

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12710

研究課題名(和文) 週間リズムの視点の運動科学・栄養科学による肥満予防

研究課題名(英文) Anti-obesity approach by weekly rhythm of nutrition and exercise

研究代表者

柴田 重信 (Shibata, Shigenobu)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：10162629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計のリズム性の現象として本研究課題では、週に焦点を当てた研究を展開した。ヒトでは、weekday(平日)とweekend(週末)の過ごし方が異なり、平日は学校・仕事で無理に早起きし、週末は遅寝・遅起きとなり、週の中で社会的時差ボケ状態になっている。社会的時差ボケマウスでは土日で末梢時計遺伝子発現・エネルギー代謝リズムが大きく後退し、次の金曜日までに戻らないことが分かった。ヒトの髭毛包細胞のPer3発現リズムの評価でも、社会的時差ボケの夜型は、月曜と金曜で遺伝子発現プロファイルが大きく異なった。社会的時差ボケによる時計の乱れが肥満や精神機能に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The locomotor activity rhythm is entrained by delayed light-dark (LD) cycle. In human lifestyle, many people experience social jetlag (SJL) in which bedtime and/or wake-up time are delayed on weekends compared to weekdays. To develop a SJL model in mice, 3- or 6-h delay of LD cycle for 2 days and original LD cycle for the following 5 days were applied for several weeks. The rhythm of peripheral clocks of the liver, kidney, and submandibular gland was monitored by in vivo monitoring of bioluminescent rhythm in PER2::LUC mice on the first recovery day and on the day just before the delay of LD cycle. The central clock was easily entrained by advanced light-on time, whereas peripheral clocks and metabolic energy expenditure rhythm were hardly entrained. Per3 gene expression rhythm in follicular cells showed irregular pattern in person with SJL. Our results demonstrated that the SJL cycle caused irregular pattern of clock expression might produce health disturbances to people with SJL.

研究分野：時間栄養学

キーワード：時差ボケ 時計遺伝子 高脂肪食 体内時計

1. 研究開始当初の背景

(1) 1997年に哺乳動物の体内時計遺伝子、*Clock*、*Per1*がクローニングされた。その後の10年間で、十数個の時計遺伝子が見いだされ、24.5時間の発振や明暗環境に合わせる(同調、リセット)のシグナル伝達が解明されてきた。時計遺伝子の発見により、時計は視床下部の視交叉上核に中枢時計があるものの、末梢組織にも末梢時計がローカル時計として機能していることが分かった。また、視交叉上核以外の末梢時計機構は食餌リズムに同調し、特に朝食・夕食では、朝食に同調しやすいことが分かった。さらに食餌の内容に関しては炭水化物系にタンパク質がある程度含まれると同調に効果的であることが分かった。夜食は太るという言葉があるように、1日の総摂取量を一定にし、朝・夕に分割摂取させた場合、朝食を主体とした食餌パターンは太りにくく、体内時計にも影響を及ぼさなかった。このように体内時計と食・栄養の関係を調べる学問として、「時間栄養学」を提唱した。このようなアイデアを1週間単位の研究に持ち込むことを考えた。1週間単位の平日(5日間)と週末(2日間)では食パターン、食事内容ともに大きく異なる場合が多い。このような観点で「週間栄養学」のマウスモデルを確立する。つまり週末の2日間と平日の5日間の食生活を普通食と高脂肪食で調べる。例えば2日が高脂肪食で5日が普通食、逆に5日が普通食で2日が高脂肪食の場合、7日普通食や7日畿央脂肪食と比較して摂食パターンや肥満に差が出るか否かという問いである。(2)ところで、平日と週末では食生活以外に、夜更かしや朝寝坊など睡眠パターンが異なることが知られている。実際、2012年Ronneberg達は人の研究で、週末と平日の睡眠時間の midpoint (入眠時刻と起床時刻の midpoint をとる)の差が大きい(平日と週末で入眠・起床時刻が大きく異なるため)と肥満になりやすいことを *Social jet-lag and Obesity* (社会的時差ボケと肥満) というタイトルで *Current Biology* に発表した。つまり一週間単位のリズムの重要性を指摘している。

一方で、食餌のタイミングが体内時計の位相を変えることを、インビボイメージングにより時計遺伝子発現レベルで見出すことに成功した。人では、週末はランチで朝食を遅く取ったり、あるいは抜いたりし、平日の食事パターンとかなり違う可能性があるが、このような時、果たして末梢臓器の体内時計はどのようになっているのであろうか。同一マウスで週末と平日の *Per2* 発現リズムの位相、振幅、発現量で評価する。

