497	23.3497								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BF1	D11	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8262	23.8262								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BG1	D12	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.1991	23.1991								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BH1	D13	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8297	23.8297								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BI1	D14	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.3245	23.3245								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BJ1	D15	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.2803	23.2803								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BK1	D16	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5512	23.5512								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BL1	D17	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8541	23.8541								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BM1	D18	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.2748	23.2748								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BN1	D19	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.8002	23.8002								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1
BO1	D20	GAPDH	UNKNOWFAM	NFO-MISE					23.5316	23.5316								TRUE	0.92071	TRUE	3	16	1

図 12f. 内部標準遺伝子 *Gapdh* の Ct 値リスト

Sample	ID	Detector	Task	Ct	Ct Avg	Ct SD	Avg Delta Ct	delta Ct SD	delta delta Ct	RQ	RQ Min	RQ Max	+SD	-SD
A	1	Gapdh	Target	23.9453299	23.4447095	0.27406629								
A	2	Gapdh	Target	23.4099183										
A	3	Gapdh	Target	23.6519565										
A	4	Gapdh	Target	23.6632644										
A	5	Gapdh	Target	23.4011097	23.68306255	0.328727917								
A	6	Gapdh	Target	24.1583956										
A	7	Gapdh	Target	23.6507352										
A	8	Gapdh	Target	23.5839924										
A	9	Gapdh	Target	23.4980062	23.5954606	0.404279798								
A	10	Gapdh	Target	23.1904359										
A	11	Gapdh	Target	23.95160787										
A	12	Gapdh	Target	24.25247452	23.77083507	0.43827707								
A	13	Gapdh	Target	23.6562439										
A	14	Gapdh	Target	23.6238286										
B	1	Gapdh	Target	23.2879259	23.40546773	0.18322308								
B	2	Gapdh	Target	23.64941978										
B	3	Gapdh	Target	23.4004661										
B	4	Gapdh	Target	23.7030411										
B	5	Gapdh	Target	23.1543456										
B	6	Gapdh	Target	23.6099867	23.5899262	0.121534921								
B	7	Gapdh	Target	23.38145279										
B	8	Gapdh	Target	23.6467911										
B	9	Gapdh	Target	23.70810318										
B	10	Gapdh	Target	23.9499337										
B	11	Gapdh	Target	24.6711349	24.46324748	0.146139775								
B	12	Gapdh	Target	23.2279601										
B	13	Gapdh	Target	23.4837356										
B	14	Gapdh	Target	23.6290215										
B	15	Gapdh	Target	23.60274021										
B	16	Gapdh	Target	23.1541685	23.48473113	0.18055148								
B	17	Gapdh	Target	23.3020543										
B	18	Gapdh	Target	23.7493921										
B	19	Gapdh	Target	23.3827200										
C	1	Gapdh	Target	23.5727218	23.72809639	0.33780543								
C	2	Gapdh	Target	24.0370523										
C	3	Gapdh	Target	23.3402002										
C	4	Gapdh	Target	23.8000916										
C	5	Gapdh	Target	23.8629517	23.66859341	0.203641626								
C	6	Gapdh	Target	23.54812116										
C	7	Gapdh	Target	23.3156465										
C	8	Gapdh	Target	23.78795433										
C	9	Gapdh	Target	23.3243428	23.57226630	0.238819167								
C	10	Gapdh	Target	23.9779004										
C	11	Gapdh	Target	23.78916373										
C	12	Gapdh	Target	23.6531659	23.14683981	0.094546687								
C	13	Gapdh	Target	21.14934349										
C	14	Gapdh	Target	23.2213578										
D	1	Gapdh	Target	23.6828606	23.6938131	0.233290341								
D	2	Gapdh	Target	23.9111003										
D	3	Gapdh	Target	23.4515813										
D	4	Gapdh	Target	23.6284465										
D	5	Gapdh	Target	23.6586604										
D	6	Gapdh	Target	23.6939314	23.7883952	0.138988698								
D	7	Gapdh	Target	23.5854677										
D	8	Gapdh	Target	23.6100004										
D	9	Gapdh	Target	23.1160268										
D	10	Gapdh	Target	23.3487007										
D	11	Gapdh	Target	23.5232419	23.29107008	0.178458281								
D	12	Gapdh	Target	23.18916344										
D	13	Gapdh	Target	23.6282838										
D	14	Gapdh	Target	23.5494709										
D	15	Gapdh	Target	23.393421										
D	16	Gapdh	Target	23.3551168	23.4452248	0.20548649								
D	17	Gapdh	Target	23.5443816										
D	18	Gapdh	Target	23.2714827										
D	19	Gapdh	Target	23.5926241										
D	20	Gapdh	Target	23.5318499										

8

図 12g. 解析シート (Gapdh)

Sample	ID	Detector	Task	Ct	Ct Avg	Ct SD	Avg Delta Ct	delta delta Ct	RQ	RQ Min	RQ Max	+SD	-SD	
A	1	Hmgcr	Target	26.11918449	26.81472731	0.588811166	3.371256351		0.442887	0.735671	0.590362	0.916747	0.181075	0.145309
A	2	Hmgcr	Target	27.53978402										
A	3	Hmgcr	Target	26.81786254										
A	4	Hmgcr	Target	26.76304817	27.49718571	0.543199225	3.814123154							
A	5	Hmgcr	Target	26.27787781										
A	6	Hmgcr	Target	27.10380146										
A	7	Hmgcr	Target	27.453082338										
A	8	Hmgcr	Target	27.66011047	27.58868735	0.257468744	4.030139287		0.658883	0.633369	0.522832	0.76729	0.133921	0.110547
A	9	Hmgcr	Target	27.30423464										
A	10	Hmgcr	Target	27.60481893										
A	11	Hmgcr	Target	27.36628723	27.32276853	0.037818443	3.581943461		0.180687	0.882283	0.740588	1.051088	0.168806	0.141695
A	12	Hmgcr	Target	27.25787445										
A	13	Hmgcr	Target	27.20412523										
A	14	Hmgcr	Target	26.89776205	27.29478828	0.436641531	3.892390551		0.521074	0.696653	0.601718	0.807029	0.110176	0.085135
A	15	Hmgcr	Target	27.32506687										
A	16	Hmgcr	Target	27.20976546										
A	17	Hmgcr	Target	27.30529785										
A	18	Hmgcr	Target	26.32264028	26.26490876	0.255402636	4.678686142		1.20743	0.40404	0.370115	0.441075	0.037036	0.033923
A	19	Hmgcr	Target	27.8185482										
A	20	Hmgcr	Target	28.34835434										
B	1	Hmgcr	Target	26.36473702										
B	2	Hmgcr	Target	26.48887398										
B	3	Hmgcr	Target	28.33323206	28.03088188	0.325211756	4.584634399		1.213378	0.431258	0.386134	0.481855	0.050397	0.045124
B	4	Hmgcr	Target	27.74202968										
B	5	Hmgcr	Target	27.61968749										
B	6	Hmgcr	Target	28.09054756										
B	7	Hmgcr	Target	26.36323232										
B	8	Hmgcr	Target	26.18582298	27.59022141	0.507368885	4.105468273		0.734212	0.601146	0.498795	0.7245	0.123353	0.102351
B	9	Hmgcr	Target	27.80272624										
B	10	Hmgcr	Target	27.84218264										
B	11	Hmgcr	Target	27.32567787										
B	12	Hmgcr	Target	27.6067279	27.59887037	0.59727529	4.27077198		0.899516	0.530667	0.422608	0.679986	0.14392	0.113459
B	13	Hmgcr	Target	26.81876753										
B	14	Hmgcr	Target	27.76932289										
B	15	Hmgcr	Target	27.78383827										
B	16	Hmgcr	Target	27.70100764	26.89672892	0.805868746	3.228135109		-0.14312	1.04292	0.87577	1.39244	0.288152	0.228522
B	17	Hmgcr	Target	26.23247337										
B	18	Hmgcr	Target	26.86796951										
B	19	Hmgcr	Target	26.15463333										
B	20	Hmgcr	Target	26.0041008	26.20362981	0.311752278	2.630363464		-0.74089	1.67121	1.428162	1.95562	0.28441	0.243048
C	1	Hmgcr	Target	26.56287575										
C	2	Hmgcr	Target	26.64291289										
C	3	Hmgcr	Target	26.3045319	26.33229701	0.109684569	3.167358398		-0.2039	1.151806	0.868955	1.220527	0.068721	0.064851
C	4	Hmgcr	Target	26.4543004										
C	5	Hmgcr	Target	26.2420778										
C	6	Hmgcr	Target	26.50117735	26.404142	0.431501892	4.710270691		1.339014	0.395291	0.339533	0.460205	0.064914	0.055758
C	7	Hmgcr	Target	26.80505838										
C	8	Hmgcr	Target	27.91069502										
C	9	Hmgcr	Target	26.71856308										
C	10	Hmgcr	Target	27.53889506										
C	11	Hmgcr	Target	27.2040619	27.24751053	0.136156784	3.668871307		0.297615	0.813396	0.76598	0.864173	0.050577	0.047617
C	12	Hmgcr	Target	27.44048783										
C	13	Hmgcr	Target	27.22294004										
C	14	Hmgcr	Target	27.06871117										
C	15	Hmgcr	Target	27.28998184										
C	16	Hmgcr	Target	26.8718817										

遺伝子発現解析においては、*Hmgcr* が SE の朝夕投与でいずれも有意な低値を示し、朝投与 ($P < 0.01$, 2-way ANOVA) が夕投与 ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) よりも強い抑制作用を示した。転写因子 *Srebp2* も投与時刻による差異が認められ、SE の朝投与でのみ有意な低値 ($P < 0.01$, 2-way ANOVA) が認められた。*Ldlr* は SE 投与で朝夕共に有意な低値 ($P < 0.01$, 2-way ANOVA) を示した (図 13a,b,c)。

肝臓から Cho の汲み出し、排泄に関与するトランスポーター、ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5 (*Abcg5*) は SE の朝夕投与でいずれも有意な高値を示し、特に朝投与 ($P < 0.01$, 2-way ANOVA) が夕投与 ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) と比較しより高値を示した。同様の役割を担う分子種、*Abcg8* は SE 投与で朝夕共に有意な高値 ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) を示した。Cho から Cho エステルを合成する酵素である Acetyl-CoA acetyltransferase 2 (*Acat2*) は朝夕共に有意な低値 ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) を示した (図 13d,e,f)。

一方、肝臓からの胆汁酸排泄に関わるトランスポーター ATP-binding cassette, subfamily B member 11 (*Abcb11*)、Cho から胆汁酸への異化に関わる酵素 Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 (*Cyp7a1*)、また上述の *Abcg5*、*Abcg8*、*Cyp7a1* 等生体内 Cho レベルに応答し Cho 代謝に関与する分子種の発現制御に関わる転写因子、Liver X receptor (*Lxr*) については、いずれも朝夕両投与時刻で SE の影響は認められなかった (図 13g,h,i)。

さらに、腸管のコレステロール代謝関連分子として、体内への Cho 取り込みに関わるトランスポーターとして Niemann-Pick C1 Like 1 (*Npc1l1*)、管腔側への Cho 汲み出しに関わるトランスポーターとして *Abcg5*、*Abcg8*、また、Cho エステルへの変換酵素として *Acat2* の遺伝子発現を評価した結果、いずれの分子も朝夕両投与時刻で SE の明らかな影響は確認されなかった (図 13j,k,l,m)。

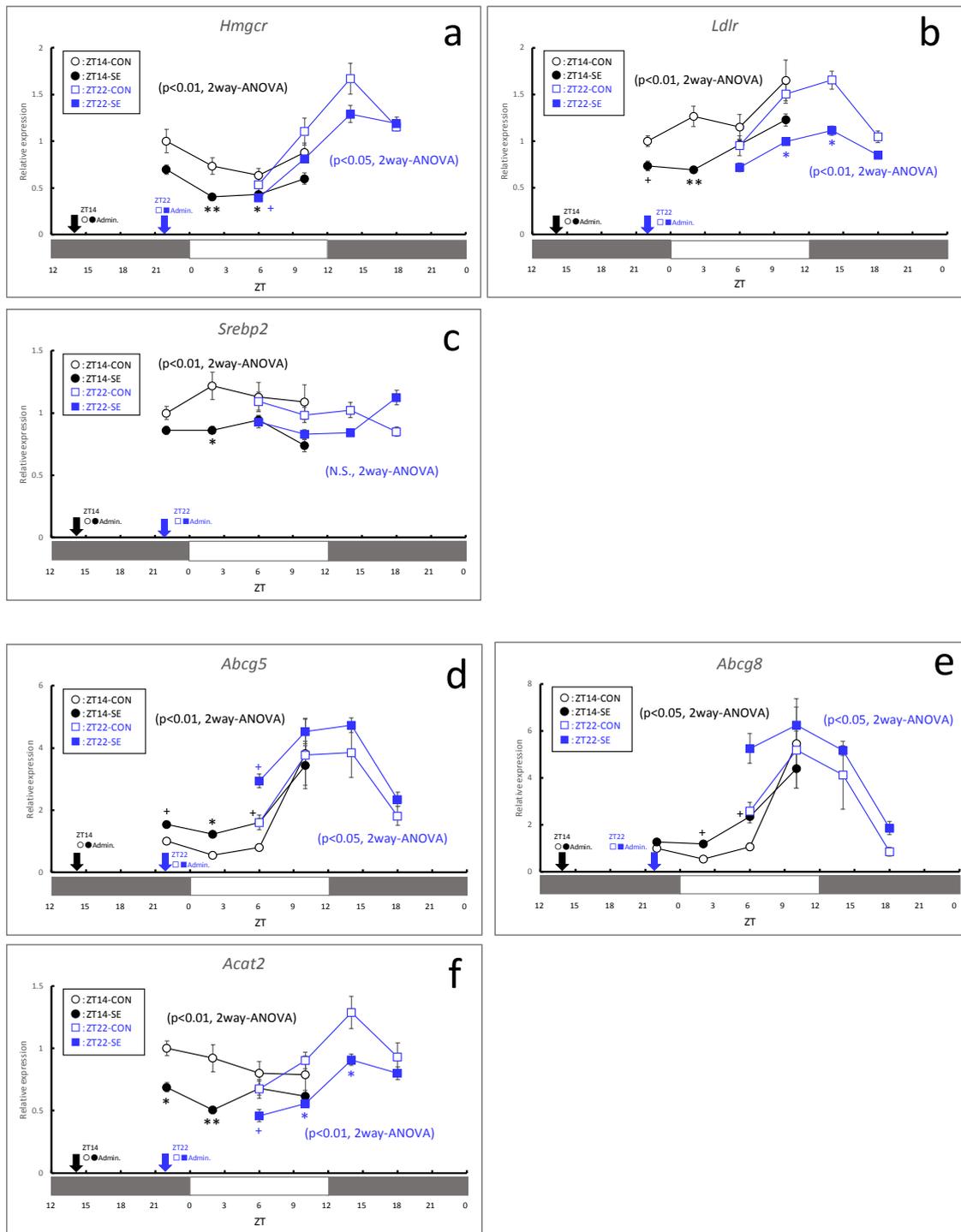


図 13. HFD ラットのコレステロール代謝関連遺伝子発現に対する SE の投与時刻の影響

<28 日間連続投与>

(a) 肝臓 *Hmgcr* 遺伝子発現、(b) 同 *Ldlr*、(c) 同 *Srebp2*、(d) 同 *Abcg5*、(e) 同 *Abcg8*、(e)

同 *Acat2*。その他の図表内説明は「図 11」を参照。

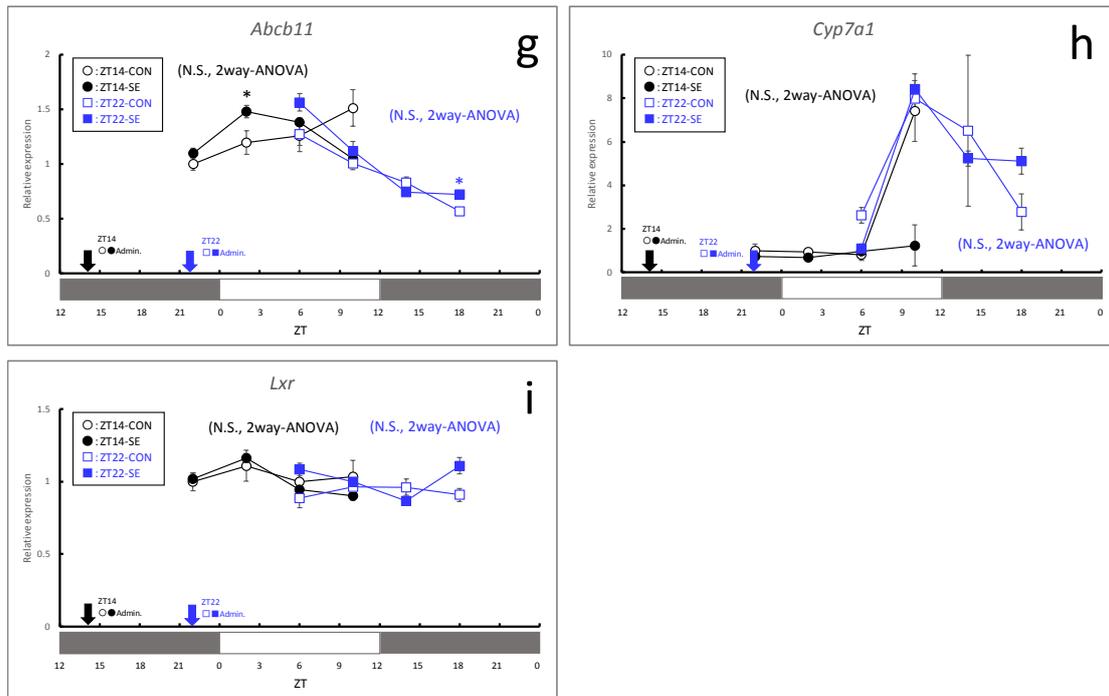


図 13. (続き)

(g) 同 *Abcb11*, (h) 同 *Cyp7a1*, (i) 同 *Lxr*。その他の図表内説明は「図 11」を参照。

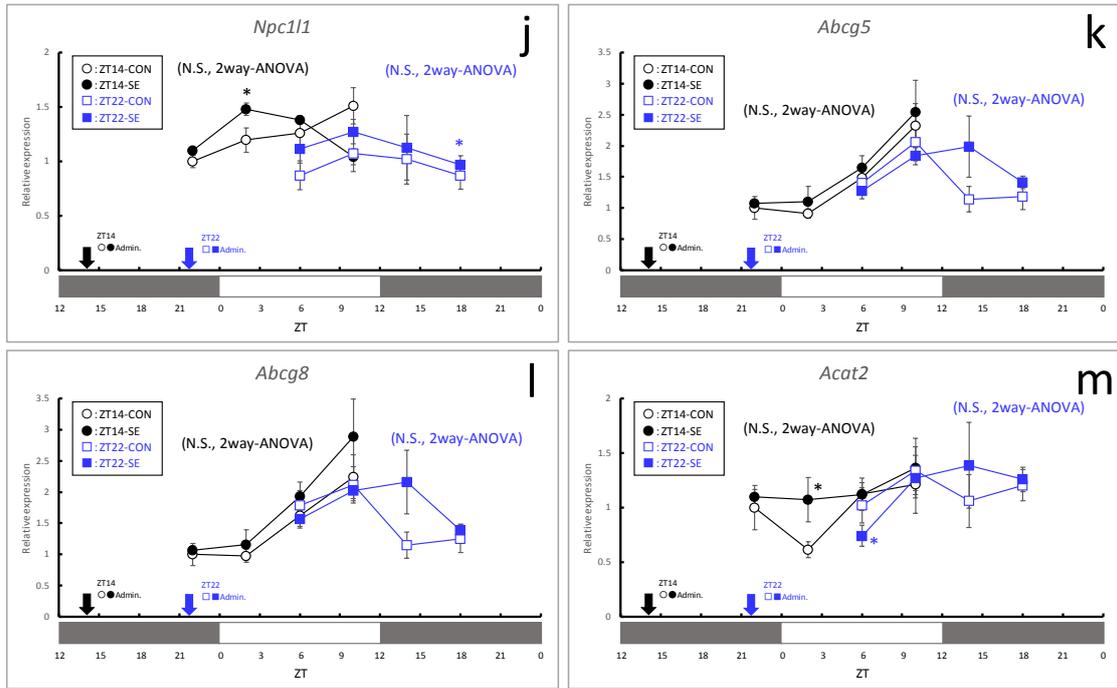


図 13. (続き)

(j) 腸管 *Npc11a* 遺伝子発現、(k) 同 *Abcg5*、(l) 同 *Abcg8*、(m) 同 *Acat2*。その他の図表内説明は「図 11」を参照。

2-2.3.2. 転写因子 SREBP2 に対する機能解析

2-2.3.1 において、*Spebp2*、*Hmgcr*、*Ldlr* の肝臓遺伝子発現が SE によりいずれも低値を示し、朝投与で SE の影響がより大きい、という投与時刻依存性も認められた。SREBP2 はコレステロール応答性の転写因子であること、*Hmgcr*、*Ldlr* は SREBP2 の下流に存在しその制御下にあることから、SE は SREBP2 経路の制御を介して Cho 代謝を制御していることが遺伝子レベルで示唆されたため、さらに、SE が SREBP2 の機能に影響するか否かを検証した。SREBP2 の転写因子としての機能発現に必須のイベントとなる本分子の細胞質から核へのトランスロケート（核内移行）に着目し、本核内移行をモニターできる *in vitro* システムにて評価した。SE を構成する各構造異性体である sesamin (S) および episesamin (E) について、作動活性および作動拮抗活性を評価した結果、前者、つまり本転写因子の作動活性は認められなかった（図 14a,b）。一方、S および E は共に本転写因子機能の作動拮抗が確認され、その作用は S の IC₅₀ が 37.6 μM、E の IC₅₀ が 122.4 μM と S がより強い作用を示した（図 14c,d）。

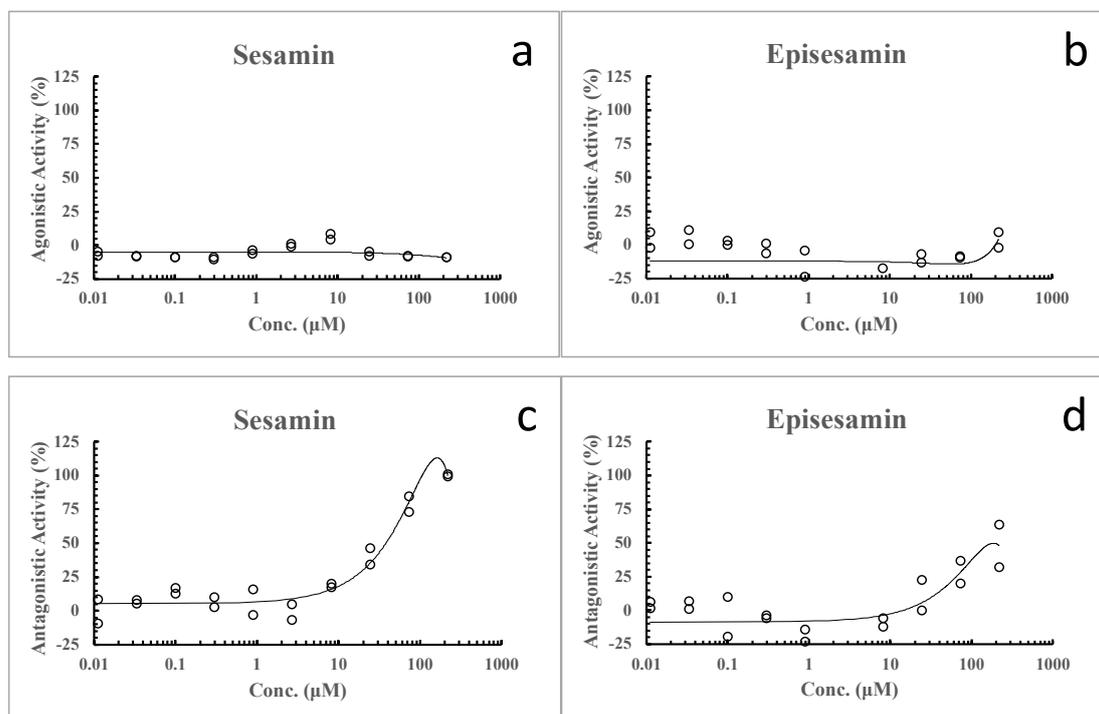


図 14. Sesamin および episesamin の SREBP2 経路活性化に対する影響

PathHunter® eXpress SREBP2 Nuclear Translocation Assay system を用いて sesamin(S)および episesamin (E) の SREBP2 に対する作動活性 (a,b) および作動拮抗活性 (c,d) を評価した。各濃度において duplicate で実施した。近似曲線式を回帰後、 IC_{50} を算出した。詳細は「2-2.2. 実験材料及び方法」を参照。(a,c) S、(b,d) E。

2-2.3.3. トリグリセライド (TG) 評価指標

TG に関する生化学指標は 2-1.の結果 (7 日間投与) と比較してその SE の作用はやや強まったものの、2-2.3.1.の Cho 代謝指標と比較するとその作用は大きくなかった。

つまり、肝中 TG は SE の夕投与によってのみ有意な低値を示した ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) 一方、朝投与による影響は認められなかった。一方、血中 TG はそれとは逆に SE の朝投与によってのみ有意な低値を示した ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) のに対し、夕投与による影響は認められなかった (図 15a,b)。

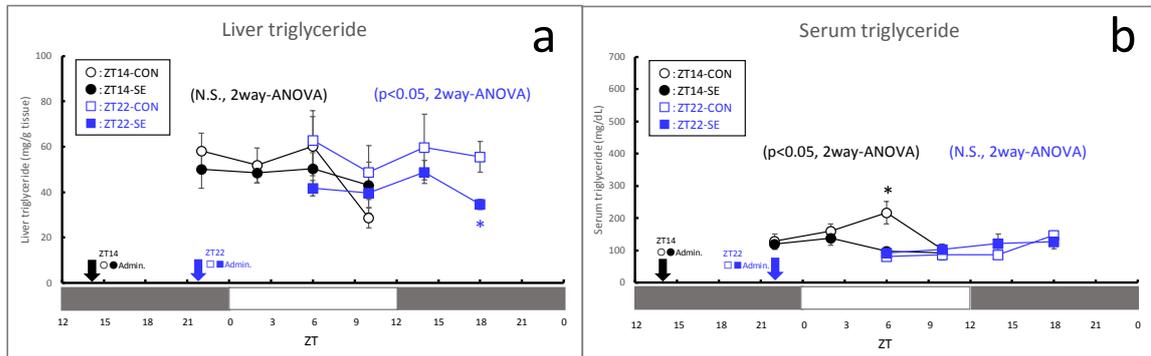


図 15. HFD ラットのトリグリセライド評価指標に対する SE の投与時刻の影響

<28 日間連続投与>

(a) 肝中および (b) 血中トリグリセライド。その他の図表内説明は「図 11」を参照。

遺伝子発現解析においては、全般に SE の作用が顕著に確認された。脂肪酸酸化酵素 *Acadm* および *Acox1* の遺伝子発現が SE の朝夕投与でいずれも有意な高値を、脂肪酸合成酵素 *Fasn* の遺伝子発現が SE の朝夕投与でいずれも有意な低値 ($P < 0.01$, 2-way ANOVA) を示した。転写因子 *Ppar α* の遺伝子発現のみ投与時刻の影響を受け、SE の夕投与でのみ有意な高値 ($P < 0.05$, 2-way ANOVA) が認められた (図 16a,b,c,d)。

先の遺伝子発現解析においては、脂肪酸消費が高まり、合成が低下していることから表現型としての血中や肝臓中 TG は低下することが期待されたが、その予測と比べ、SE の TG に対する作用が大きくなかったことを受け、他の遺伝子発現も追加解析をした。この結果、脂肪酸の細胞内取り込みに関与する CD36 molecule (thrombospondin receptor, *Cd36*) が SE の朝夕投与でいずれも有意な遺伝子発現亢進を認め ($P < 0.05$, 2-way ANOVA)、その作用は朝投与でさらに顕著であった (図 16e)。また、脂肪酸から TG の de novo 合成酵素である diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*Dgat1*) および *Dgat2* に関しては、*Dgat2* の遺伝子発現が朝夕いずれの SE 投与においても有意な低値を示すのに対し ($P < 0.01$, 2-way ANOVA)、逆に *Dgat1* は SE の朝投与でのみ遺伝子発現の亢進傾向 ($P < 0.1$, 2-way ANOVA) が確認された (図 16f,g)。また、TG の細胞外分泌に関わる Microsomal triglyceride transfer protein (*Mttp*) の遺伝子発現に関しては、SE の夕投与でのみ、軽微かつ有意な発現高値を示した (図 16h、 $P < 0.05$, 2-way ANOVA)。

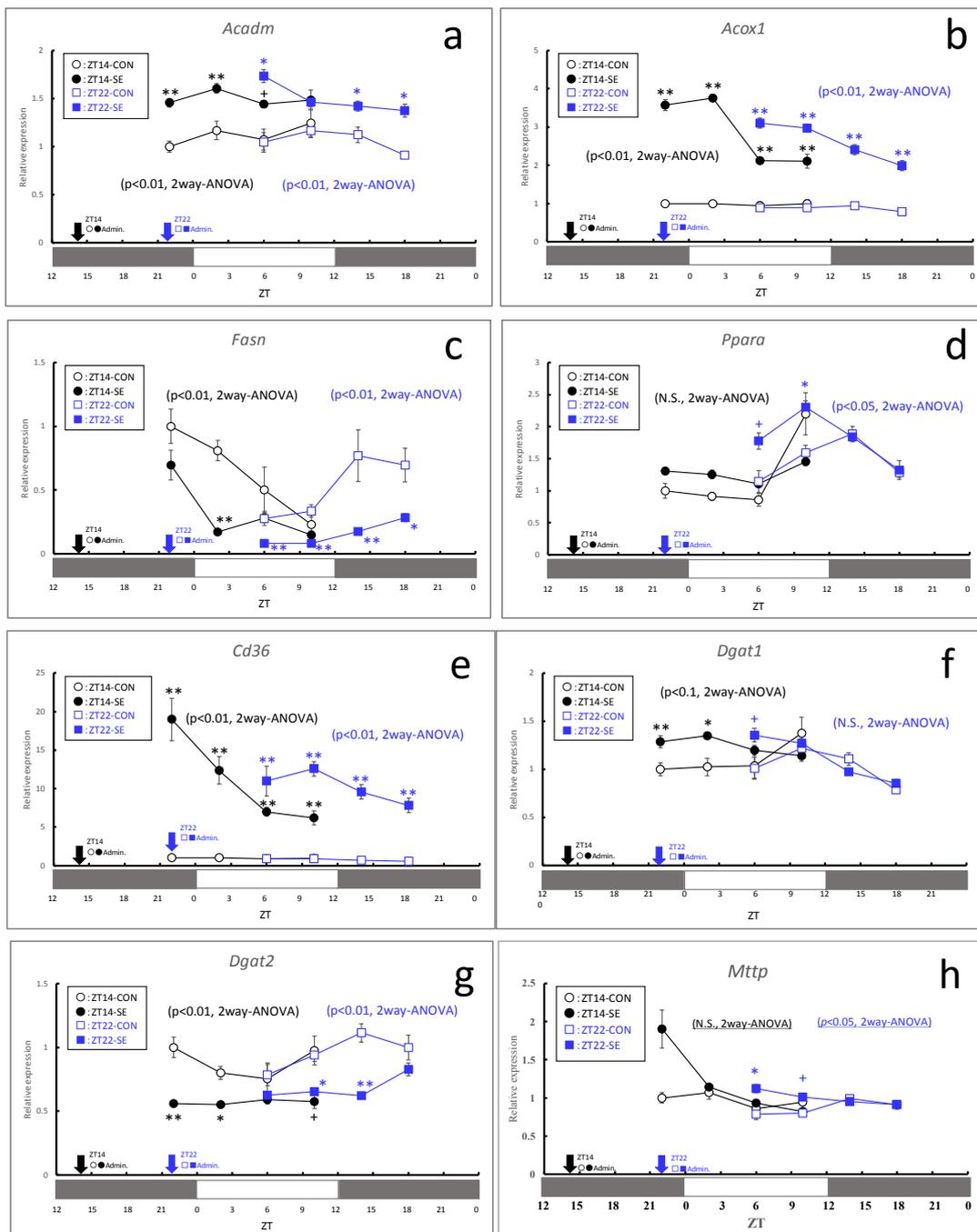


図 16. HFD ラットのトリグリセライド代謝関連遺伝子発現

に対する SE の投与時刻の影響 <28 日間連続投与>

(a) 肝臓 *Acadm* 遺伝子発現、(b) 同 *Acox1*、(c) 同 *Fasn*、(d) 同 *Ppara*、(e) 同 *Cd36*、(f)

同 *Dgat1*、(g) 同 *Dgat2*、(h) 同 *Mttp*。その他の図表内説明は「図 11」を参照。

2-2.3.4. その他指標

体重、摂餌量は 2-2.1.と同様に SE による影響を受けなかった。また相対肝重量が SE 投与で有意な高値を示したが投与時刻の影響は確認されなかった。相対精巣周囲脂肪重量は SE による影響を受けなかった(図 17a,b,c,d)。

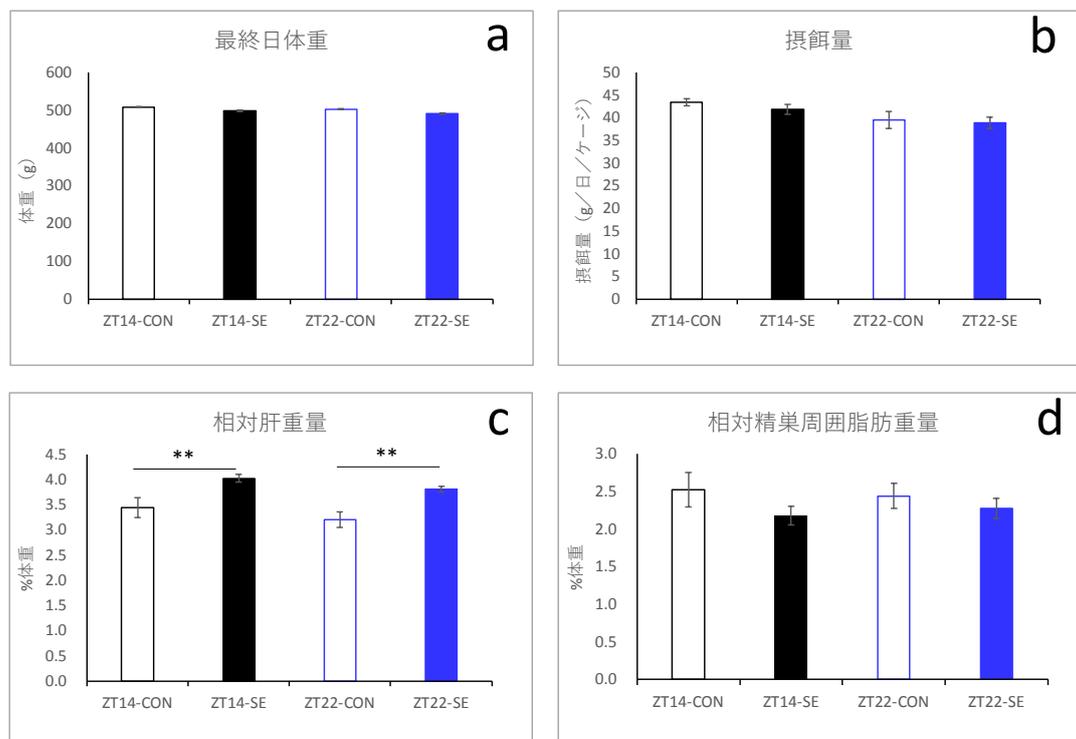


図 17. HFD ラットの体重、摂餌量、臓器重量に対する

SE の投与時刻の影響 <28 日間連続投与>

(a) 最終日体重、(b) 摂餌量、(c) 相対肝重量、(d) 相対精巣周囲脂肪重量。図内カラム左から、ZT14-CON (朝投与コントロール群)、ZT14-SE (朝 SE 投与群)、ZT22-CON (夕投与コントロール群)、ZT22-SE (夕 SE 投与群)。平均値±標準誤差、n=14~20/各群 (a,c,d)、n=5~7/各群 (b)。** $P<0.01$ 、各 CON に対する T-test。

2-2.3.5. 結果小括

高脂肪食モデルラットに対する SE の 28 日間投与での検証結果、7 日間投与実験のそれと比べ SE の作用は強まり、より大きな効果を得るためには継続摂取がより好ましいと考えられた。Cho 評価指標のまとめを table3 に、TG 評価指標のまとめを table4 に示す。特にコレステロール代謝においては朝（活動期の始め）に摂取することがより好ましく、この時、転写因子 SREBP2 を介したコレステロール合成系の抑制、肝臓からのコレステロール排泄が寄与している可能性が示唆された。TG 評価指標においては、わずかに夕投与がより好ましい傾向にあるもののその差は明確ではなく、朝投与時は TG の消費と合成が作用拮抗している可能性も考えられた。

		朝投与 (ZT14)		夕投与 (ZT22)
コレステロール 代謝	主評価	肝中TG	低値(p<0.01)	≧ 低値(p<0.01)
		血中総Cho	抑制(p<0.01)	> 影響無し
	遺伝子発現	合成 (<i>Hmgcr</i>)	抑制(p<0.01)	> 抑制(p<0.05)
		取り込み (<i>Ldlr</i>)	抑制(p<0.01)	= 抑制(p<0.01)
		転写因子 (<i>Srebp2</i>)	抑制(p<0.01)	> 影響無し
		Cho排泄(<i>Abcg5</i>)	促進(p<0.01)	> 促進(p<0.05)
		Cho排泄(<i>Abcg8</i>)	促進(p<0.05)	= 促進(p<0.05)
		異化(<i>Cyp7a1</i>)	影響無し	= 影響無し
		転写因子 (<i>Lxr</i>)	影響無し	= 影響無し
		エステル化(<i>Acat2</i>)	抑制(p<0.01)	= 抑制(p<0.01)
		BA排泄(<i>Abcb11</i>)	影響無し	= 影響無し

Table3. 28 日間投与実験における Cho 評価指標のまとめ

不等号は各評価指標に対しての朝あるいは夕投与の SE の影響の大小を意味する。

		朝投与 (ZT14)		夕投与 (ZT22)	
トリグリセライド代謝	主評価	肝中TG	影響無し	<	抑制(p<0.05)
		血中TG	抑制(p<0.05)	>	影響無し
	遺伝子発現	β酸化 (<i>Acdm</i>)	促進(p<0.01)	=	促進(p<0.01)
		β酸化 (<i>Acox1</i>)	促進(p<0.01)	=	促進(p<0.01)
		合成 (<i>Fasn</i>)	抑制(p<0.01)	=	抑制(p<0.01)
		転写因子 (<i>Ppara</i>)	影響無し	<	促進(p<0.05)
		取り込み (<i>Cd36</i>)	促進(p<0.01)	≧	促進(p<0.01)
		TG合成 (<i>Dgat1</i>)	促進傾向(p<0.1)	<	影響無し
		TG合成 (<i>Dgat2</i>)	抑制(p<0.01)	=	抑制(p<0.01)

Table4. 28日間投与実験におけるTG評価指標のまとめ

不等号は各評価指標に対しての朝あるいは夕投与のSEの影響の大小を意味する。

2-3. セサミン類の動態に対する投与時刻の及ぼす影響の検証

2-3.1. 序論

体内時計は薬力学的のみならず薬物動態に影響を与えることが知られている (Dallmann et al., 2007)。一方、SE の動態、生物学的使用率が投与時刻に影響を受けるかどうかはこれまで報告が無い。検証 2-1、および 2-2 において、SE のラット脂質代謝に対する作用が投与時刻に影響を受ける可能性が明らかになったが、この時の SE の動態学的指標がどう影響しているかは不明なままである。そこで、本項では SE の動態が投与時刻に影響を受けるかどうかを検証した。

2-3.2. 実験材料及び方法

【試験サンプル】

第 2 章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【実験動物および飼育環境】

全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)に基づき、サントリーホールディングス株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施された。以下、第 2 章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【SE の単回投与実験】