2. 研究の目的

(1) マウスを用いて1週間単位の種々の現

象を調べ、肥満やメタボリックシンドロームの発症や予防に焦点を当てた研究を展開する。一つ目は週末と平日の高脂肪食摂取パターンの違いが、肥満に対してどのように影響するかにつき明らかにする。

(2) 二つ目は先に述べた社会的時差ボケに関する研究である。ヒトの場合、平日では少し遅く就寝し、早朝に起床するため短時間睡眠になる。また週末になると夜更かし、昼前に起床するなど長時間睡眠になりやすい。そこで、マウスの明暗飼育環境(12時間明期:12時間暗期、LD)の明期開始時刻を土、日の2日間3-6時間後退させ、夜間の前半に光が当たり体内時計を夜型化させる。月曜日に3-6時間の明暗の開始の遅れを正常に戻し、社会的時差ボケマウスモデルを作り、このモデルの特徴を明らかにする。このモデルマウスの、視交叉上核、末梢臓器の時計遺伝子発現リズム、活動リズム、エネルギー代謝リズムを、週末明けの月・火曜日と、週末の木・金曜日でこれらのリズムのプロファイルが異なるか否かに焦点を当て、社会的時差ボケのリズムの観点からの特徴を明らかにする。このことが、社会的時差ボケの予防方法や緩和方法の発見につながるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 週間栄養学に関する実験。雄のICRマウスを用いて実験を行った。1週間7日間すべて45%の高脂肪食を与える群(1)、普通食を与える群(2)、5日間は高脂肪食で2日間は普通食を与える群(3)、2日間は高脂肪食で5日間は普通食を与える群(4)の4群を用意した。この状態で4-5週間飼育し、餌を切り替えるときに体重と摂取量を測定した。

(2) 社会的時差ボケマウスの実験。マウスの飼育の明暗比を一時的に変えることは一時的に体内時計を遅らせたり進めたりすることである。ヒトの場合、平日は就寝時間が遅いにも関わらず例えば6時と早く起きる必要がある、明期が伸びた状態にある。一方、週末は例えば10時と遅く起きる場合が多く明期が短い、あるいは明暗が後ろに伸びた状態になる。このように平日と週末で体内時計の時間と実時間(生活時間)のずれが起こる。この差が大きいと社会的時差ボケといわれる状態になる。

一般的には雄のICRマウスを用いるが、体内時計の時計遺伝子発現を経時的にモニターする場合は、*Per2::Luciferase* のマウスを使用する。このマウスは *Per2* タンパク質と *Luciferase* タンパク質の融合タンパク質が作られるため、*Per2* 遺伝子発現を生物発光リズムとしてモニターすることができる。動物は明期12時間、暗期12時間の明暗環境で飼育しているが、土・日曜日に明期の開始を3-6

時間遅らせ暗期も 3-6 時間遅らせた。その後、月曜日には 3-6 時間の明暗の遅れを正常の明暗に戻した。餌は、AIN-93M を標準飼料として与えた。また、社会的時差ボケが肥満の一要因であることが知られているので、45%脂質が入った高脂肪食を与える実験も行った。マウスの行動リズムは視交叉上核の時計の支配下になっているので、赤外線センサーで調べる行動リズムの位相が社会的時差ボケ状態でどのように変化するかについて調べた。

社会的時差ボケによる肥満の一要因としてエネルギー代謝のリズムが異常になる可能性が考えられる。そこで、メタボリックチャンパーを用いて、呼吸商とエネルギー消費のリズムを測定した。リズム性の指標は基本的には正常状態と、明暗環境シフトを行い戻した月・火曜日と、週末の木・金曜日に記録し、社会的時差ボケが起こっているようであれば、月・火と、木・金の振る舞いが異なる可能性が見られる。

(3) ヒトのリズム測定実験。ヒトでは、4 時間おきに 1 日 6 回、1 回につき 5-10 本の髭を抜き、毛母細胞から mRNA を抽出し、*Per3*, *Rev-erba*, *Rev-erbb* の遺伝子発現リズムを調べた。遺伝子発現リズムをコサイナー法で処理し、振幅と位相を算出した。被験者は、朝型の人と、夜型社会的時差ボケがある人を対象とした。朝型と異なり、夜型で社会的時差ボケがある人は月曜日と金曜日ではリズムの形や位相が異なると予想されるので、週の中で 2 回測定した。