試験デザインを図 18 に示す。検証 2-1 および 2-2 と同様に HFD 負荷モデルラットを準備し (2-1.2.参照)、朝投与は ZT13、夕投与は ZT23 に SE を 100mg/動物体重 kg の用量で単回経口投与した。投与前および投与後 1、3、5、7、9、12、16 時間に尾静脈より

採血し、血漿中の S、E、SC-1 (S 代謝物)、EC-1 (E 代謝物) (Nakai et al., 2003; Tomimori et al., 2012) を LC-MS/MS にて定量し(図 19a,b,c,d)、以下の動態学的パラメータ、AUC (area under the each compound concentration-time curve、血中濃度-時間曲線下面積)、 C_{max} (maximum blood concentration、最高血中濃度)、 T_{max} (time to reach maximum blood concentration、最高血中濃度到達時間)および $T_{1/2}$ (half life、半減期)をそれぞれの化合物に対して算出した。n=5/群で実施した。

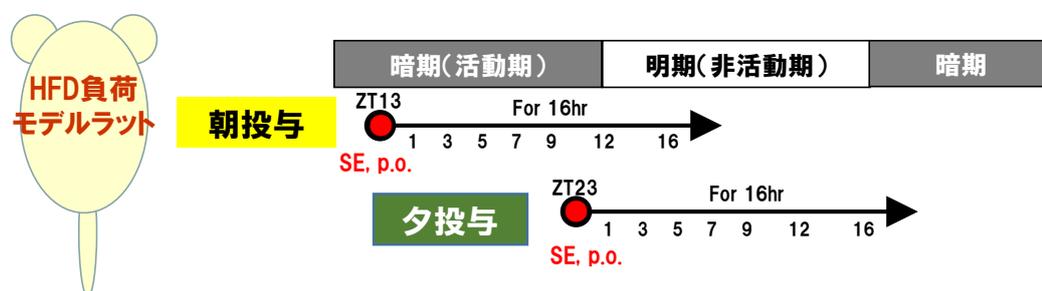


図 18. 試験プロトコル (2-3. HFD ラット、SE 単回投与動態試験)

SE の動態に対する投与時刻の及ぼす影響を HFD モデルラットにて評価した。詳細は「2-3.2. 実験材料及び方法」を参照。ZT13 あるいは ZT23 にて溶媒コントロールあるいは SE を単回強制経口投与後、経時的に採血した。

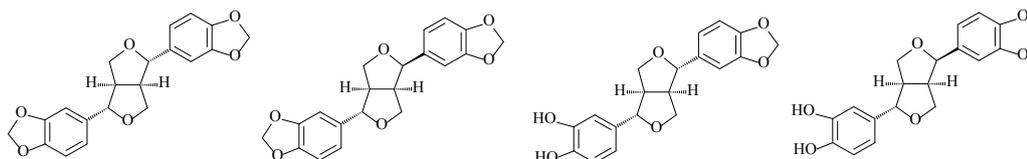


図 19. S、E、SC-1、EC-1 の構造式

(a) S、(b) E、(c) SC-1、(d) EC-1。

【SE 反復投与後の肝臓、血漿の分析】

検証 2-2 で得たラット肝臓、血漿に関し、S、E、SC-1、EC-1 を測定した。測定サンプルは朝投与群（ZT14-SE group）ないし夕投与群（ZT22-SE group）のそれぞれ最終投与後 8 および 20 時間の肝臓、血漿を使用した。

【統計解析】

データは平均値±標準誤差、n=5/各測定ポイント（SE の単回投与実験）あるいは n=4~5/各測定ポイント（SE 反復投与後の肝臓、血漿の分析）で表した。各ポイントにおける群間比較は、unpaired two-tailed t test にて実施した。 $P<0.05$ を統計学的有意差ありとした。

2-3.3. 結果

2-3.3.1. SE の単回投与時の検証結果

SE の動態学的指標が投与時刻に影響を受けるか否かを検証するために、HFD モデルラットに ZT13 (朝、活動期の始め) あるいは ZT23 (夕、活動期の終わり) に SE を投与し、経時的に採血後、S、E、SC-1 (S 代謝物)、EC-1 (E 代謝物) を定量した。

この結果を図 20 に示す。S、E、SC-1、EC-1 いずれも T_{max} は 2~4 時間程度を示し、また、投与後 16 時間においては特に未変化体である S および E は血中からほぼ消失し、一方、生体代謝物である SC-1 や EC-1 は未変化体と比べその量は高かった。

この時、S および SC-1 はいずれの動態学的パラメータも投与時刻に影響を受けず、その差は認められなかった。E に関しては、 C_{max} について朝投与 ($2052 \pm 177 \text{ ng/mL}$) が夕投与 ($1596 \pm 108 \text{ ng/mL}$) と比べ高値傾向 ($P=0.06$) を、また、 T_{max} については朝投与 ($3.4 \pm 0.4 \text{ hr}$) が夕投与 ($5.0 \pm 0.6 \text{ hr}$) と比べ短縮傾向 ($P=0.07$) を示し、E の生物学的利用率はわずかに朝投与が高い傾向にあった。EC-1 に関しては、 $T_{1/2}$ については朝投与 ($3.3 \pm 0.5 \text{ hr}$) が夕投与 ($5.4 \pm 0.8 \text{ hr}$) と比べ短縮傾向 ($P=0.08$) を示したのみであった (Table5)。

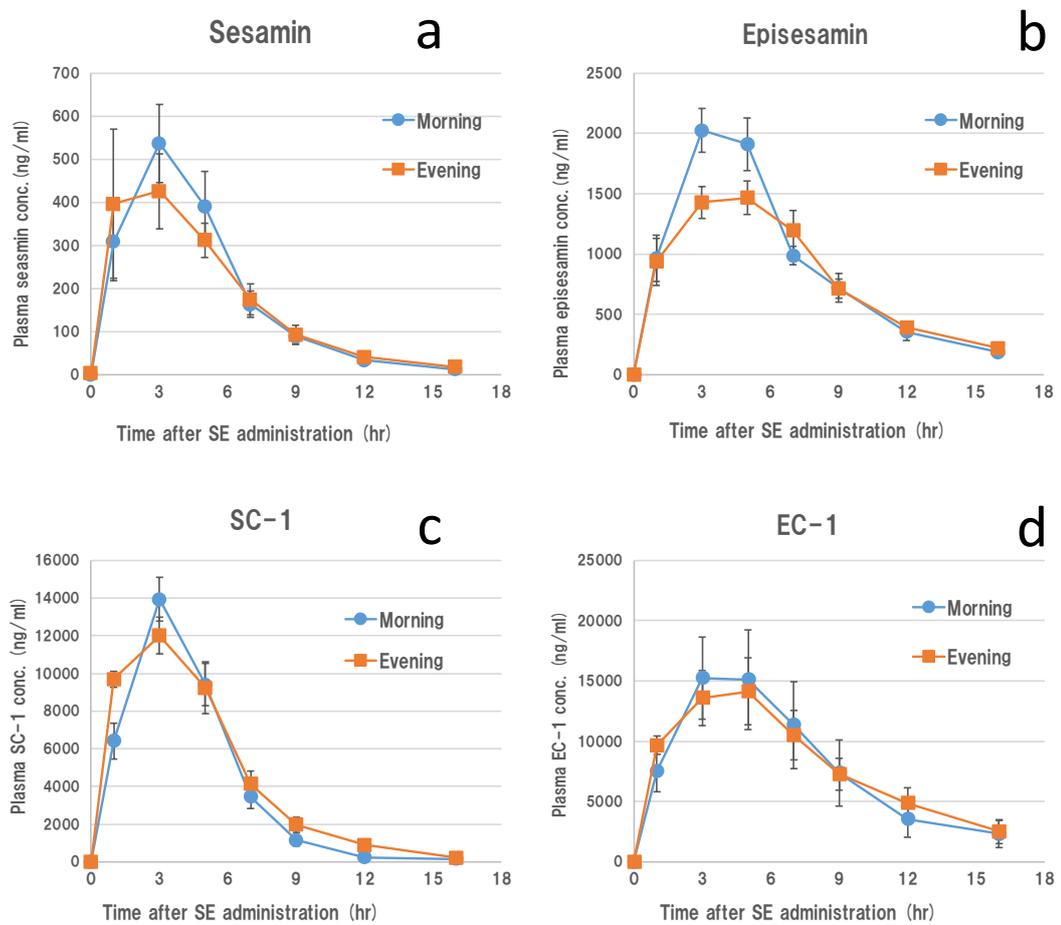


図 20. HFD ラットに対する SE 単回投与後の血中濃度推移およびそれらに対する投与時刻の及ぼす影響

(a)S、(b)E、(c)SC-1、(d)EC-1 の血漿中濃度推移。水色シンボルが ZT13 (朝) 投与群、オレンジシンボルが ZT23 (夕) 投与。平均値±標準誤差、n=5/各群。詳細は「2-3.2. 実験材料及び方法」を参照。

		S	E	SC-1 (S代謝物)	EC-1 (E代謝物)
ZT13 投与群 (朝)	AUC (ng·hr/mL)	3049±548	15541±1815	67740±6642	143100±45306
	C _{max} (ng/mL)	553±92	2052±177 (p=0.059)	13930±1168	15978±3895
	T _{max} (hr)	2.6±0.4	3.4±0.4 (p=0.065)	3.0±0.0	3.8±0.5
	T _{1/2} (hr)	2.8±0.5	3.9±0.5	2.3±0.3	3.3±0.5 (p=0.075)
ZT23 投与群 (夕方)	AUC (ng·hr/mL)	2898±674	14424±1572	74755±5387	152848±34001
	C _{max} (ng/mL)	502±139	1596±108	12140±900	14536±2537
	T _{max} (hr)	3.0±0.6	5.0±0.6	2.6±0.4	4.6±0.4
	T _{1/2} (hr)	3.1±0.5	4.0±0.3	2.4±0.2	5.4±0.8

Table5. HFD ラットへの SE 単回投与後の動態学的パラメータ

AUC：血中濃度-時間曲線下面積、C_{max}：最高血中濃度、T_{max}：最高血中濃度到達時間、T_{1/2}：半減期。数字は平均値±標準誤差、n=5/各サンプリングポイント。ピンク色のセルは投与時刻の間で統計学的に有意傾向あり (P<0.1)。

2-3.3.2. SE の 2 8 日間連続投与時の検証結果

検証 2-2 で得た SE 長期投与後のラット肝臓に関し、S、E、SC-1、EC-1 を測定した。この結果を図 21a,b,c,d に示す。各化合物の絶対量に関しては、g 組織当たり最大で S が約 $0.7\ \mu\text{g}$ 、E が約 $5.5\ \mu\text{g}$ 、SC-1 が約 $15\ \mu\text{g}$ 、EC-1 が約 $70\ \mu\text{g}$ 、と、投与時の SE 中、S および E が約 1 : 1 であるのに対し、生体内では E が S より多く、また代謝物においても同様、EC-1 が SC-1 より多く検出された。このことは先の 2-3.3.1 の単回投与後の血中濃度の結果とほぼ一致していた。この時、投与 20 時間後解剖の肝臓において、S が朝投与にて高値傾向にあった以外、いずれの化合物も投与時刻による肝臓中濃度の差異は認められなかった。また、同時刻にサンプリングした血漿も同様の分析を試みた結果、投与 8 時間後の血漿において、E が朝投与にて高値傾向に、また SC-1 が夕投与にて高値傾向にあったものの、いずれの化合物も SE の投与時刻による明確な影響は確認されなかった(図 22a,b,c,d)。

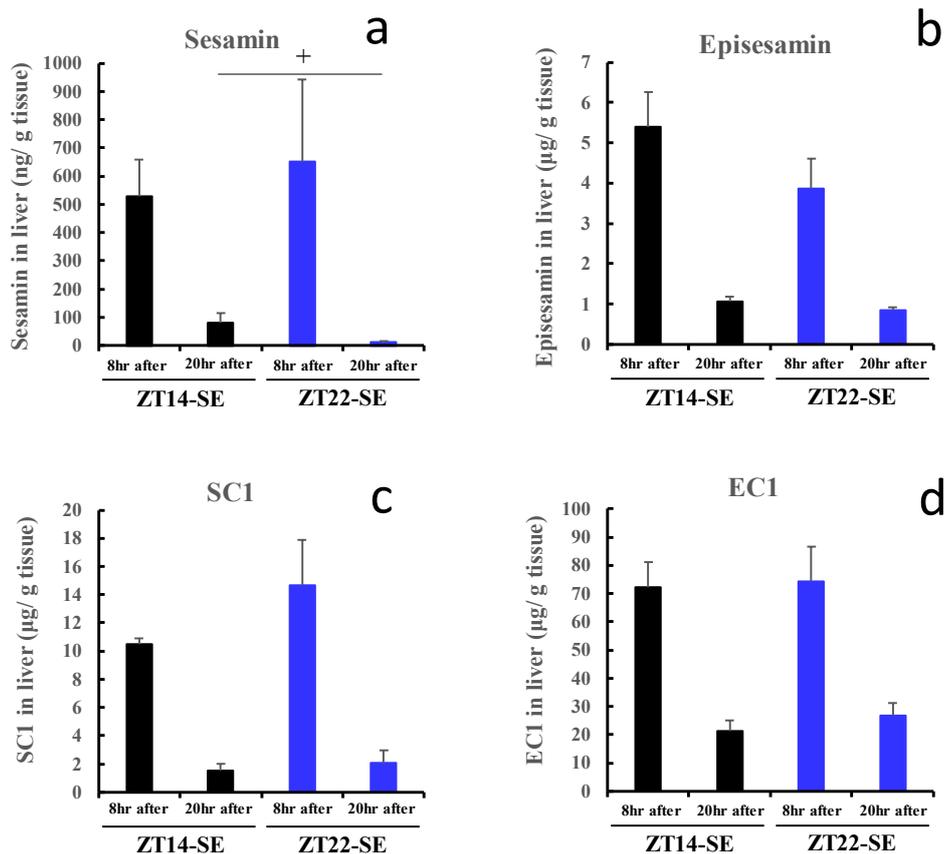


図 21 . SE の 28 日間連続投与後の HFD ラット肝臓中セサミン類の分析結果

朝 SE 投与群 (ZT14-SE、黒カラム) ないし夕 SE 投与群 (ZT22-SE、青カラム) のそれぞれ最終投与後 8 および 20 時間の肝臓を測定対象とした。(a)S、(b)E、(c)SC-1、(d)EC-1 の肝臓中濃度。数字は平均値±標準誤差、n=4-5/各サンプリングポイント。+ $P<0.1$ vs 対応する投与時刻。詳細は「2-3.2. 実験材料及び方法」を参照。

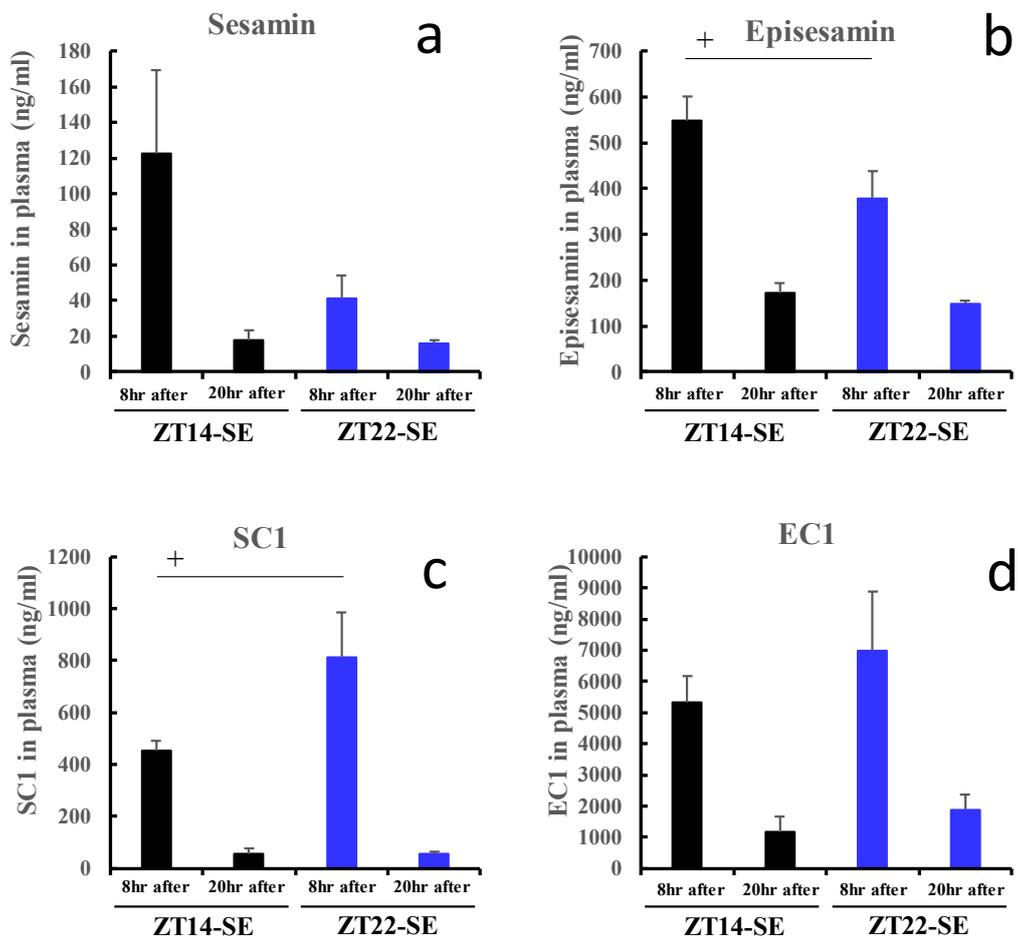


図 22. SE の 28 日間連続投与後の HFD ラット血漿中セサミン類の分析結果

朝 SE 投与群ないし夕 SE 投与群のそれぞれ最終投与後 8 および 20 時間の血漿を測定対象とした。(a)S、(b)E、(c)SC-1、(d)EC-1 の血漿中濃度。その他の図表内説明は「図 21」を参照。

2-3.3.3. 結果小括

SE の単回投与実験においては、E の C_{max} が朝投与で高い傾向を認めたが、それ以外の化合物および各動態学的パラメータは総じて投与時刻による明らかな影響を受けなかった。SE 長期投与後のラット肝臓、血漿に関しても、同様に投与時刻による肝臓中濃度の明らかな差異は認められなかった。

2-4. 高コレステロール負荷モデルラットにおけるセサミン類の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響の検証

2-4.1. 序論

検証 2-1、2 の結果、HFD 負荷モデルラットのコレステロール指標に対し、SE の朝投与（活動期の始め）がよりその影響が強くなる可能性が示唆された。そこで、高コレステロール食（High-cholesterol diet、以下 HCD）負荷モデルラットにおいても同様の投与時刻の影響が確認されるか否かを確認するため、本検討を進めた。

2-4.2. 実験材料及び方法

【試験サンプル】

第 2 章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【実験動物および飼育環境】

全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）に基づき、サントリーホールディングス株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施された。以下、第 2 章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【高コレステロール負荷モデルラットの確立と SE の評価】

本研究には、脂質代謝異常モデルとして、高コレステロール食（High-cholesterol diet、以下 HCD）負荷モデルラットを用いた。つまり、5 週齢の雄性 SD ラットを入荷し、2 週間正常食（CE-2）で環境馴化後、市販の HCD である D12336（Research Diet Inc.）の Cho 濃度を 0.3 重量%に改変した HCD を調製し、本飼料を用いて負荷を開始した。

試験デザインを図 23 に示す。HCD 負荷を 14 日間行ったのち、負荷食は継続しな

がら、SE 処置群 (SE 群) にはオリーブオイルに加熱溶解し十分に冷ました SE を 100mg/動物体重 kg の用量で経口投与した。対照群にはオリーブオイル (CON 群) を経口投与した。投与時刻の影響を検証するため、SE 群、CON 群、それぞれをさらに 2 つに分け、朝投与は ZT14 (活動期の始めを想定)、夕投与は ZT22 (活動期の終わりを想定) とした。試験 2-2 と同様、長期連続投与後の血中濃度の高まりによる作用の高止まりの影響を避けるため、最終投与直後の採材は避け、各処置した動物を最終投与後 8 および 12 時間の 2 時点で解剖し、採血および各臓器 (肝臓、腸) を採材した。N=6/各サンプリングポイントとした。遠心分離後の血漿および各臓器は液体窒素あるいはドライアイスで急速凍結し、-80°C で保存した。これらはその後の生化学検査および遺伝子発現解析に使用した。

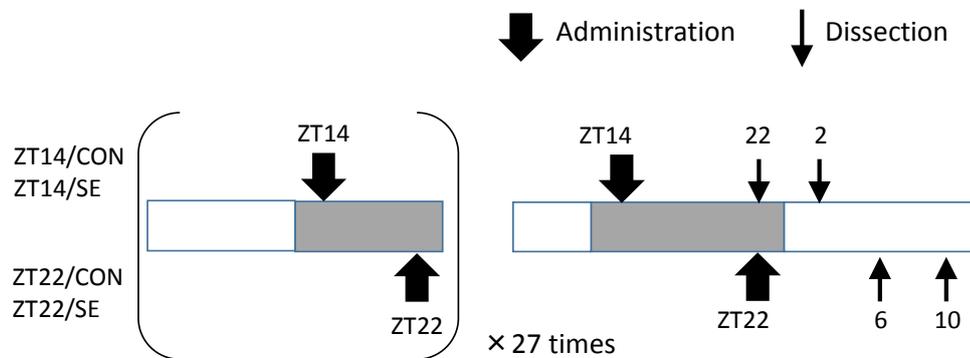


図 23. 試験プロトコル (2-4. HCD ラット、SE28 日間連投)

HCD モデルラットにおける SE の脂質代謝改善効果に対する投与時刻の及ぼす影響を評価した。詳細は「2-4.2. 実験材料及び方法」を参照。ZT14 あるいは ZT22 にて溶媒コントロールあるいは SE を 28 日間連続投与の後、2 時点で解剖した。解剖は各ポイント、各群 6 例ずつ行った。その他の図表内説明は「図 5」を参照。ZT14/CON : 朝投与コントロール群、ZT14/SE : 朝 SE 投与群、ZT22/CON : 夕投与コントロール群、ZT22/SE : 夕 SE 投与群。

【生化学分析】

第 2 章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【統計解析】

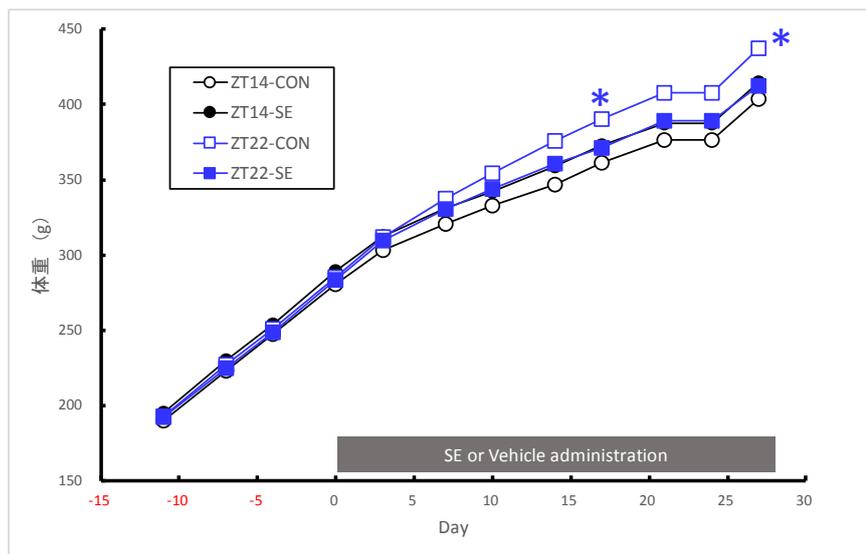
データは平均値±標準誤差、n=6/group/サンプリングポイント、で表した。各ポイントにおける群間比較は、unpaired two-tailed t test にて実施した。P<0.05 を統計学的有意差ありとした。

2-4.3. 結果

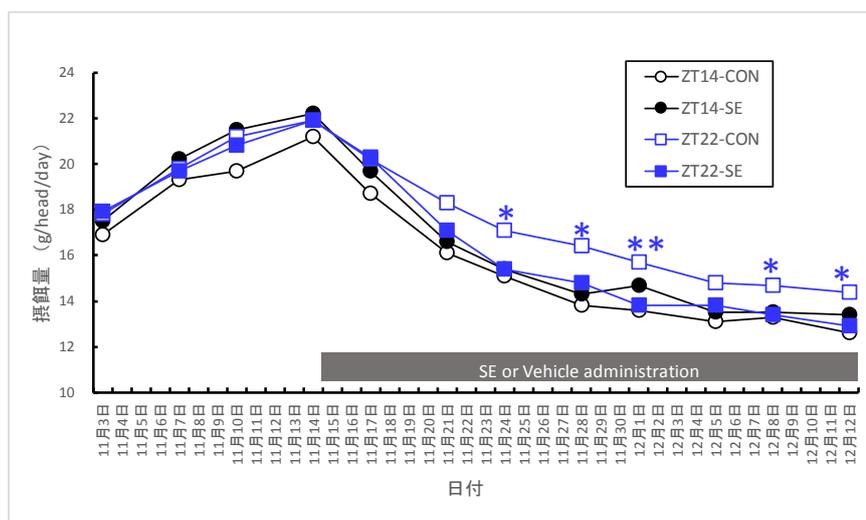
2-4.3.1. 体重および摂餌量

体重推移の結果を図 24a に示す。夕投与の 2 群間、つまり ZT22-CON と ZT22-SE で体重推移に有意な差が認められた。朝投与の 2 群も含めた計 4 群で結果を見た場合、夕投与のコントロール群、つまり、ZT22-CON が他の 3 群と比較して高い体重推移を示していた。摂餌量の結果を図 24b に示す。HCD 負荷が開始されて 2 週間後、つまり、強制経口投与の操作が開始されたタイミングで、いずれの群も摂餌量の減少が認められた。その後、強制経口投与開始 10 日後付近から、夕投与の 2 群間、つまり ZT22-CON と ZT22-SE で摂餌量に有意な差が認められた。朝投与の 2 群も含めた計 4 群で結果を見た場合、夕投与のコントロール群、つまり、ZT22-CON が他の 3 群と比較して高い摂餌量推移を示し、このことは、先述の体重推移と一致していた。

以上のように、特に夕投与の ZT22-CON と ZT22-SE 両群間で体重および摂餌量に有意な差が認められ、ZT22-CON が摂餌量高値に起因すると推定される体重高値が認められた。このことは以降の指標に大きく影響しうるものであるため、ZT22-CON、ZT22-SE の両群の結果は参考値として取り扱うこととし、体重および摂餌量が同等だった朝投与の 2 群、つまり ZT14-CON と ZT14-SE の解析を優先することとした。



a



b

図 24. HCD ラットの体重、摂餌量に対する SE の投与時刻の影響

<28 日間連続投与>

(a) 体重推移、(b) 摂餌量推移。ZT14 あるいは ZT22 にて溶媒コントロールあるいは SE を 28 日間連続投与した。詳細は「2-4.2. 実験材料及び方法」を参照。グレイの帯が SE あるいは vehicle を投与した期間を示す。黒○：ZT14-CON（朝投与コントロール群）、黒●：ZT14-SE（朝 SE 投与群）、青□：ZT22-CON（夕投与コントロール群）、青■：ZT22-SE（夕 SE 投与群）。グラフは平均値の推移、n=12/群。** $P<0.01$ 、* $P<0.05$ vs 各 CON 群。

2-4.3.2. コレステロール評価指標

以下、朝投与の2群、ZT14-CONとZT14-SEとの比較について記載する。

本モデルラットの血中総コレステロールは、最終解剖日にておよそ80～120mg/dLを呈し、検討2-2のHFDラットのそれ(70mg/dL)と比較しやや高めの数字であった。この時、血中総コレステロールは、最終投与12時間時点でコントロール群と比較してSE処理による低下傾向($P=0.054$)が、血中HDLコレステロールは、最終投与8時間時点でコントロール群と比較してSE処理による高値傾向($P=0.06$)が、血中LDLコレステロールは、最終投与12時間時点でコントロール群と比較してSE処理による有意な低下($P<0.05$)がそれぞれ確認された(図25a,b,c)。

肝臓中Choに関しては、コントロール群が65mg/g肝臓程度の数字を示し、本数字は検討2-2のHFDラットのそれ(10mg/g肝臓)と比較し顕著に高いことが判明し、外因性コレステロール負荷による過剰なコレステロール代謝異常状態にあることが確認された。この時、最終投与12時間時点でコントロール群と比較してSE処理による影響は認められなかった(図25d)。

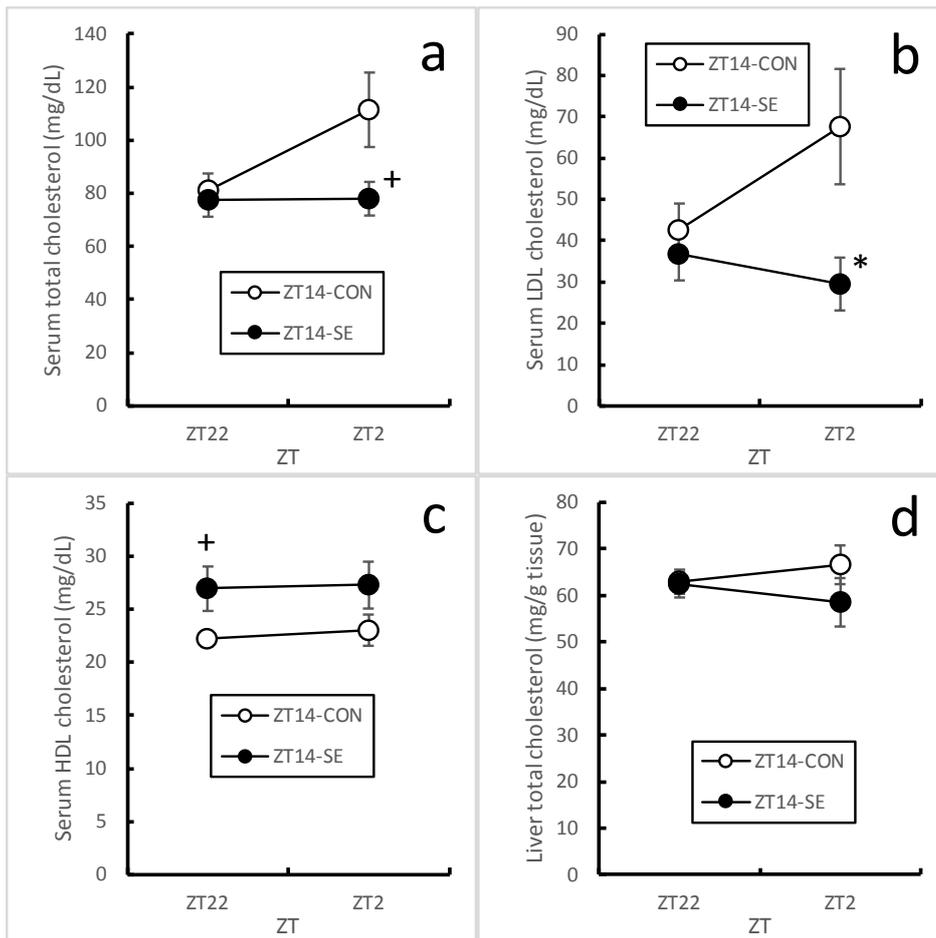


図 25. HCD ラットのコレステロール評価指標に対する SE の投与時刻の影響

<28 日間連続投与>

(a) 血中総コレステロール、(b) 血中 LDL コレステロール、(c) 血中 HDL コレステロール、(d) 肝臓中総コレステロール。ZT14 に溶媒コントロールあるいは SE を 28 日間連続投与の後、2 時点で解剖した。詳細は「2-4.2. 実験材料及び方法」を参照。黒○：ZT14-CON（朝投与コントロール群）、黒●：ZT14-SE（朝 SE 投与群）。平均値±標準誤差、n=6/各サンプルリングポイント。* $P<0.05$, + $P<0.1$ vs 各 CON。

2-4.3.3. トリグリセライド評価指標

血中 TG は最終投与 8 時間時点でコントロール群と比較して SE 処理による有意な低下 ($P<0.05$) が認められたが、肝臓中 TG に対しては SE の有意な影響は確認されなかった(図 26a,b)。

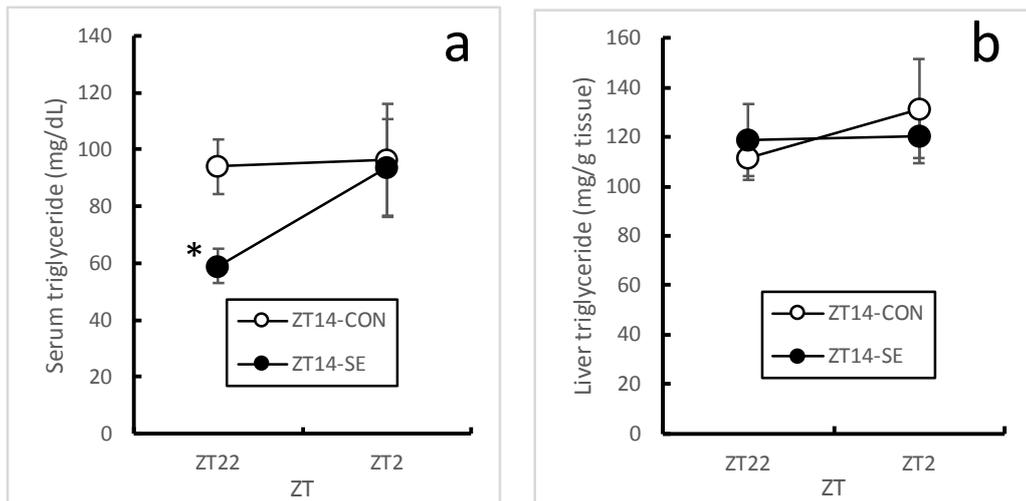


図 26. HCD ラットのトリグリセライド評価指標に対する SE の投与時刻の影響

<28 日間連続投与>

(a) 血中トリグリセライド、(b) 肝臓中トリグリセライド。その他の図表内説明は「図 25」

を参照。

2-4.3.3. 結果小括

高コレステロール食負荷モデルラットにおける SE の投与時刻の影響を検証した。この結果、体重および摂餌量が投与時刻によって影響を受け、特に夕投与における SE の影響は判断出来なかった。このことから、SE の本モデルに対する影響の投与時刻依存性は見極めることが出来なかった。

この前提のもと、SE の朝投与（ZT14、活動期の始め）は特に血中 Cho 指標を全般に、血中 TG 指標の一部に影響する方向にあった。しかしながら、肝臓中の Cho および TG を変化させるには至らなかった。

2-5. 考察

脂質の代謝は体内時計で制御され概日リズムを有すること (Gooley JJ et al., 2016)、ゴマのリグナンである SE は各種モデル動物で脂質代謝改善効果を示す (Hirose, Ide) ことから、HFD 負荷モデルラットを用い SE の脂質代謝に対する作用が投与時刻に影響を受けるか否かを検証した。

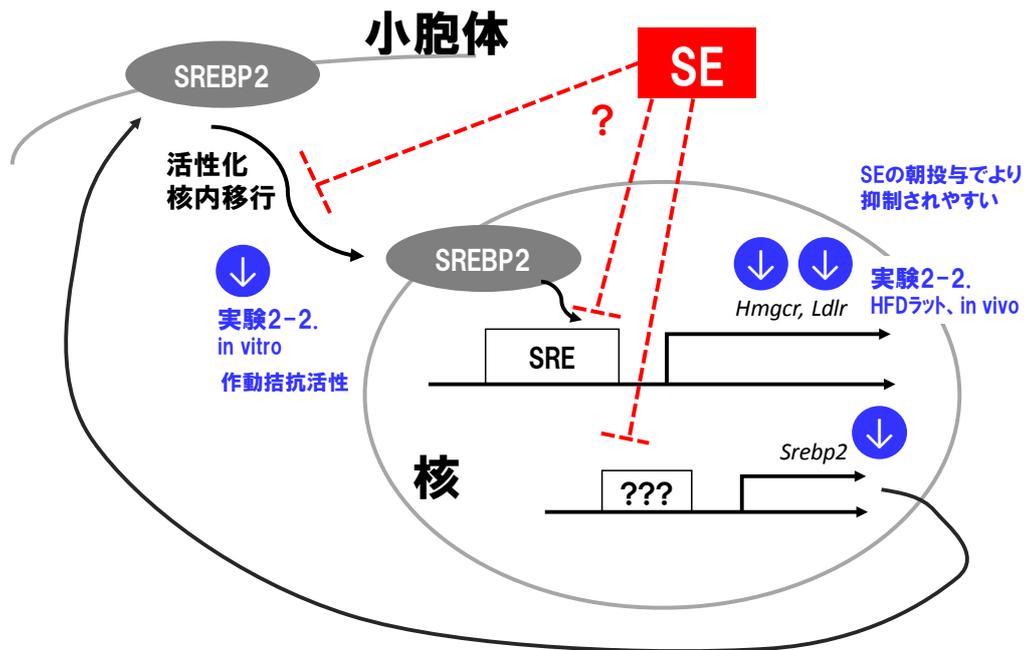
2-1 の検証条件である 7 日間連続投与では、先行研究から予測したほど SE による明確な脂質代謝に対する影響は確認できなかった。先行研究 (Ashakumary et al., 1999; Lim et al., 2007; Ide et al., 2009) と比較し、今回の試験条件は食餌中の脂肪負荷量が多く (先行研究の食餌中脂肪比率: 5-15 重量%、今回: 35 重量%)、病態モデルとして厳しい条件であったこと、先行研究と比してより短期の試験サンプル投与期間 (先行研究: 14 日以上、今回: 7 日間) だったこと、また、先行研究は総じて HFD 負荷開始と同時に投与開始する、予防的効果の意味合いが強かったのに対し、今回は事前に 2 週間高脂肪負荷食で代謝異常を誘導後に投与を開始する、治療効果も含む試験であった。これらの点からも SE の作用検出には厳しい条件であり、そのことが、少なくとも 7 日間投与においては、SE の影響が明確に検出されにくかった原因と考えられる。一方、このようなシビアな条件でありながら、検証 2-2、つまり、SE の摂取期間を 28 日間に延長するとその作用は明らかに見えてくることが確認された。一般に、投与濃度や摂取期間等、試験サンプルの曝露量がより高まる条件において、その影響がより検出されやすくなることは種々の試験で多く報告されており (Deseure et al., 2007; O'Donnell et al., 2018; Rusyn et al., 2012)、そのことが本検討においても確認されたと考えられる。以降、SE の脂質代謝への作用がより明確で、本作用に対する投与時刻の影響を検証するのに相応しい試験結果として、特に 28 日連続投与結果を中心に考察したい。

Cho 指標の結果のまとめを table3 にまとめた。SE の Cho 代謝については、今回

の我々の検証条件とはコレステロール負荷濃度、投与期間等、一部異なるが、ラットやハムスターにおいて各種検証されている。それらの報告にて、SE の Cho 低下作用のメカニズムとして、Cho 合成酵素 HMGCR の活性抑制 (Hirose et al., 1991) や本遺伝子の発現抑制 (Ide et al., 2009; Liang et al., 2015) が、他方、LDL 取り込みに関わる受容体、LDLR の遺伝子発現については発現の抑制 (Ide et al., 2001)あるいは影響しないこと (Rogi et al., 2011; Liang et al., 2015) が報告されており、今回の検証結果である、*Hmgcr* および *Ldlr* の遺伝子発現抑制と大部分が一致していた。また SE が Cho を Cho エステルに変換する酵素 *Acat2* の遺伝子発現を有意に抑制することも確認された。SE がこれらの遺伝子発現に影響し Cho 低下作用をもたらすものと推察される。一方、Cho から胆汁酸への異化酵素である *Cyp7a1* に関しては、SE による発現亢進が報告されているが (Liang et al., 2015)、今回の検証においては SE の影響は確認されなかった。また肝臓からの Cho 排泄に関わる *Abcg5* および *8* に関しては、その発現は SE に影響を受けないとの先行研究もあるが (Rogi et al., 2011)、今回の検証ではこれらの発現亢進が認められ Cho 低下作用に一部寄与している可能性が考えられた。