4. 研究成果

(1) 1 週間中の平日と休日の餌の食べ方の肥満に対する作用の実験。週末 2 日間と平日 5 日間で高脂肪食の摂取の仕方が摂食量・肥満に及ぼす作用を調べた。1 週間 7 日間すべて高脂肪食を与える群(1)、普通食を与える群(2)、5 日間は高脂肪食で 2 日間は普通食を与える群(3)、2 日間は高脂肪食で 5 日間は普通食を与える群(4)の 4 群を用意した。この状態で 4-5 週間飼育し、餌を切り替えるときに体重を測定した。その結果、(1)、(3)、(4)、(2)の順番に体重が重かった。特に(1)と(3)の差は小さく、また(4)と(2)の差も小さかった。また面白いことに、(3)のグループは、高脂肪食提示の 5 日間は体重が急速に増大し、普通食提示の 2 日間は体重増加が止まった。すなわち、マウスは 5 日、2 日の提示間隔を学習することができ、高脂肪食の提示期間は摂食量が増大し、普通食の提示期間は摂食量が極端に低下した。このように、マウスでも後天的に 1 週間のスケジュールを学習することが判明した。

(2) マウスを用いた社会的時差ボケの実験。マウスの飼育室の明暗比を一時的に変えるこ

とは一時的に体内時計を遅らせたり進めたりすることである。ヒトの場合、平日は就寝時間が遅いにも関わらず例えば 6 時と早く起きる必要があり、明期が伸びた状態にある。一方、週末は例えば 10 時と遅く起きる場合が多く明期が短い、あるいは明暗が後ろに伸びた状態になる。このように平日と週末で体内時計の時間と実時間(生活時間)のずれが起こる。この差が大きいと社会的時差ボケといわれる状態になる。週末の 2 日間のみ、3 時間あるいは 6 時間明暗環境を遅らせ、それが戻っているとされる金曜日にマウスの代謝リズムや末梢時計のリズムを調べると、2-3 時間後退したままであった(図 1)。

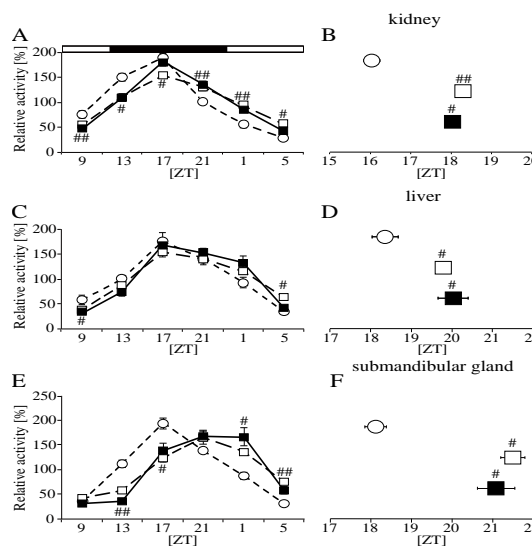


図1 IVISによる末梢臓器体内時計の位相に対する社会的時差ボケの影響
A,C,E, *Per2*遺伝子発現の日内リズム。白丸破線がコントロール群。
白四角が時差ボケ後月曜日の記録、黒四角が時差ボケ後木曜日の記録。
木曜日でも時計の位相が遅れたままである。有意差はコントロール群との間
ZT0は飼育室の点灯時刻、ZT12は消灯時刻をあらわす。

すなわち、明暗を再び 3-6 時間戻しても体内時計は週末の後退を十分には解消できないことがわかった。また週末の後退を早く解消させるべく、月曜から金曜まで、暗期の最初から 6 時間覚醒をさせて、末梢時計の位相を調べたところ、遅れたままで解消できなかった。すなわち、社会的時差ボケは強制的覚醒では解消せず、食事や運動の提供が効果的である可能性は残った。

(3) ヒトを対象とした実験。これらのマウスの研究成果をヒトの研究に応用可能か否かを検討した。髭を 4 時間おきに抜き、毛母細胞から mRNA を抽出し、時間軸に対して *Per3*, *Rev-erba*, *Rev-erbb* の遺伝子発現をプロットすると、夜中から明け方をピークとするリズムが観察された。そこで、被験者を夜型で社会的時差ボケが激しい人と、朝型で社会的時差ボケが少ない人と、リズム性を観察した。社会的時差ボケの人は月曜日と金曜日では、発現リズムのプロファイルが異なるが、朝型