これら Cho 代謝関連分子種と概日リズムの接点、それらを元に SE の時間依存的な作用増強、つまり朝 (活動期の始め) 投与がより強く作用する理由を考察したい。かねてより特に HMGCR の概日性は報告されており、夜行性および昼行性問わず、ラットおよびヒトで共通に、暗期にその活性および遺伝子発現が顕著に高まることが報告されており (辻田 et al., 1995; Kandutsch et al., 1969; Edwards et al., 1972)、スタチン等の HMGCR 阻害剤が時間薬理的アプローチによる夜間投与の試みがなされてきた (Plakogiannis et al., 2007; Izquierdo-Palomares et al., 2016)。LDLR も同様に概日性が報告されており、ZT12 付近の明期終わりから暗期にかけて遺伝子発現のピークがあることが報告されている (辻田 et al., 1995; Oda et al., 2009; Martelot et al., 2009)。今回の我々の検討においても、*Hmgcr* および *Ldlr* 遺伝子発現のリズム性は先行研究とおおよそ同じであった。*Hmgcr* および *Ldlr*

は主に SREBP2 の制御下にあることは分かっているが (Madison et al., 2016)、一方で、SREBP2 のリズム性に関する報告は少なく、明期をピークとした非常に弱い振幅のリズム性 (Oda et al., 2009)、あるいはリズム性が無いという報告もある (Knight et al., 2005)。今回、我々の検討では本分子に明瞭なリズム性は認められなかった。一方で、特に SE の朝投与時においてのみ、有意な *Srebp2* の遺伝子発現低下が認められたこと、また *in vitro* の検討結果、SE は SREBP2 の作動拮抗作用を有することも判明した。以上のことから、SE は *Srebp2* を遺伝子発現レベルで、また、SREBP2 をタンパクの機能レベルで抑制することで、その下流のコレステロール合成や LDL 取り込みを遺伝子発現レベルで抑制し、コレステロール代謝経路を調節しているものと推察された(図 27)。ただし、その作用が朝投与でより強く起こる詳細なメカニズムは不明であり、今後の検討が必要である。



SREBP2: Sterol response element binding protein 2,
SRE: Sterol Response element,

図 27. SE と SREBP2 経路に関する本検討結果の整理と作用の推定

今回の検討において、肝臓からのコレステロール排泄に関わる *Abcg5* および *Abcg8* の遺伝子発現が SE の投与でその発現が有意に亢進した。その作用は朝投与でわずかに強かったが、決定的な時間依存性では無かった。ABCG5 および ABCG8 の概日性およびその制御については、明期をピークとしたリズム性ならびに時計遺伝子の制御下にあること (Pan et al., 2016; Molusky et al., 2018) 、また転写因子 LXR の標的遺伝子でコレステロールの上昇に伴い反応する分子である (Calkin et al., 2012) ことが分かっている。今回の検討では、少なくとも *Lxr* 自身の遺伝子発現レベルには影響しないことが分かったのみであり、SE の肝臓中 *Abcg5* および *Abcg8* の発現制御機構は不明である。

生体のコレステロールレベル調節を腸管が一部担っていること、その制御に体内時計が関与していることはよく知られている (Hussain et al., 2015)。SE の腸における Cho 代謝に関しては、Cho の胆汁酸ミセル形成抑制がラットでの検討にて (Hirose et al., 1991) 、また、体内への Cho 取り込みに関わるトランスポーター NPC1L1 や管腔側への Cho 汲み出しに関わるトランスポーター *Abcg5*, *Abcg8* の遺伝子発現抑制、また、Cho エステルへの変換酵素 *Acat2* やカイロミクロン形成酵素である *Mttp* の遺伝子発現がいずれも発現抑制されることがハムスターの試験で報告されており (Liang et al., 2015) 、腸における Cho 代謝にも SE が影響する可能性が示唆されている。今回、我々もその観点で腸管の *Npc1l1*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Acat2* について遺伝子発現をチェックしたところ、肝臓の解析と比べデータのばらつきが大きいこともあり、SE の影響はほとんど認められなかった (図 13j,k,l,m、2-way ANOVA 検定結果より)。先行研究のラットやハムスターの検証結果は、いずれも高 Cho 負荷食による検討であったため、外因性の Cho が豊富な条件が故に、腸管がその環境変化に対する応答として各分子種の動きが活性化された結果、あるいは SE が今回の我々の検証より相対的に高用量であったため (先行研究：食餌中 0.2~0.5%SE、今回：100mg/kg 経口投与で 0.1%混餌等量)、先行研究においては SE の影響がより見えたのかもしれない。以上

のことから、今回の検証においては、SEのCho代謝制御は主に腸管ではなく肝臓で行われていた可能性が高い。

TG指標の結果のまとめをtable4にまとめた。SEは主にラットで血中や肝臓のTGを低下させる作用を有し、そのメカニズムとして、*Acox*等脂肪酸 β 酸化酵素の亢進、*Fasn*等脂肪酸合成の抑制、DGAT等のTG合成抑制が報告されており、これら酵素群は主にPPAR α あるいはSREBP1-c制御下にあることが知られている (Ashakumary et al., 1999; Lim et al., 2007; Ide et al., 2009)。脂肪酸代謝、特にPPAR α と時計制御の観点は特に多く報告されており、例えば、PPAR α の転写調節領域にはE-boxが存在し時計遺伝子が結合することでその転写が制御されていること (Gooley et al., 2016)、結果として、PPAR α やその標的遺伝子である脂肪酸代謝酵素は概日性を有すること (Oishi et al., 2005; Hayashida et al., 2010; Guan et al., 2018)、時計遺伝子の変異はPPAR α およびその標的遺伝子のリズム性を消失させ (Oishi et al., 2005)、脂質代謝異常を呈することが報告されている (Turek et al., 2005)。近年では、これらの知見を応用し、PPAR α 作動薬を時間薬理的アプローチで使う基礎研究も報告された (Guan et al., 2018)。

今回、SEは血中および肝臓のTGを軽度抑制したものの、先行研究からの予測ほどその作用は大きくなく、また先述のCho指標と比較してその改善幅は小さかった。先述の通り、先行研究 (Ashakumary et al., 1999; Lim et al., 2007; Ide et al., 2009)と比較して今回の検証では食餌中の脂肪負荷量が高かったことが理由かもしれない。また、肝臓脂質代謝関連遺伝子の発現解析の結果、SEの投与によって、TGを減らす方向としての脂肪酸酸化酵素 (*Acox*, *Acadm*)の亢進や合成酵素 (*Fasn*)の抑制が起こると同時に、それと連動し、TGの蓄積を促す方向としての脂肪酸の細胞内取り込み (*Cd36*)も強く高まっており、これら両分子群の作用拮抗のために、SEによる肝中TG低下作用が緩徐である可能性が考えられた。

SEのTG低下作用における時間依存性に関しては、特に肝臓のTGに着目すると、

夕（活動期の終わり）投与でのみ有意な低値を示した。その理由として、夕投与時にのみ *Ppara* の発現が有意に亢進したことや、軽微ではあるものの TG の細胞外分泌に関わる *Mttp* の遺伝子発現が亢進したことによるかもしれない。対して朝投与時には脂肪酸取り込みに関わる *Cd36* の発現亢進がより強かったこと、および TG の de novo 合成酵素 *Dgat1* の発現が亢進傾向にあること等、肝臓の脂肪量を高める方向の分子群が亢進しており、*Acox* や *Acadm* 等脂肪酸の酸化、つまり脂肪量を減らす分子種の活性化と拮抗することが原因で、特に朝投与の肝臓は SE の TG 低下作用が確認されなかったものと推察された(図 28)。

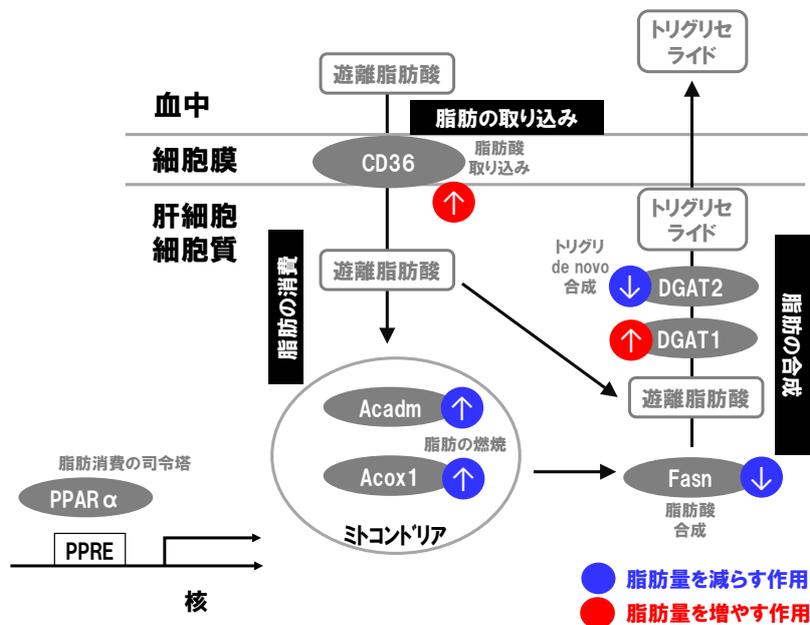


図 28. トリグリセライド代謝経路における SE の作用点とその作用拮抗

SE を特に朝投与した際に、TG を消費し脂肪量を減らす方向に働きかける作用（図内、青矢印）と TG を合成し脂肪量を増やす方向に働きかける作用（図内、赤矢印）とが拮抗する可能性を示した図。

今回、自発行動量や食行動等、概日リズムを考察しうる精緻な行動パターンはデータを取得出来ていないが、摂餌量に関しては、朝あるいは夕投与いずれにおいても SE の影響は認められていないことから、特に SE が SCN 等の脳の時計中枢に働きかけ、一般行動や食行動等を大きく変化させた結果ではないことが推察される。また、SE の行動レベルでのリズム性に関する報告や、SCN に対する影響は過去に報告されていない。一方、SE の脳機能に対する影響はラット脳内出血モデル、ラット糖尿病性認知症モデル、マウス慢性ストレス誘発不安モデル等のモデル動物を用いた検証結果が報告されていること (Ohnishi et al., 2013; Farbood et al., 2019; Zhao et al., 2017)、その中で例えば SE が脳の抗酸化機能に影響することや、カテコラミン、セロトニン等の神経伝達物質産生に影響しうることが明らかとなっている。またラベル体を用いた SE の検証において SE がわずかに脳組織に分布することも報告されている (Tomimori et al., 2017)。以上のことから、摂取した SE の一部が脳組織に届いて直接的に、あるいは何がしかの間接的経路を介して、脳機能に影響しうる可能性は考えられるが、本研究における SE の脳機能や時計中枢への影響ならびにそれらの末梢組織の表現型への影響は正確には不明であり、今後の検討課題である。

SE の摂取時間によってその体内利用率に差異が生じる場合、薬力学的な結果に影響を及ぼすため、SE の朝あるいは夕投与が血中および標的臓器である肝臓の濃度に及ぼす影響を検証した。この結果、単回投与の血中濃度は、E の C_{max} が朝投与で高値傾向にあったが、AUC としての差異は認められなかった。また S や各代謝物には大きな差が無かったことから、血中濃度の観点では投与時刻に強く影響を受けないことが推察された。さらに、28 日間反復投与後の肝臓中セサミン類の分析結果、セサミン類およびその代謝物は投与時刻の影響を受けなかった。これら血中および肝臓の分析結果から、セサミン類の動態は総じて投与時刻に影響を受けず、特に、脂質代謝の重要な臓器である肝臓で明らかな差が認められなかったことから、セサミン類の投与時刻依存的な脂質代謝改善効果に、セサミン類の代謝動態の影響は極めて小さいものと推察された。

一方、食品成分、特に脂質や脂溶性物質の吸収が日内変動を持ち、例えばトリグリ
の輸送タンパクである Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) がそれに関与して
いる等、メカニズムも一部分かってきている (Hussain et al., 2015)。例えば、リコピンは
ラットあるいはヒトでの検証において、昼あるいは夜摂取と比較し、朝摂取で血中濃度が高
まることが報告されている (青木 et al., 2017)。また魚油においても朝摂取のほうが血中
濃度の観点で好ましいという結果を得ている (Oishi et al., 2018)。上述の通り、単回投与
において血中 E が朝投与で C_{max} が高い傾向にあったこと、セサミン類が物性的には脂溶性
であること等は、これらの先行研究と比べても大きく矛盾しない。一方で、今回の検証では、
セサミン類の中で E のみが摂取時間の影響をわずかに受け、S は影響を受けなかった等、不
明な部分も多く、今後の検討課題である。

高コレステロール負荷モデルラット (検証 2-4) では、本モデルラットの溶媒対照
群の摂食量が時間で変動したため、SE の投与時刻依存性の判断は困難であったが、少なく
とも SE の朝投与が外因性コレステロール代謝異常時の血中および肝臓中 Cho の低下に影
響しうる可能性が示された。

2-6. 小括

以上、第2章では、時間栄養学的アプローチにて、SEの脂質代謝改善効果が投与時刻に影響を受けるか否か、高脂肪食負荷モデルラット（検証2-1.および検証2-2）を用いて検証した。この結果、特にコレステロール代謝への作用において朝摂取でかつ継続摂取することがより好ましい可能性が示された。この時、転写因子SREBP2を介したコレステロール合成系の抑制、肝臓からのコレステロール排泄が寄与している可能性が示唆された。TG評価指標においては、わずかに夕投与がより好ましい傾向にあり、朝投与時はTGの消費と合成が作用拮抗している可能性も考えられた（図29）。SEの動態指標は大きくは投与時刻の影響を受けなかったことから（検証2-3）、先の脂質代謝に対するSEの作用の投与時刻依存性において動態の寄与は小さいものと推察された。高コレステロール負荷モデルラット（検証2-4）では、少なくともSEの朝投与が血中Choの低下に有効である可能性が示されたが、投与時刻依存性に対する結論を導くことは出来なかった。

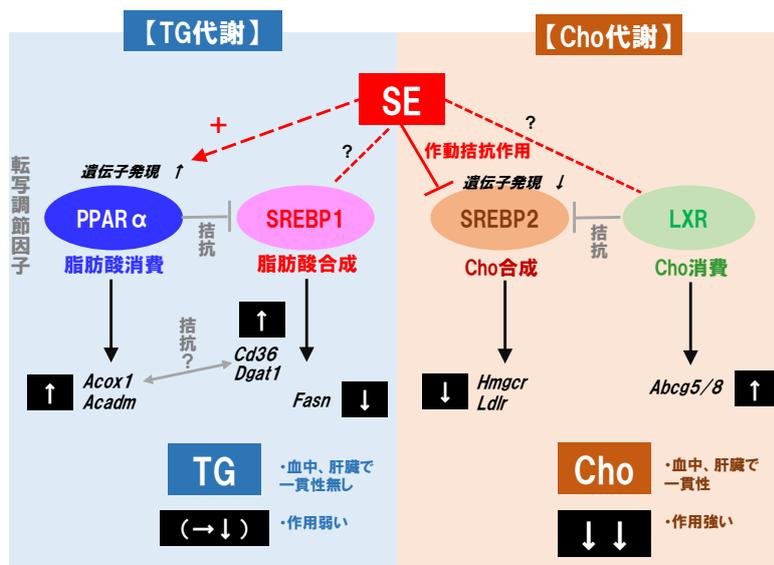


図29. SE脂質代謝作用点の推定 まとめ

第3章 体内時計作用栄養学的アプローチによるセサミン類と体内時計の関係性検証

3-1. PER2::LUC ノックインマウス *In vivo imaging* を用いたセサミン類の体内時計調節作用の検証

3-1.1. 序論

これまでに SE の体内時計調節作用に関する検証は報告されていない。一方、医薬品候補化合物や天然の食品成分等、低分子化合物が体内時計を調節しうるものが *in vivo* および *in vitro* で報告されている (Narishige et al., 2014; He et al., 2016a; He et al., 2016b; Shinozaki et al., 2017; Xu et al., 2018)。そこで、本項では PER2::LUC ノックインマウスを用いた *in vivo imaging* 法にて体内時計調節作用の可能性を検証した。

3-1.2. 実験材料及び方法

【試験サンプル】

第2章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。

【実験動物および飼育環境】

全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)に基づき、早稲田大学およびサントリーホールディングス株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施された。

PER2::LUC ノックインマウスとは時計遺伝子 *Per2* の下流にレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子が導入されたマウス (Yoo et al., 2004) であり、時計遺伝子の周期的変動に伴ってルシフェラーゼを発現するため、外部から発光基質ルシフェリンを投与す

ることで化学発光する。本発光についてライブイメージング手法等を用いてモニターすることで、生きたまま時計遺伝子の発現を測定できる動物である (Tahara et al., 2012)。実験には 10 週齢の雄性 PER2::LUC ノックインマウスを使用した。具体的には、C57BL/6J 系統の PER2::LUC ノックインマウス (Dr. Joseph Takahashi, Northwestern University より供与) を ICR マウスと 5 回以上交配し、*in vivo imaging* に適した白毛の mixed background を作製し使用した。23±1°Cの室温環境、明暗周期 12 時間 (AM8:00 が ZT0) の光環境、餌は実験動物飼料自由摂食 (MF、オリエンタル酵母 (株))、自由摂食、自由飲水下で飼育した。

【動物の処置】

本動物に、溶媒コントロールとしてオリーブオイル 10ml/マウス体重 kg、SE を 125mg/10ml/マウス体重 kg、SE を 250mg/10ml/マウス体重 kg を 3 日間 ZT5(13:00) に連続で経口投与した。N=3/グループとした。以下の手順の詳細は次項に記載する。

【Per2::LUC 発光リズムの *in vivo* モニタリング】

生体の発光は *in vivo imaging system* (IVIS kinetics; Caliper Life Science)を用いて測定した。暗箱の中で、濃縮酸素下、吸入麻酔装置 (XGI-8; Caliper Life Science)を用い、イソフルラン麻酔を施した。その後、マウスを imaging 装置に移し、レポーターであるルシフェラーゼに対する発光基質となるルシフェリン (D-luciferin potassium salt, Promega) を 15mg/kg マウス体重の用量でマウスに皮下投与した。ルシフェリン投与後 6 分および 8 分にて背側 (腎臓) を、10 分および 12 分で腹側 (顎下腺、肝臓) をそれぞれ測定した。測定結果に関しては基本、8 および 10 分のデータを採用し、6 および 12 分は予備とした。撮影終了後、マウスを麻酔回復ケージにて麻酔からの覚醒を確認した後、飼育ケージに戻した。上述の一連の測定を、SE の 3 日目の最終投与 (ZT5(13:00)) から 2 時間後、つまり、ZT7(15:00)より 4 時間

間隔で計 6 ポイント (ZT7、ZT11、ZT15、ZT19、ZT23、ZT3) において実施した (図 30)。

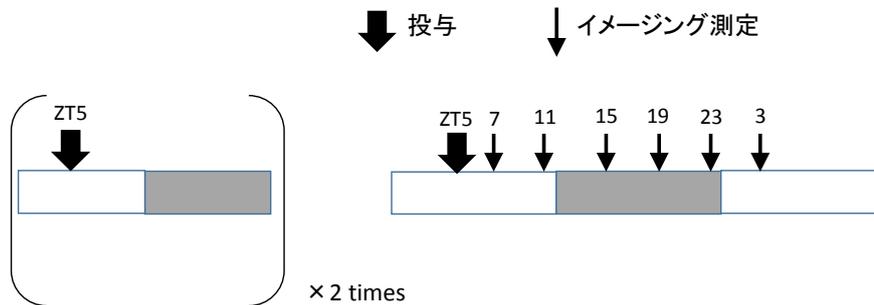


図 30. 試験プロトコル (3-1.PER2::*LUC* ノックインマウス、SE3 回投与試験)

SE の体内時計調節作用を PER2::*LUC* ノックインマウスを用いた *in vivo imaging* にて評価した。詳細は「3-1.2. 実験材料及び方法」を参照。ZT5 にて溶媒コントロールあるいは SE を 3 回連続強制経口投与後、イメージング測定に供した。