の人は、月曜日でも金曜日でも類似したプロファイルを示した(図2)。すなわち、社会的時差ボケ状態では、1週間の中で体内時計が変動していることが分かり、このことが肥満など代謝異常を引き起こすことにつながるものと考えられる。

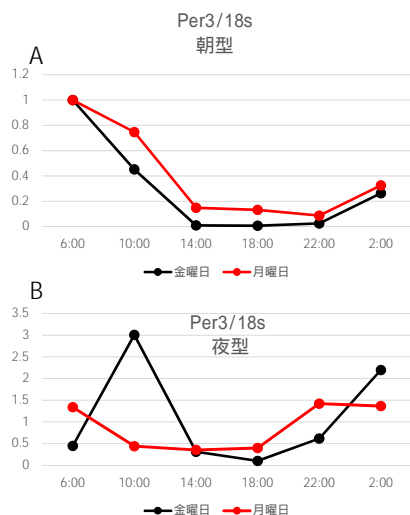


図2 ヒトの罷からのPer3遺伝子発現リズムに対する朝型・夜型の影響
Aは朝型のヒトで、Bは夜型で社会的時差ボケがあるヒトである。
夜型の方は、月曜日と金曜日では、遺伝子発現プロファイルが大きく異なる

(4) 今後の研究の進め方。今後の研究方針としてはまず、社会的時差ボケを軽減させる方法の開発をあげることができる。この時差ボケは土日に明期が延長し、体内時計が遅れることが原因である。そこで、光入力を断ち切るために、光情報を担う伝達物質であるグルタミン酸の拮抗薬、MK801 やテアニンを投与し、防ぐことが可能か否かを調べる。一方で、遅れを戻す力が弱いいため、金曜日になっても時計が遅れたままである。そこで、月から金までをマウスの起床に合わせてカフェインを投与する。我々の最近の研究ではカフェインが体内時計の位相を変えることを報告しているので、この効果を利用し、位相前進を促進させることができるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Takahashi M, Haraguchi A, Tahara Y, Aoki N, Fukazawa M, Tanisawa K, Ito T, Nakaoka T, Higuchi M, Shibata S. Positive association between physical activity and PER3 expression in older adults. *Sci Rep*. 7:39771, 2017. doi: 10.1038/srep39771. 査読あり

Aoyama S, Shibata S. The Role of Circadian Rhythms in Muscular and Osseous Physiology

and Their Regulation by Nutrition and Exercise. *Front Neurosci*. 11:63., 2017. doi: 10.3389/fnins.2017.00063. 査読あり

Hamaguchi Y, Tahara Y, Hitosugi M, Shibata S. Impairment of Circadian Rhythms in Peripheral Clocks by Constant Light Is Partially Reversed by Scheduled Feeding or Exercise. *J Biol Rhythms*. 30(6):533-42. 2015. doi: 10.1177/0748730415609727. 査読あり

Hamaguchi Y, Tahara Y, Kuroda H, Haraguchi A, Shibata S. Entrainment of mouse peripheral circadian clocks to ≈ 24 h feeding/fasting cycles under 24 h light/dark conditions. *Sci Rep*. 5:14207. 2015 doi: 10.1038/srep14207. 査読あり

Tahara Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Haraguchi A, Kuriki D, Sasaki H, Motohashi H, Sakai T, Shibata S. Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. *Sci Rep*. 5:11417. 2015 doi: 10.1038/srep11417. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

柴田重信 [Associations between BMI and breakfast-dinner volume ratio and/or sleep-related factors in 1200 peoples by questionnaire through internet collection],第 23 回日本時間生物学会学術大会、名古屋大学、豊田講堂、愛知県 名古屋市 2016 年 11 月 12-13 日

柴田重信 「時間栄養学と時間栄養学による健康維持」第 32 回西宮市ライフサイエンスセミナー、西宮市フレンテホール、兵庫県 西宮市 2016 年 11 月 11 日

Shigenobu Shibata, 「Phase Shifts in Circadian Peripheral Clocks Caused by Exercise Are Dependent on the Feeding Schedule in PER2 LUC Mice , SOCIETY FOR RESEARCH ON BIOLOGICAL RHYTHMS May21-25 , Palm Harbor , FL, アメリカ合衆国 2016

柴田重信 「末梢臓器の時間栄養学研究」, 第 93 回日本生理学会大会、札幌コンベンションセンター、北海道 札幌市 2016 年 3 月 23 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.waseda-shibatas.com/>

6．研究組織

(1)研究代表者

柴田重信 (SHIBATA Shigenobu)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：10162629

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者