【PER2::*LUC* 発光リズムのデータ解析】

得られた発光データは Living Image 3.2 software (Caliper Life Science) を用いて、肝臓、腎臓、顎下腺の各臓器から出た photon 数を解析した。各臓器は ROI (region of interest) で囲み、それぞれの ROI 内から検出した photon 数を photon/sec として解析に使用した。腎臓の発光値は左右の発光値の合計を使用した。photon/sec を raw data に、一日の各臓器の発光値の平均を 100% とした相対値を relative activity として表した。

【統計解析】

データは平均値 ± 標準誤差 (N=3/ポイント) であらわした。経時変化の各ポイントは 1-way ANOVA で分散分析後、Dunnett's test で control 群に対する多重比較検定を実施した。各グループは 2-way ANOVA で有意差検定を実施した。

3-1.3. 結果

PER2 の発現リズムを肝臓、腎臓、顎下腺の各末梢臓器で測定したところ、各臓器ともコントロールとして用いたオリーブオイル投与群と比較して明らかな差がみられなかった。この時の発光リズムのピーク値をみても、明らかな位相変化を確認することはできなかつた(図 31)。これらの指標に SE の用量反応性も確認されなかつた。

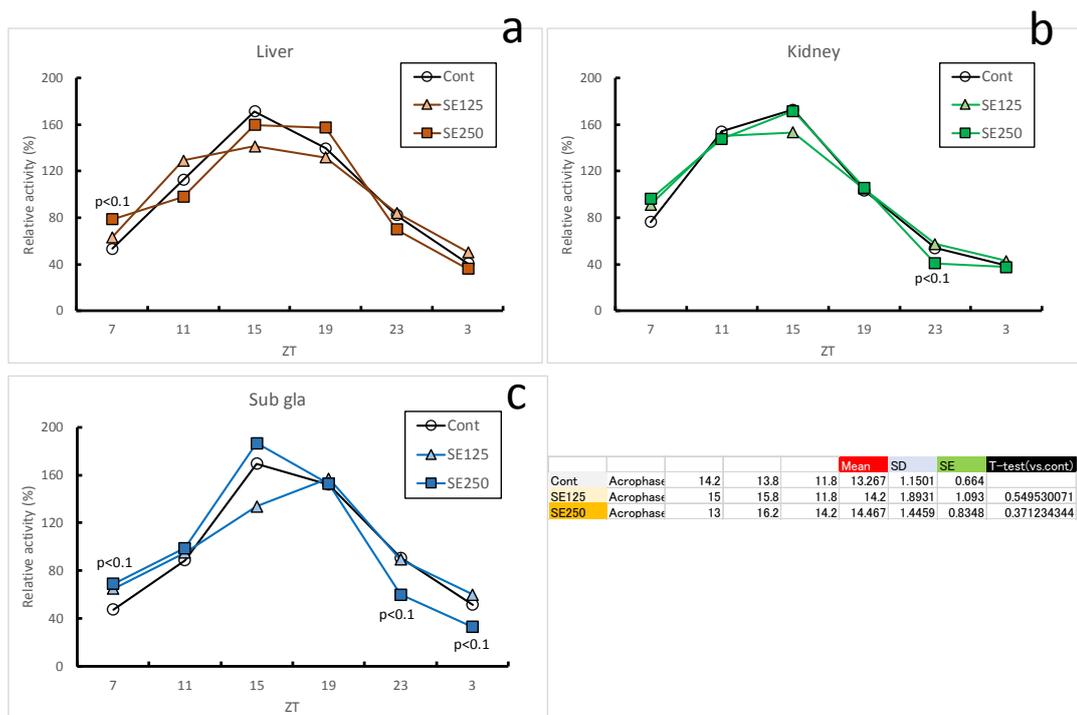


図 31. PER2::LUC ノックインマウス *In vivo imaging* を用いたセサミン類の

体内時計調節作用の検証

(a) 肝臓、(b) 腎臓、(c) 顎下腺。ZT5 にて溶媒コントロールあるいは SE を 3 回連続強制経口投与後、イメージング測定に供した。詳細は「3-1.2. 実験材料及び方法」を参照。○：コントロール群、△：SE125mg/kg 投与群、□：SE250mg/kg 投与群。平均値±標準誤差、n=3/各サンプリングポイント。

3-2. PER2::LUC ノックインマウス MEF 用いた *in vitro* セサミン類の体内時計調節作用の検証

3-2.1. 序論

3-1 での *in vivo* 実験に引き続き、本項では PER2::LUC ノックインマウスを用いた *in vitro* でのセサミン類の体内時計調節作用の可能性を検証した。

3-2.2. 実験材料及び方法

【試験サンプル】

SE の入手は第 2 章 2-1.2. 「実験材料及び方法」の項で記載の通りとした。S、E および各代謝物は化学合成にて調製した。

【細胞】

当研究室で樹立した PER2::LUC ノックインマウス胎児由来繊維芽細胞株 (Mouse embryonic fibroblasts、以下 MEF) を本実験では使用した。

【MEF を用いた各サンプルの *in vitro* 体内時計調節作用の評価】

DMEM 維持培地で培養した MEF に対し、200nM のデキサメタゾンを追加し内因性の概日リズムの同調処理を行った。同調処理 2 時間後、2.7mM NaHCO₃、10mM HEPES、20mg/L kanamycin、0.1mM D-luciferin、10% fetal bovine serum (Bio West, U.S.) 含有 DMEM 培地 (以下、ルシフェリン含有培地) に置換した。評価したい体内時計指標に応じて後述するサンプル滴下、その他操作①②を行った。化学発光は LumiCycle (Actimetrics、U.S.) を用いて 10 分間隔で測定した。

操作①：振幅および周期の評価に関しては、ルシフェリン含有培地に置換後、各試験サンプルが所望の濃度になるように滴下し、LumiCycleにて測定を開始した。

操作②-1：位相の評価に関しては、ルシフェリン含有培地に置換後、試験サンプル非添加で LumiCycleにて測定を開始した。波形をモニターしながら、位相前進作用の見極めを目的に、その波形がトラフ直後、CT3 のタイミングで LumiCycle から dish を取り出し、各試験サンプルを含有する培地に入れ替えた。30 分後 wash して試験サンプルを取り除き、ルシフェリン含有培地に再置換後、LumiCycleにて測定を再開した。

操作②-2：同様の操作を位相後退作用の見極めを目的に、CT18 のタイミングでも実施した。

【*In vitro* データの解析】

得られたデータは R software (R development Core Team)を用いて 24 時間移動平均を差し引くことでデトレンド処理した。波形のピークを決定し、その高さを振幅評価に、そのピーク時刻を周期および位相評価に用いた (図 32)。

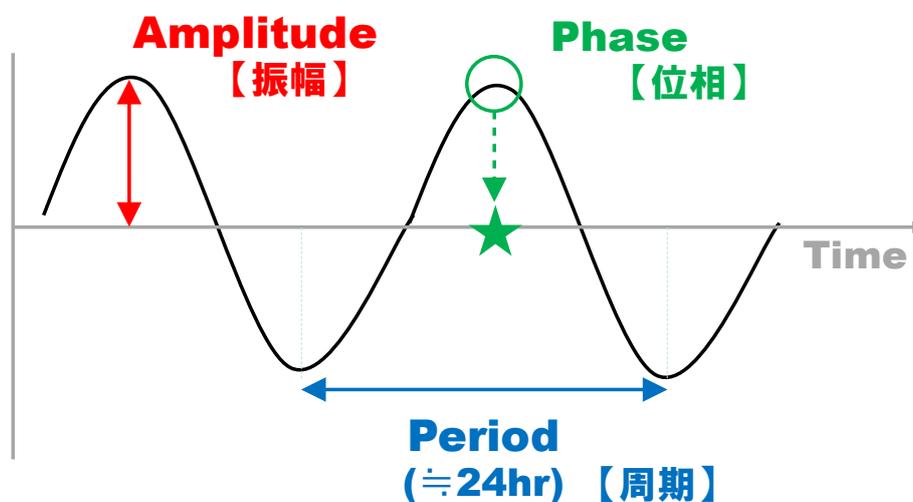


図 32. 時計の 3 指標

【統計解析】

データは平均値±標準誤差 (N=4/ポイント) であらわした。1-way ANOVA で分散分析後、Dunnett's test で control 群に対する多重比較検定を実施した。 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

3-2.3. 結果

3-2.3.1 振幅および周期に対するセサミン類の影響

始めに操作①にて、体内時計の振幅及び周期に対する SE (S:E=1:1 の混合物) の影響を検証した。1.5 μ M から 50 μ M の濃度範囲において検証した結果、3 μ M 以上の用量で有意かつ用量依存的な振幅亢進作用が認められた (図 33a,b)。この時、振幅は最大で約 40% の増加が確認された。周期に関しては振幅よりもその影響は小さく、SE25 μ M 以上で短縮傾向が認められ、50 μ M で有意な周期長の短縮が確認されたが (図 33c)、用量反応性は明確ではなかった。周期長は最大で 0.5 時間の短縮が認められた。

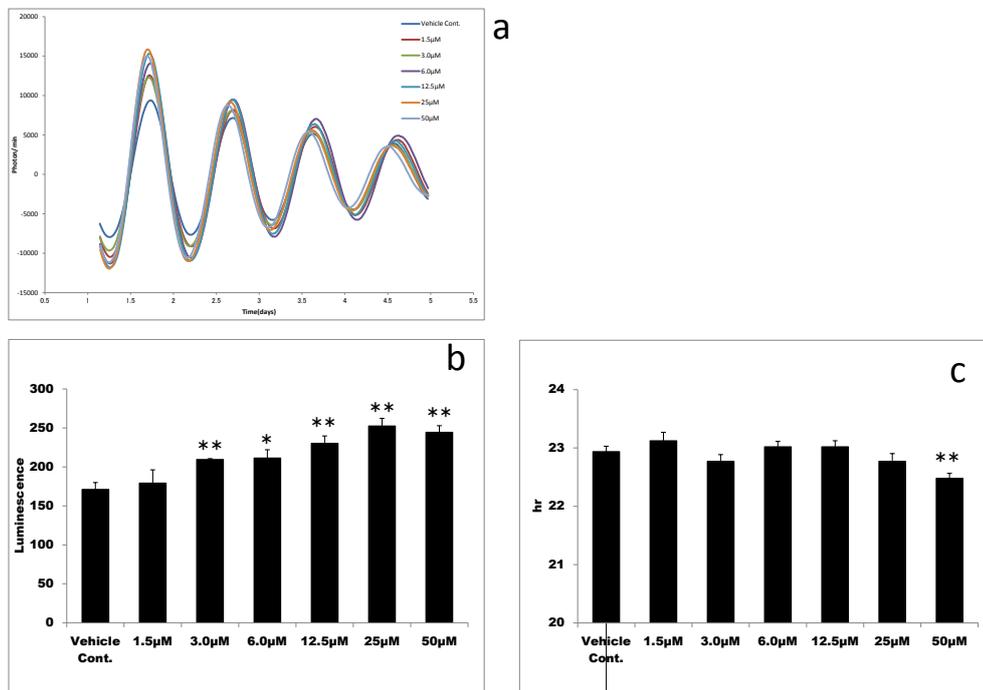


図 33. PER2::LUC ノックインマウス MEF を用いた *In vitro* セサミン類の

体内時計調節作用の検証 <振幅および周期への影響>

(a) デトレンド処理後の波形データ、(b) 振幅、(c) 周期。詳細は「3-2.2. 実験材料及び方

法」を参照。平均値±標準誤差、n=4/各処理。** P <0.01, * P <0.05, vs CON。

同様に操作①にて次に試験濃度を $10\ \mu\text{M}$ に固定し以下の観点で比較検討を行った。

・ S および E の比較 (構造異性体)

S の振幅が 67% 増 / 周期が約 0.7 時間短縮に対し、E の振幅が 69% 増 / 周期が約 1 時間短縮であり、作用の方向性やその強さに大きな違いはなかった (図 34)。

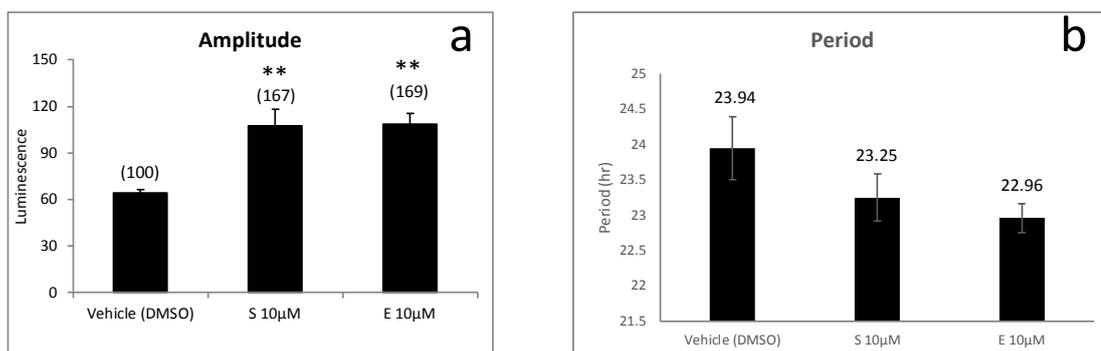


図 34. PER2::LUC ノックインマウス MEF を用いた *In vitro* セサミン類の体内時計調節作用の検証 <S および E の比較>

(a) 振幅、(b) 周期。詳細は「3-2.2. 実験材料及び方法」を参照。平均値 \pm 標準誤差、 $n=4$ / 各処理。** $P < 0.01$ vs Vehicle。

それ以外の以下の結果のダイジェストを図 35 に示した。

・ S とその未抱合代謝物の比較（代謝後の分子内カテコール数の比較）

S の振幅が 67%増／周期が 0.7 時間短縮に対し、ジカテコール体である SC-2 の振幅が 67%増／周期が変化無し、であった。モノカテコール体である SC-1 に関しては、10 μ M で細胞障害性を疑う振幅の大きな落ち込みが認められたため、1 μ M にて再検証した結果、その時の振幅が 65%増／周期が 0.4 時間短縮であった。振幅亢進作用は代謝物である SC-1 が強い可能性が示唆されたが、周期短縮作用に関しては未変化体の S が強い傾向にあった。

・ S とその抱合代謝物の比較：S の振幅が 67%増／周期が 0.7 時間短縮に対し、SC-1 硫酸抱合体の振幅が 51%増／周期が 0.2 時間短縮、SC-1 メチル抱合体の振幅が 19%増／周期が変化無しであった。振幅や周期に対する作用は抱合化によっておおむね減弱する方向に働いた。

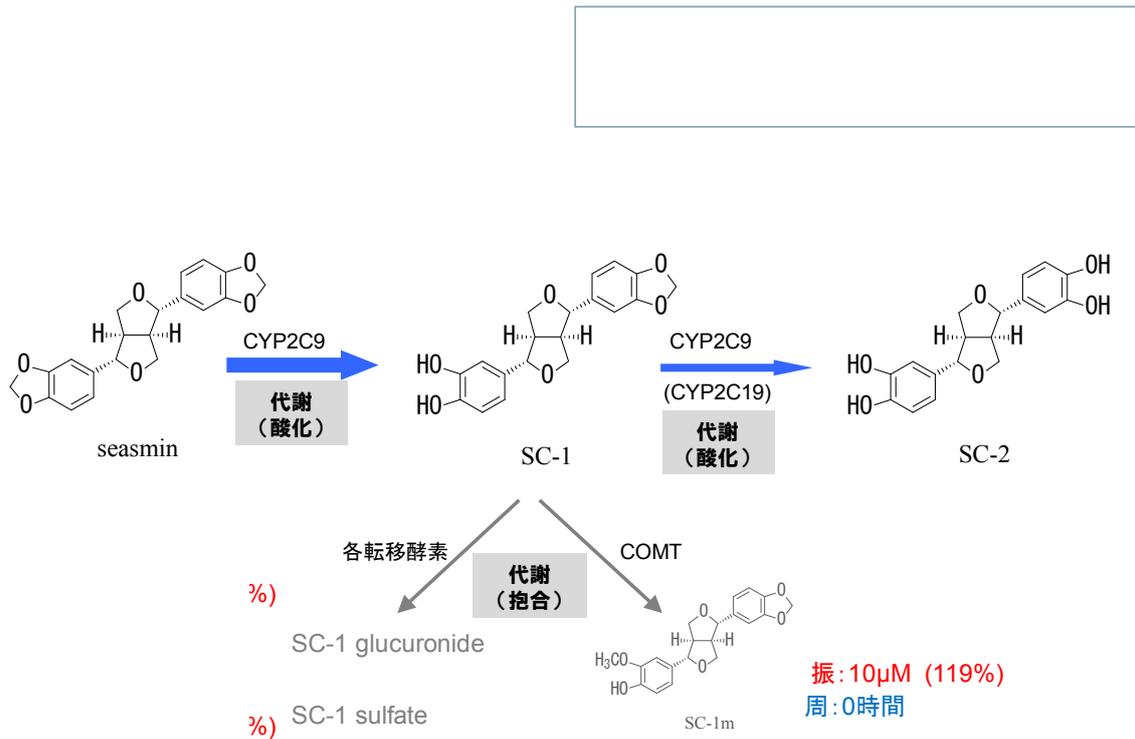


図 35. PER2::LUC ノックインマウス MEF を用いた *In vitro* セサミン類の体内時計調節作用の検証 <S およびその代謝物の振幅と周期に対する影響のまとめ>

赤字で各化合物の振幅への影響を記載 (振、と表記)、検証濃度と振幅変動幅を対 control で表現した。青字で各化合物の周期に対する影響を記載 (周、と表記)、control と比較しての周期の変化幅を時間で表現した。

3-2.3.2 位相に対するセサミン類の影響

操作②-1にて、セサミン類が体内時計の位相を変化させる作用、特に位相前進 (phase-advance) 作用の有無を検証した。結果を図 36 に示す。S、E、それらの未抱合代謝物である SC-1、SC-2、EC-1、EC-2 を $10\mu\text{M}$ の濃度 (SC-1 のみ $1\mu\text{M}$) で検証した結果、特に EC-1 で 0.6 時間程度位相を前進させる傾向にある ($P=0.06$) が明らかとなった。

引き続き、操作②-2にて、セサミン類の位相変容作用、特に位相後退 (phase-delay) 作用の有無を検証した。この結果、S、E、SC-1、SC-2、EC-1、EC-2 いずれの化合物においてもその作用は確認出来なかった (図 37)。

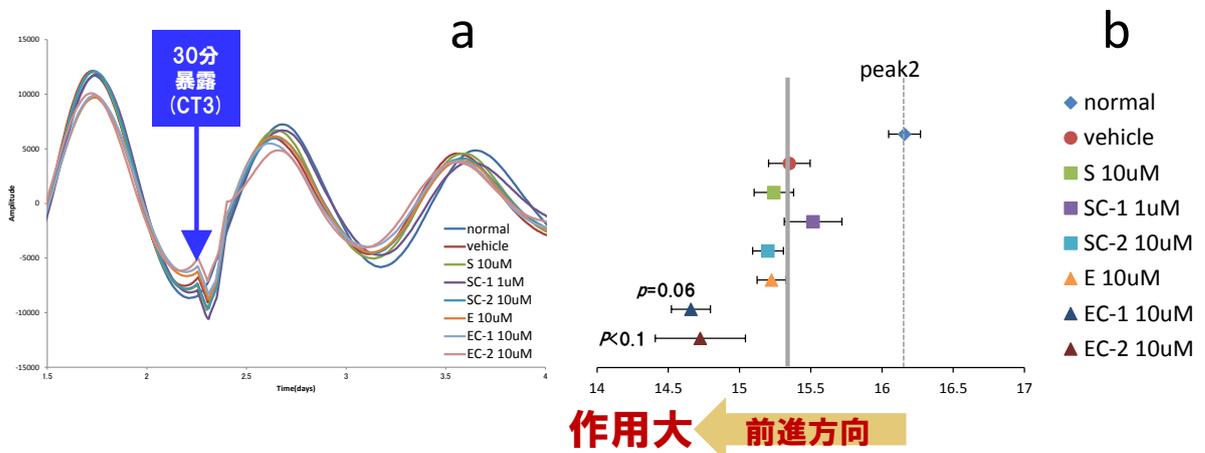


図 36. PER2::LUC ノックインマウス MEF を用いた *In vitro* セサミン類の

体内時計調節作用の検証 <位相前進作用の評価>

(a) デトレンド処理後の波形データ、青矢印 (CT3) にサンプルを添加後、30 分暴露し、ウォッシュして測定を再開した。(b) 各サンプル処理後のピーク時刻。左に動くほど位相が前進していることを意味する。詳細は「3-2.2. 実験材料及び方法」を参照。平均値±標準誤差、 $n=4$ /各処理。

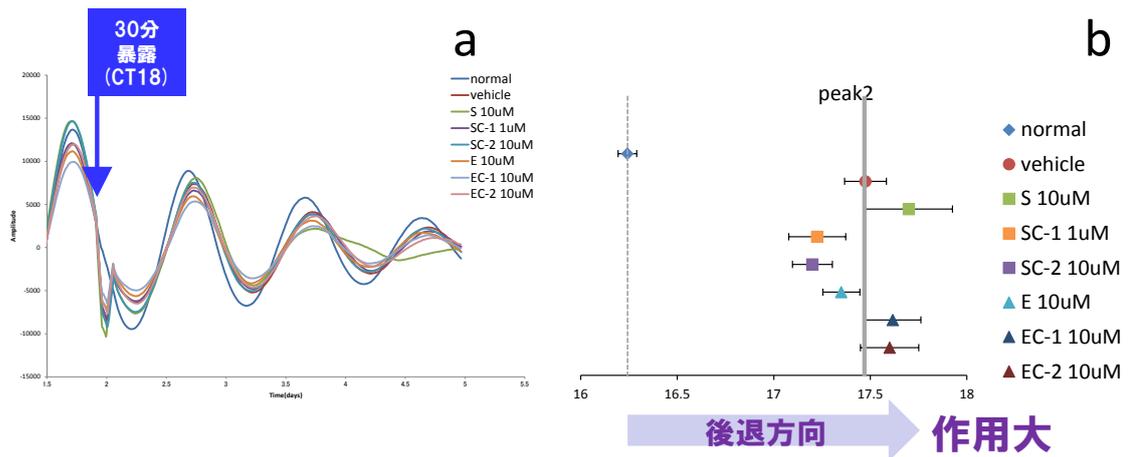


図 37. PER2::LUC ノックインマウス MEF を用いた *In vitro* セサミン類の体内時計調節作用の検証 <位相後退作用の評価>

(a) デトレンド処理後の波形データ、青矢印 (CT18) にサンプルを添加後、30 分暴露し、ウォッシュして測定を再開した。(b) 各サンプル処理後のピーク時刻。右に動くほど位相が後退していることを意味する。詳細は「3-2.2. 実験材料及び方法」を参照。平均値±標準誤差、n=4/各処理。

3-3. 考察

3 章では体内時計栄養学的アプローチにて、SE の体内時計調節作用を検証した。先行研究において、医薬品候補あるいは食品成分等の低分子化合物が体内時計調節作用を示し、その作用点も一部明らかになってきており(Narishige et al., 2014; He et al., 2016a ; He et al., 2016b; Shinozaku et al.,2017; Xu et al., 2019)、今回の SE の結果を時計の 3 指標である、振幅、周期、位相に分けて考察したい。

生物時計の振幅はかねてより、特に加齢で低下すると言われており (Banks et al., 2016; Cornelissen G et al., 2017) 、アンチエイジングのためにも、体内時計の振幅を適正に保ち、また低下した振幅を高めてあげることは有用であると考えられる。SE の振幅に対する作用に関しては、検証 3-1 の PER2::LUC ノックインマウス *in vivo* 評価では SE の作用は認められず、一方、検証 3-2 の PER2::LUC ノックインマウス *in vitro* 評価においては、S、E、それらの代謝物がおおむね振幅を高める方向にあり、またその効果は生体内で代謝、抱合化されると減弱することも明らかとなった。このことは先述の振幅の加齢変化に抗う方向にあり、好ましい作用であると考えられた。先行の *In vitro* 系に関する報告において、時計の振幅を高めることが言われている食品成分としては、caffeine (Narishige et al., 2014) 、Nobiletin (He et al., 2016b; Shinozaki et al., 2017)、Resveratrol (Oike et al., 2008)、Cinnamic acid (Oishi et al., 2017) 等があり、それぞれその作用メカニズムや標的分子として、順に、cAMP/Ca²⁺シグナル、ROR アゴニスト作用、SIRT1 活性化 (Cinnamic acid については詳細不明)、が言われている。S は Sirt1 経路の活性化が報告されていること (Ruankham et al., 2019) 、および先の resveratrol の報告も含めると、今回の S の体内時計の振幅亢進作用に Sirt1 が関与している可能性も考えられるが、今後の検討課題である。また、今回、S の *in vitro* 最低有効濃度は 3 μ M であった。一方、検証 2-3 において S のラット肝臓中濃度は約

0.7 $\mu\text{g/g}$ tissue であり、これはおよそ 2 μM に相当する。つまり、SE を 100mg/体重 kg (S として 50mg/体重 kg) 連続投与したラットの実験結果とは大きくは乖離しない濃度での *in vitro* での振幅亢進作用であり、ラット *in vivo* への外挿性も可能な範囲のデータであると考えられた。

周期長と生理機能との関係性に関しては、まだまだ不明な部分も多いが、例えば、老化細胞では時計の周期が延長しているとも言われている (Ahmed et al., 2019)。今回、検証 3-1 の PER2::LUC ノックインマウス *in vivo* 評価では SE の作用は認められず、一方、検証 3-2 の PER2::LUC ノックインマウス *in vitro* 評価にて、S およびその関連化合物が軽度で周期を短縮する作用を示した。低分子化合物の周期に対する作用は周期を延長させるものが多く (Narishige et al., 2014; He et al., 2016b; Shinozaku et al., 2017; Xu et al., 2019)、周期を短縮する方向に働きかける今回の結果は珍しい。Cinnamic acid は *Per2* mRNA の安定性の減少を介して (Oishi et al., 2017)、また Shikonin はトポイソメラーゼ 2 の阻害を介して (Ogawa et al., 2014)、それぞれ周期短縮作用を発揮すると推察されている。今回の S の周期短縮作用の生理学的意味やその作用メカニズム等は今後のさらなる検討が必要である。

位相に関しては、検証 3-1 の PER2::LUC ノックインマウス *in vivo* 評価では SE の作用は認められず、検証 3-2 の PER2::LUC ノックインマウス *in vitro* 評価にて、EC-1 のみで時計の前進作用が傾向レベル ($p < 0.1$) で確認された。一方で、*in vitro* で EC-1 以外に本作用が確認されなかった理由は不明である。なお、この位相前進作用と、先述の周期短縮作用は時計の波を前にずらす作用の意味では、大きくは作用の方向性は一致するものである。また、位相前進作用の生理学的意義に関しては、高脂肪食誘発の脂質代謝異常が体内時計制御を大きく変化させること (Guan et al., 2018)、このとき、高脂肪食負荷で時計の位相が後退することがマウスおよびヒトで報告されていることから (Barnea et al., 2009; Pivovarova et al., 2015)、今回得られた SE による肝臓時計遺伝子の位相前進作用は意義のある作用だと考える。この作用メカニズムは不明であるが、時計機構が AMP や ATP、NAD⁺

等のエネルギー代謝産物のフィードバックを受けうること(Bass et al., 2010)等から、SE が脂質代謝への影響を介し、エネルギー代謝産物の量的変化をもたらすことによる間接的な体内時計調節である可能性もある。今回の結果、特に *in vivo* での SE の肝臓の時計遺伝子に対する影響が、直接的な作用か、脂質代謝を改善した間接的作用であるかは現時点では不明であるが、これらを参考に今後検討を進めたい。

なお、一連の SE の体内時計調節作用の評価において、3-1 の PER2::LUC ノックインマウス *in vivo* での検証においては、肝臓、腎臓、顎下腺いずれにおいても時計遺伝子に対する影響は認められなかった。先行研究において、SE の生理反応に動物間の種差が存在することが報告されている (Kushiro et al., 2004)。そこでは、ラットにおいては脂質代謝に明らかに作用を示す投与量でマウスを処置しても同様の効果を得ることが出来ないことが報告されており、理由として、マウスの肝臓や血中の S や E の濃度がラットのそれと比較して小さく、Kushiro(2004)の論文において、SE0.2%食 (約 SE200mg/体重 kg) 投与時、ラットの S の血中濃度が $22\mu\text{M}$ 、S の肝臓中濃度が $3.3\text{nmol}/\text{臓器 g}$ に対し、同条件でのマウスの S の血中濃度が $3\mu\text{M}$ 、S の肝臓中濃度が $1.3\text{nmol}/\text{臓器 g}$ と、マウスでの S の量はラットの $1/3$ から $1/7$ であり、マウスにおいて SE 代謝、つまり生体からの消失速度が速いことが示されており、そのことが本研究においてマウス *in vivo* で SE が無影響の理由である可能性がある。また、本項でのマウスへの投与期間は 3 日間であり、第 2 章のラットでの検証結果で示した通り、SE の効果は投与期間に依存する部分も多く、より長期の摂取が必要である可能性も高く、今後の検討課題である。

3-4. 小括

以上、第3章では、体内時計作用栄養学的アプローチにて、SEの体内時計調節作用を検証した。第3章の小括を図38に示す。検証結果、PER2::LUCノックインマウス *in vivo* 評価においては、いずれの時計指標にもSEの投与は影響を及ぼさなかった（検証3-1）。PER2::LUCノックインマウス *in vitro* 評価にて、S、E、それらの代謝物がおおむね振幅を高める方向にあった。周期に対しては、同評価系において、Sおよびその関連化合物が軽度に周期を短縮する作用を示した。位相に対しては、検証3-2のPER2::LUCノックインマウス *in vitro* 評価にて、EC-1のみで時計を前進させる傾向にあった（検証3-2）。

小括：セサミン類の体内時計調節作用

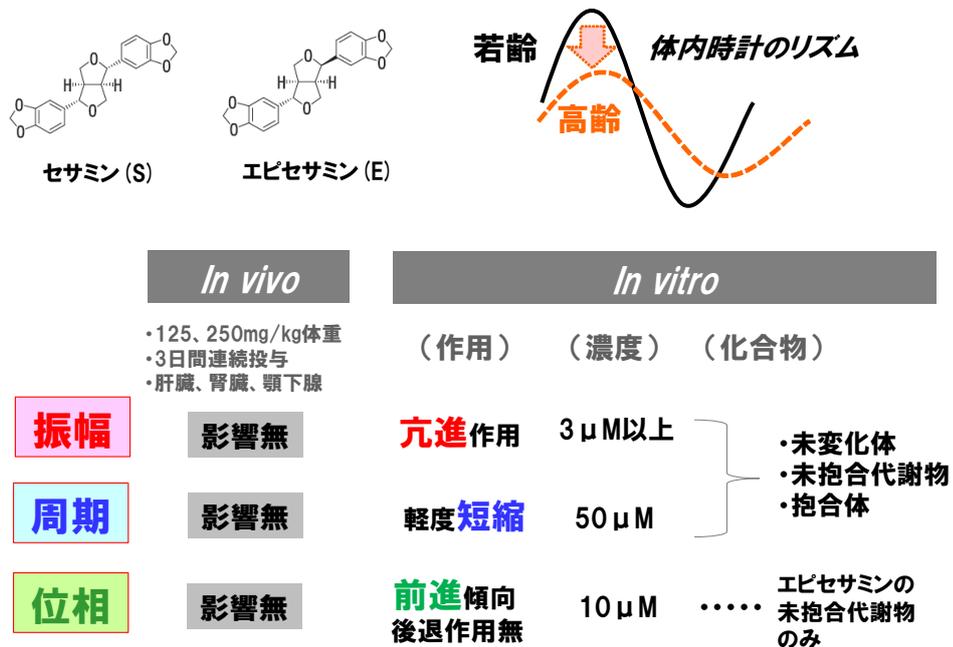


図 38. SE の生理機能と体内時計の関係性 まとめ

第4章 総括

各種生理作用は体内時計で制御されている場合が多いこと、特に脂質代謝は時計との接点が高いこと、SEは脂質代謝改善効果が報告されていること、また食品に含まれる低分子が体内時計調節作用を有することが多く報告されていること等から、本研究では、SEと体内時計との関連性の解明を目的に、時間栄養学的アプローチ（第2章）および体内時計作用栄養学的アプローチ（第3章）で検証を進めた。

第2章では、ラット脂質代謝異常モデルラット（高脂肪食負荷モデル）を中心に、SEの脂質代謝に対する作用が投与時刻に影響を受けるか否か、を検証した。この結果、特にコレステロール代謝において朝および継続摂取することがSEの作用を高め、より好ましい可能性が示された。この時、転写因子SREBP2を介したコレステロール合成系の抑制、肝臓からのコレステロール排泄が寄与している可能性が示唆された。トリグリセライド評価指標においては、わずかに夕投与がより好ましい傾向にあり、朝投与時はTGの消費と合成が作用拮抗している可能性も考えられた。また、SEの動態指標は大きくは投与時刻の影響を受けなかったことから、先の脂質代謝に対する作用の時間依存性に対する動態の寄与は小さいものと推察された。本結果をヒトが摂取するタイミングで考えると、脂質代謝異常症でもコレステロールが高めの方にはSEの朝摂取が、中性脂肪が高めの方には夕摂取が良いかもしれない。

第3章では、PER2::LUCノックインマウスを用い、*in vivo imaging*法（検証3-1）および*in vitro*法（検証3-2）にて、SEおよびその関連化合物の体内時計調節作用の有無を検証した。この結果、*in vivo*評価においてSEはいずれの時計指標にも影響しなかった。一方、*in vitro*評価においては、振幅に対しては、S、E、それらの代謝物がおおむね振幅を高める方向にあり、周期に対しては、これらが軽度で周期を短縮する作用を示した。位相に

対しては、EC-1 のみで時計を前進させる傾向にあった。

以上のように、SE の生理機能発揮において体内時計は深く関与していることが明らかになった(図 39)。SE の数多くの生理機能の恩恵をさらに効率的に享受するためにも、本知見を活用し、例えば、特にコレステロール代謝への影響を期待する場合には、活動期の始めに継続摂取することがより望まれるであろう。また、加齢に伴う体内時計機構の振幅の低下には SE の摂取は有効であることが考えられるため、抗老化食品としての更なる活用も視野に入れるとよいかもしれない。

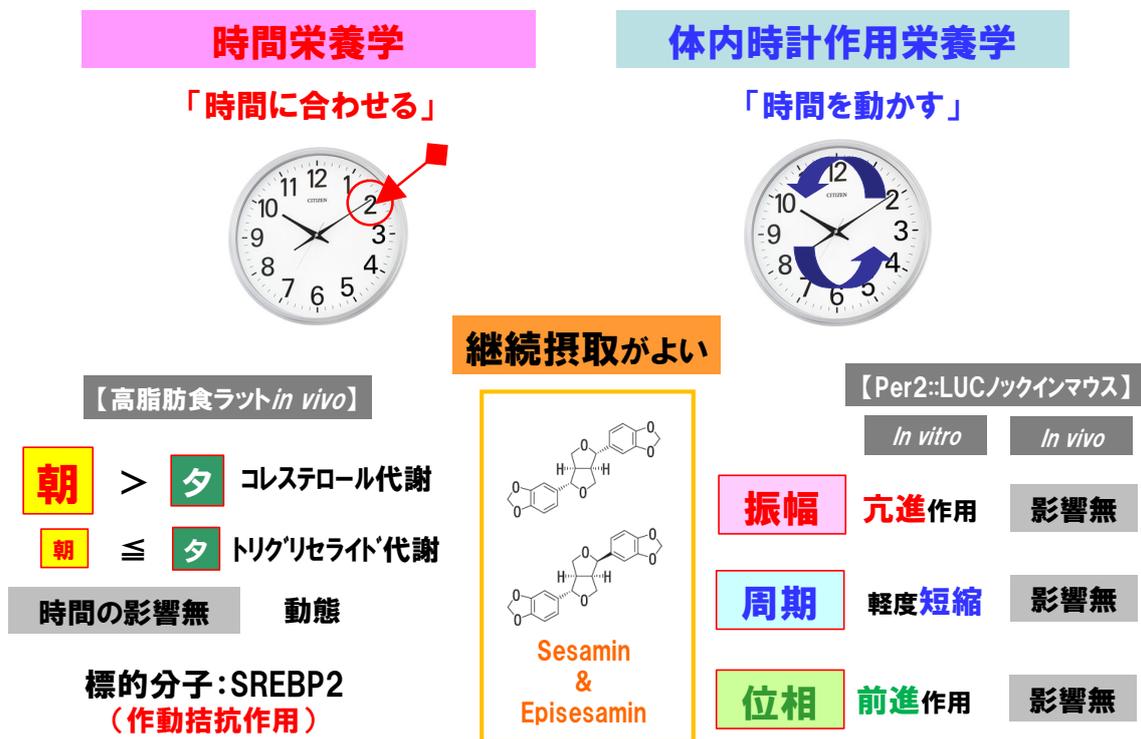


図 39. SE の生理機能と体内時計の関係性 まとめ

一方で、本研究結果の臨床への外挿においては、量的な考察において課題があることも事実である(図 40)。今回、第 2 章で検証したラットの投与量は SE100mg/体重 kg であり、現在市販中の SE 配合のサプリメント(1 日推奨量として SE10mg/日/人 \equiv SE0.2mg/体重 kg)と比較して、投与量換算で約 500 倍の乖離がある。血中濃度からの観点では、ラットへ SE100mg/体重 kg で投与した際に S は 0.3 μ M、ヒトで SE0.2mg/体重 kg を投与した際の子測血中濃度(1 日推奨量の 5 倍量過剰摂取試験からの予測値)は 0.002 μ M であり(社内データ)、約 150 倍の乖離がある。S の代謝物である SC-1 の血中濃度比較では、上述条件のラットが 2.4 μ M、上述条件のヒトでは 0.11 μ M であり(社内データ)、約 22 倍の乖離がある。以上のように、今回のラットの条件と臨床推奨量を比較した場合、投与量で約 500 倍、未変化体の血中濃度で約 150 倍、代謝物で約 22 倍の乖離があることは理解の上で今後の研究活動に繋げていきたい。

In vitro と *In vivo* の濃度比較については、各実測値(第 3 章のマウス *in vitro* データおよび第 2 章ラット *in vivo* 動態データ)を用いて以下に考察する。SE の未変化体は *in vitro* において 3~50 μ M で時計の振幅亢進を、50 μ M で時計の周期の軽度な短縮を示し、位相変容に対する未変化体の影響はなかった(第 3 章)。一方、ラットに SE100mg/体重 kg の用量で投与した際の肝臓では S の未変化体が 2 μ M、E の未変化体が 14 μ M であり(第 2 章)、過剰量の投与設計の前提ではあるが、少なくとも本論文内のマウス *in vitro*/ラット *in vivo* 間の濃度乖離はさほど無いものと考えられた。

以上のように、本論文内では、SE の生理反応が確実に起こる試験条件設定であり、臨床推奨量よりも過剰な用量での検証であったことも事実である。つまり、今回得られた種々の知見は動物、細胞実験での検証レベルにあるため、臨床研究での更なるエビデンス強化、およびその実践に向けての SE の体内時計との接点の理解、そのための各種メカニズム解明も進めていきたい。

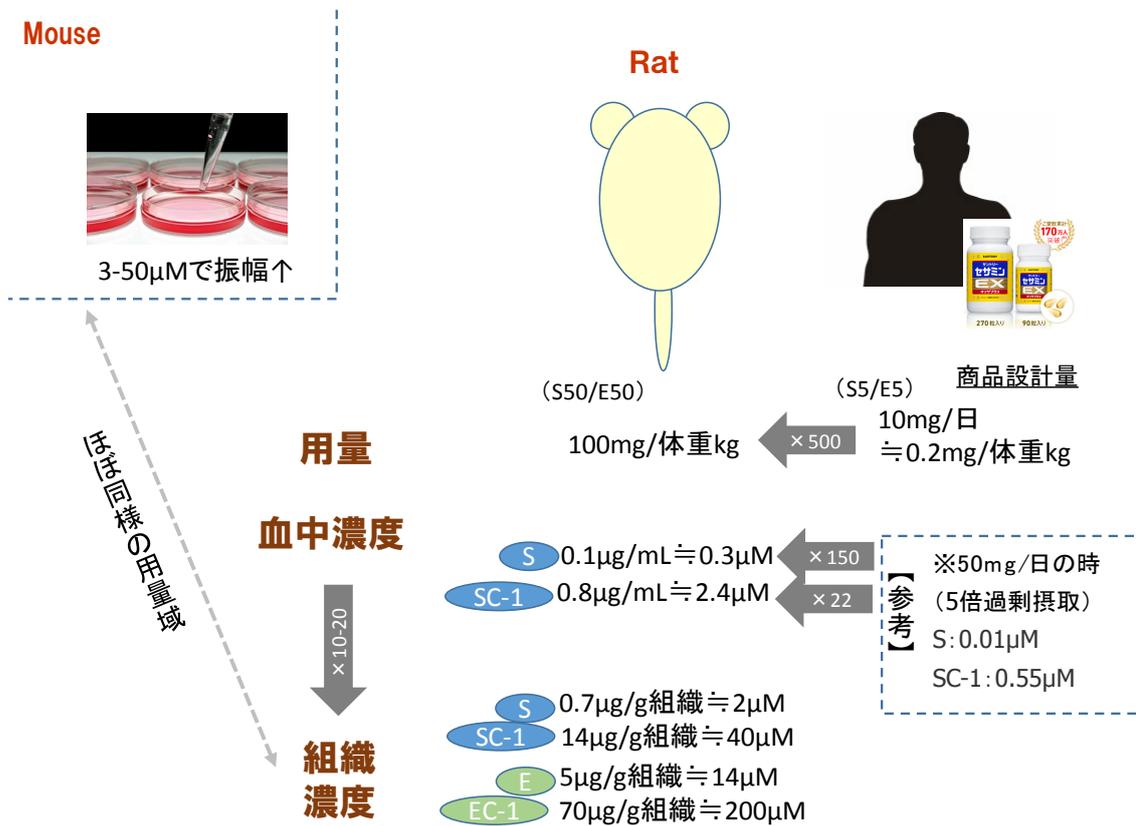


図 40. 本研究結果の外挿性の考察

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 柴田重信教授に甚大なる謝意を表します。また、本論文の作成に際し、ご助言とご高閲を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 竹山春子教授、並びに早稲田大学大学院先進理工学研究科 服部正平教授、早稲田大学大学院先進理工学研究科 大島登志男教授、東京農業工業大学 稲田全規准教授に謹んで感謝致します。また、本研究の遂行に際し、ご協力頂きました柴田研究室の皆様、並びにサントリーウエルネス株式会社健康科学研究所の皆様にご心より感謝致します。

掲載されたジャーナル

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、早稲田大学大学院先進理工学研究科に提出されたものである。

Tateishi N, Morita S, Yamazaki I, Okumura H, Kominami M, Akazawa S, Funaki A, Rogi T, Shibata H, Shibata S. (2019). Administration timing and duration-dependent effects of sesamin isomers on lipid metabolism in rats. *Chronobiol Int.* Dec 13:1-17. doi: 10.1080/07420528.2019.1700998. [Epub ahead of print]

引用文献

青木ら, (2017). リコピン摂取時間帯がラットおよびヒトにおける体内吸収に与える影響. 日本栄養食糧学会誌. 70(4):147-155

Ahmed R, Ashimori A, Iwamoto S, Matsui T, Nakahata Y, Bessho Y. (2019). Replicative senescent human cells possess altered circadian clocks with a prolonged period and delayed peak-time. *Aging (Albany NY)*. 11(3):950-973.

Ashakumary L, Rouyer I, Takahashi Y, Ide T, Fukuda N, Aoyama T, Hashimoto T, Mizugaki M, Sugano M. (1999). Sesamin, a sesame lignan, is a potent inducer of hepatic fatty acid oxidation in the rat. *Metabolism*. 48(10):1303-13.

Ballesta A, Innominato PF, Dallmann R, Rand DA, Lévi FA. (2017) Systems Chronotherapeutics. *Pharmacol Rev*. 69(2):161-199.

Banks G, Nolan PM, Peirson SN. (2016). Reciprocal interactions between circadian clocks and aging. *Mamm Genome*. 27(7-8):332-40.

Barnea M, Madar Z, Froy O. (2009). High-fat diet delays and fasting advances the circadian expression of adiponectin signaling components in mouse liver. *Endocrinology*. 150(1):161-8.

Bass J, Takahashi JS. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*. 330(6009):1349-54.

Bass J. (2012). Circadian topology of metabolism. *Nature*. 491(7424):348-56.

Bass J, Lazar MA. (2016). Circadian time signatures of fitness and disease. *Science*. 354(6315):994-999.

Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, Herzog H. (2009). Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One*. 4(3):e4882.

Calkin AC, Tontonoz P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(4):213-24.

Chaix A, Zarrinpar A, Miu P, Panda S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab*. 20(6):991-1005.

Cornelissen G, Otsuka K. (2017). Chronobiology of Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 63(2):118-128.

Dallmann R, Brown SA, Gachon F. (2014). Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 54:339-61.

Dar AA, Arumugam N. (2013). Lignans of sesame: purification methods, biological activities and biosynthesis--a review. *Bioorg Chem*. 50:1-10.

Deseure K, Bréand S, Colpaert FC. (2007). Curative-like analgesia in a neuropathic pain model: parametric analysis of the dose and the duration of treatment with a high-efficacy 5-HT(1A) receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 568(1-3):134-41.

Durrington PN. (1990). Biological variation in serum lipid concentrations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 198:86-91.

Edwards PA, Muroya H, Gould RG. (1972). In vivo demonstration of the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the liver and intestine of the rat. *J Lipid Res.* 13(3):396-401.

Farbood Y, Ghaderi S, Rashno M, Khoshnam SE, Khorsandi L, Sarkaki A, Rashno M. (2019). Sesamin: A promising protective agent against diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sci.* 230:169-177.

Fukuda Y, Nagata T, Osawa T, Tamiki M. (1986). Contribution of lignin analogues to antioxidative activity of refined unroasted sesame seed oil. *J Am Oil Chem Soc.* 63:1027-1031

Gnocchi D, Pedrelli M, Hurt-Camejo E, Parini P. (2015). Lipids around the Clock: Focus on Circadian Rhythms and Lipid Metabolism. *Biology (Basel).* 4(1):104-32.

Gooley JJ. (2016). Circadian regulation of lipid metabolism. *Proc Nutr Soc.* 75(4):440-450.

Gooley JJ, Chua EC. (2014). Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics. *J Genet Genomics*. 41(5):231-50.

Guan D, Xiong Y, Borck PC, Jang C, Doulias PT, Papazyan R, Fang B, Jiang C, Zhang Y, Briggs ER, Hu W, Steger D, Ischiropoulos H, Rabinowitz JD, Lazar MA. (2018). Diet-Induced Circadian Enhancer Remodeling Synchronizes Opposing Hepatic Lipid Metabolic Processes. *Cell*. 174(4):831-842.e12.

Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol*. 195(2):187-98.

Hayashida S, Kuramoto Y, Koyanagi S, Oishi K, Fujiki J, Matsunaga N, Ikeda E, Ohdo S, Shimeno H, Soeda S. (2010). Proximosome proliferator-activated receptor- α mediates high-fat, diet-enhanced daily oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 activity in mice. *Chronobiol Int*. 27(9-10):1735-53.

He B, Chen Z. (2016a). Molecular Targets for Small-Molecule Modulators of Circadian Clocks. *Curr Drug Metab*. 17(5):503-12.

He B, Nohara K, Park N, Park YS, Guillory B, Zhao Z, Garcia JM, Koike N, Lee CC, Takahashi JS, Yoo SH, Chen Z. (2016b). The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 23(4):610-21.

Hirata F, Fujita K, Ishikura Y, Hosoda K, Ishikawa T, Nakamura H. (1996).

Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis*. 122(1):135-36.

Hirose N, Inoue T, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S, Yamada H. (1991).

Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. *J Lipid Res*. 32(4):629-38.

Hirose N, Doi F, Ueki T, Akazawa K, Chijiwa K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S, Yamada H. (1992). Suppressive effect of sesamin against 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene induced rat mammary carcinogenesis. *Anticancer Res*. 12(4):1259-65.

Hussain MM, Pan X. (2015). Circadian regulators of intestinal lipid absorption. *J Lipid Res*. 56(4):761-70.

Ide T, Ashakumary L, Takahashi Y, Kushiro M, Fukuda N, Sugano M. (2001). Sesamin, a sesame lignan, decreases fatty acid synthesis in rat liver accompanying the down-regulation of sterol regulatory element binding protein-1. *Biochim Biophys Acta*. 1534(1):1-13.

Ide T, Lim JS, Odbayar TO, Nakashima Y. (2009a). Comparative study of sesame lignans (sesamin, episesamin and sesamol) affecting gene expression profile and fatty acid oxidation in rat liver. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 55(1):31-43.

- Ide T, Nakashima Y, Iida H, Yasumoto S, Katsuta M. (2009b). Lipid metabolism and nutrigenomics - impact of sesame lignans on gene expression profiles and fatty acid oxidation in rat liver. *Forum Nutr.* 61:10-24.
- Ikeda S, Kagaya M, Kobayashi K, Tohyama T, Kiso Y, Higuchi N, Yamashita K. (2003). Dietary sesame lignans decrease lipid peroxidation in rats fed docosahexaenoic acid. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 49(4):270-6.
- Izquierdo-Palomares JM, Fernandez-Tabera JM, Plana MN, Añino Alba A, Gómez Álvarez P, Fernandez-Esteban I, Saiz LC, Martin-Carrillo P, Pinar López Ó. (2016). Chronotherapy versus conventional statins therapy for the treatment of hyperlipidaemia. *Cochrane Database Syst Rev.* 11:CD009462.
- Kandutsch AA, Saucier SE. (1969). Prevention of cyclic and triton-induced increases in hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesis by puromycin. *J Biol Chem.* 244(9):2299-305.
- Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, Brown AM, Wiggins D, Patel DD, Gibbons GF. (2005). A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem J.* 389(Pt 2):413-21.
- Kudo T, Horikawa K, Shibata S. (2007). Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: the circadian clock and hyperlipidemia. *J Pharmacol Sci.* 103(2):139-43.

Kudo T, Kawashima M, Tamagawa T, Shibata S. (2008). Clock mutation facilitates accumulation of cholesterol in the liver of mice fed a cholesterol and/or cholic acid diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294(1):E120-30.

Kushiro M, Takahashi Y, Ide T. (2004). Species differences in the physiological activity of dietary lignan (sesamin and episesamin) in affecting hepatic fatty acid metabolism. *Br J Nutr.* 91(3):377-86.

Kuzuya F, Kitagawa M, Yoshimine N, Maeda S, Mori K. (1972). [Changes in diurnal serum triglyceride in diabetic patients (Japanese)]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi.* 9(5):271-8.

Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Lo Sasso G, Moschetta A, Schibler U. (2009). REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.* 7(9):e1000181.

Liang YT, Chen J, Jiao R, Peng C, Zuo Y, Lei L, Liu Y, Wang X, Ma KY, Huang Y, Chen ZY. (2015). Cholesterol-lowering activity of sesamin is associated with down-regulation on genes of sterol transporters involved in cholesterol absorption. *J Agric Food Chem.* 63(11):2963-9.

Lim JS, Adachi Y, Takahashi Y, Ide T. (2007). Comparative analysis of sesame lignans (sesamin and sesamol) in affecting hepatic fatty acid metabolism in rats. *Br J Nutr.* 97(1):85-95.

Madison BB. (2016). Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. *J Lipid Res.* 57(3):333-5.

Mazzoccoli G, Paziienza V, Vinciguerra M. (2012). Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiol Int.* 29(3):227-51.

McGinnis GR, Young ME. (2016). Circadian regulation of metabolic homeostasis: causes and consequences. *Nat Sci Sleep.* 27;8:163-80.

Miyawaki T, Aono H, Toyoda-Ono Y, Maeda H, Kiso Y, Moriyama K. (2009). Antihypertensive effects of sesamin in humans. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 55(1):87-91.

Molusky MM, Hsieh J, Lee SX, Ramakrishnan R, Tascou L, Haeusler RA, Accili D, Tall AR. (2018). Metformin and AMP Kinase Activation Increase Expression of the Sterol Transporters ABCG5/8 (ATP-Binding Cassette Transporter G5/G8) With Potential Antiatherogenic Consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38(7):1493-1503.

Nakabayashi A, Kitagawa Y, Suwa Y, Akimoto K, Asami S, Shimizu S, Hirose N, Sugano M, Yamada H. (1995). alpha-Tocopherol enhances the hypocholesterolemic action of sesamin in rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 65(3):162-8.

Nakai M, Harada M, Nakahara K, Akimoto K, Shibata H, Miki W, Kiso Y. (2003). Novel antioxidative metabolites in rat liver with ingested sesamin. *J Agric Food Chem.* 12;51(6):1666-70.

Nakano D, Kurumazuka D, Nagai Y, Nishiyama A, Kiso Y, Matsumura Y. (2008). Dietary sesamin suppresses aortic NADPH oxidase in DOCA salt hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35(3):324-6.

Narishige , Kuwahara M, Shinozaki A, Okada S, Ikeda Y, Kamagata M, Tahara Y, Shibata S. (2014). Effects of caffeine on circadian phase, amplitude and period evaluated in cells in vitro and peripheral organs in vivo in PER2::LUCIFERASE mice. *Br J Pharmacol.* 171(24):5858-69.

Neubauer DN. (2008). A review of ramelteon in the treatment of sleep disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 4(1):69-79.

O'Donnell JN, Rhodes NJ, Miglis CM, Catovic L, Liu J, Cluff C, Pais G, Avedissian S, Joshi MD, Griffin B, Prozialeck W, Gulati A, Lodise TP, Scheetz MH. (2018). Dose, duration, and animal sex predict vancomycin-associated acute kidney injury in preclinical studies. *Int J Antimicrob Agents.* 51(2):239-243.

Ohnishi M, Monda A, Takemoto R, Matsuoka Y, Kitamura C, Ohashi K, Shibuya H, Inoue A. (2013). Sesamin suppresses activation of microglia and p44/42 MAPK pathway, which confers neuroprotection in rat intracerebral hemorrhage. *Neuroscience.* 232:45-52.

Ogawa Y, Kawano Y, Yamazaki Y, Onishi Y. (2014). Shikonin shortens the circadian period: possible involvement of Top2 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 443(1):339-43.

Oike H, Kobori M. (2008). Resveratrol regulates circadian clock genes in Rat-1 fibroblast cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(11):3038-40. Epub 2008 Nov 7.

Oishi K, Shirai H, Ishida N. (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J.* 386(Pt 3):575-81.

Oishi K, Yamamoto S, Oike H, Ohkura N, Taniguchi M. (2017). Cinnamic acid shortens the period of the circadian clock in mice. *Biochem Biophys Rep.* 9:232-237.

Oishi K, Konishi T, Hashimoto C, Yamamoto S, Takahashi Y, Shiina Y. (2018). Dietary fish oil differentially ameliorates high-fructose diet-induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice depending on time of feeding. *J Nutr Biochem.* 52:45-53.

Pan X, Bradfield CA, Hussain MM. (2016). Global and hepatocyte-specific ablation of Bmal1 induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis. *Nat Commun.* 7:13011.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell.* 109(3):307-20.

Pivovarova O, Jürchott K, Rudovich N, Hornemann S, Ye L, Möckel S, Murahovschi V, Kessler K, Seltmann AC, Maser-Gluth C, Mazuch J, Kruse M, Busjahn A, Kramer A, Pfeiffer

AF. (2015). Changes of Dietary Fat and Carbohydrate Content Alter Central and Peripheral Clock in Humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(6):2291-302.

Plakogiannis R, Cohen H. (2007). Optimal low-density lipoprotein cholesterol lowering--morning versus evening statin administration. *Ann Pharmacother.* 41(1):106-10.

Reiter RJ, Rosales-Corral S, Coto-Montes A, Boga JA, Tan DX, Davis JM, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. (2011) The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: the requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 62(3):269-74.

Rogi T, Tomimori N, Ono Y, Kiso Y. (2011). The mechanism underlying the synergetic hypocholesterolemic effect of sesamin and α -tocopherol in rats fed a high-cholesterol diet. *J Pharmacol Sci.* 115(3):408-16.

Ruankham W1, Suwanjang W2, Wongchitrat P2, Prachayasittikul V1, Prachayasittikul S3, Phopin K1,2. (2019). Sesamin and sesamol attenuate H₂O₂ -induced oxidative stress on human neuronal cells via the SIRT1-SIRT3-FOXO3a signaling pathway. *Nutr Neurosci.* 30:1-12.

Rusyn I, Corton JC. (2012). Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mutat Res.* 750(2):141-58.

Schlierf G, Dorow E. (1973). Diurnal patterns of triglycerides, free fatty acids, blood sugar, and insulin during carbohydrate-induction in man and their modification by nocturnal suppression of lipolysis. *J Clin Invest.* 52(3):732-40.

Schug TT, Li X. (2011). Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Ann Med.* 43(3):198-211.

Shibata S, Hirao A. (2011). 時間栄養学とはなにか 日薬理誌. 137:110-114

Shimizu S, Akimoto K, Shinmen Y, Sugano M, Yamada H. (1989). Production of dihomo- γ -linoleic acid by *Mortierella alpine* 1S-4. *J Am Oil Chem Soc.* 63:1027-1031

Shimizu S, Akimoto K, Shinmen Y, Kawashima H, Sugano M, Yamada H. (1991). Sesamin is a potent and specific inhibitor of delta 5 desaturase in polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids.* 26(7):512-6.

Shinozaki A, Misawa K, Ikeda Y, Haraguchi A, Kamagata M, Tahara Y, Shibata S. (2017). Potent Effects of Flavonoid Nobiletin on Amplitude, Period, and Phase of the Circadian Clock Rhythm in PER2::LUCIFERASE Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS One.* 12(2):e0170904.

Takahashi JS. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet.* 18(3):164-179.

Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Komatsu T, Moriya Y, Okada S, Furutani N, Hirao A, Horikawa K, Kudo T, Shibata S. (2012). In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr Biol.* 22(11):1029-34.

Tahara Y, Shibata S. (2014). Chrono-biology, chrono-pharmacology, and chrono-nutrition. *J Pharmacol Sci.* 124(3):320-35.

Tahara Y, Shibata S. (2016). Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 13(4):217-26.

Tomimori N, Nakai M, Ono Y, Kitagawa Y, Kiso Y, Shibata H. (2012). Identification of the metabolites of episesamin in rat bile and human liver microsomes. *Biol Pharm Bull.* 35(5):709-16.

Tomimori N, Rogi T, Shibata H. (2017). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴C]sesamin in rats. *Mol Nutr Food Res.* 61(8).

Tsujita (1995). コレステロール生合成の日内変動とその調節機構. *動脈硬化.* 22:695-705

Tsuruoka N, Kidokoro A, Matsumoto I, Abe K, Kiso Y. (2005). Modulating effect of sesamin, a functional lignan in sesame seeds, on the transcription levels of lipid- and alcohol-metabolizing enzymes in rat liver: a DNA microarray study. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(1):179-88.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 308(5724):1043-5.

Xu T, Lu B. (2019). The effects of phytochemicals on circadian rhythm and related diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 59(6):882-892.

Yamajuku D, Okubo S, Haruma T, Inagaki T, Okuda Y, Kojima T, Noutomi K, Hashimoto S, Oda H. (2009). Regular feeding plays an important role in cholesterol homeostasis through the liver circadian clock. *Circ Res*. 105(6):545-8.

Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM. (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*. 126(4):801-10.

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkha SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(15):5339-46.

Zhao TT, Shin KS, Park HJ, Yi BR, Lee KE, Lee MK. (2017). Effects of (-)-Sesamin on Chronic Stress-Induced Anxiety Disorders in Mice. *Neurochem Res*. 42(4):1123-1129.