

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 6 月 1 2 日現在

機関番号：3 2 6 2 5

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 6 5 0 4 9 0

研究課題名（和文） 時間栄養学による記憶学習能力の解析と認知症対策への基礎的研究

研究課題名（英文） Analysis of the ability for memory-learning from a stand point of nutrhythm and its basic research for prevention of senile dementia

研究代表者

堀江 修一（HORIE SHUICHI）

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号：6 0 1 5 7 0 6 3

研究成果の概要（和文）：時計遺伝子変異クロックマウスと野生型マウスに高脂肪食を与えて、電流刺激回避試験と水迷路試験により記憶学習能力を解析した。その結果、1）マウスの記憶学習能力に系統差があること、2）餌の組成の違いで行動リズムに差が生じること、3）クロックマウスは特に高脂肪食摂取時の記憶学習能力の低下が著しいこと、4）高脂肪食の摂取時の能力低下は雌が顕著であること、がわかり、高脂肪食摂取が時計遺伝子の発現異常を介して、記憶学習能力に影響することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We examined the effect of a high-fat (HF) diet on learning and memory functions in clock-mutant mice (*clock*) comparing its wild mice (wild) by measuring passive avoidance test (PAT) and by using Morris Water Maze apparatus. In the results, not only *clock* mice fed on the control diet, but also wild female mice fed on the HF diet were impaired the retention for PAT. It became obvious that female mice, with respect to memory retention, are more susceptible to HF diet and that entrainment of the peripheral circadian rhythm is essential for maintenance of learning and memory functions in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食行動、認知症、記憶学習能力、高脂肪食、時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はこれまでマウスの行動に影響する摂食時刻と食組成に関する実験を行い、脳と全身の細胞が同調するような時間帯に食事を摂取することの重要性を認識してきた。すなわち、マウスの行動様式は人という食生活様式により大きな影響を受けることを提示してきた。従って、脳細胞内の時計の機能に異常が生じれば、記憶学習能力が低下

することは十分にあり得ると考えていた。しかし、関連する研究において、疾患に対する食成分の効果についての報告、例えば認知症に対する葉酸を中心としたビタミン類の予防や抑制効果に関する報告は数多く存在していたが、概日リズムの視点から検討した研究はほとんどなく、*clock* マウスの記憶学習能力に関する報告はなかった。

(2) 一方、本研究で利用する高脂肪食との関

連では、牛脂食や豚脂食を摂取すると行動に変化が現れることや概日リズムが後退すること、ケトン体食（低炭水化物食）で時計遺伝子発現の位相が前進することなどが報告されていた。しかし、これらはいずれも記憶学習能力との関連性から調べられた研究ではなかった。神経生理学的解析では、2010年に肥満者の海馬において神経栄養成長因子（BDNF）の産生が減少すると報告されたが、まだ現象論だけで時間栄養学を意識した分子レベルからの解明は行われていなかった。(3) すなわち、研究開始当初において記憶学習能力には食事の摂取時間や組成、また時計遺伝子が関与する可能性について検討している研究はなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究は時間栄養学的な視点から時計遺伝子と記憶学習能力との関係について明らかにするために計画され、食を通して認知症の発症を予防すること、そしてその病態の改善に貢献することを目的とした基礎研究である。

(2) 食成分として脂質、特に脂肪酸組成に焦点を当て、他の栄養素とのバランスや摂取時刻、カロリー配分を考えながら、脳の転写因子の発現変動により引き起こされる神経系の栄養や成長に関わる因子への影響と記憶学習能力との関係について解明する。

(3) 概日リズムの中心的存在である時計遺伝子クロックが変異したマウスを利用して、時計遺伝子の機能異常を食事により制御するための時間栄養学的解析結果を提示し、予防に繋がる栄養素摂取法の方策を含めて高齢化社会を意識した研究を推進する。

3. 研究の方法

マウスに種々組成の飼料（脂肪酸組成の異なる高脂肪食、高カロリー食、高炭水化物食）を摂取させ、また制限給餌（たとえば、人の夜間にあたる時間帯に高脂肪食を与えるなど）の条件下に、明暗時間を調整しながら短期と長期の飼育を行った。この間、一部のマウスについては行動時間をモニターして活動リズムを記録した。同時に、体重の変化や血液中の生化学検査項目の測定、ホルモンやアディポサイトカイン、栄養成長因子と血液凝固関連因子を測定した。記憶学習試験として汎用される電気刺激回避試験（パッシブアボイダンス）は簡便な実験方法であり、しかも得られたデータに対する信頼性も高いが、さらに結果について確認するために同じ個体に対して水迷路試験も行うことにした。

(1) 記憶学習能力の測定実験（能力検定法、マウスの系統、餌の組成、制限給餌の実験）

clock マウスと *wild* マウスを用いて、両者の記憶学習能力について2種類の試験（刺激回避試験と水迷路試験）で解析した。野生型マウスとしては C3H 系と ICR 系の2系統を利用した。

種々組成の餌（高脂肪食、特に脂質の含量比の違い、脂肪酸組成の違い、糖の配分比を代えることにより生じるエネルギー代謝の変動を意識した組成、および特定の組成を除去したもの）をマウスに制限給餌器を用いて特定の時刻に与えてから記憶学習試験を行い、そのときのデータを行動リズムとの関連性から解析した。脂質は粉末試料の調製が可能なもの（AIN93G 基本食への添加）で、コレステロールの有無や脂肪酸として不飽和結合に違いのある動物性オイルと植物オイル、ココナッツオイルや部分水素添加油のショートニング（トランス脂肪酸含有量の含有量も検討課題）などを候補とした。

餌を与える時間帯を主として夜間と昼間に設定した制限給餌の条件下において、マウスの記憶学習試験を行った。

(2) 記憶学習能力と遺伝子発現との関連性の実験（マイクロアレイ解析、遺伝子解析）

記憶学習能力の違いが認められたマウス間の遺伝子発現の違いについて、特に脳組織を試料にして、マイクロアレイ解析をする予定であったが、申請額から減額されたことから、リアルタイム PCR とコンベンショナルの PCR を行って mRNA 発現を調べた。

記憶学習能力の加齢に伴う変動の実験を行うために、高齢化マウスや長期間に渡って特定の餌を摂取したマウスを作製した。すなわち、早期から ICR マウスと C3H マウスを購入して飼育し、加齢に伴う実験の準備を進めた。

(3) 脳と肝臓における時計遺伝子と核内受容体の総合作用の解析実験（*in vivo* 実験）

得られた上記の解析結果を基に、個々の条件下における標的遺伝子の変動と時計遺伝子や転写因子との関連性について、各条件下で飼育したマウスの組織を用いて調べた。特に、概日リズムに関連するタンパク質とニューロトロフィン系（NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5）やその受容体（TrkA、TrkB、TrkC、p75NTR）の遺伝子発現の測定条件を検討して解析を行った。

食欲と関連性の深いオレキシン及びその受容体を含む関連遺伝子の発現について PCR による定量解析を行った。

(4) 記憶学習能力の改善効果の検討（食組成、食時刻、運動、性差、加齢、病態、ストレス負荷の実験）

野菜やキノコ類を中心に抗酸化性の食材をマウスに投与し、制限給餌条件下において、また回転かご装置を用いた運動負荷後において、記憶学習能力への改善効果を調べた。

マウスの性差と加齢を意識しつつ、記憶学習能力に及ぼす高脂肪食の影響を検討した。

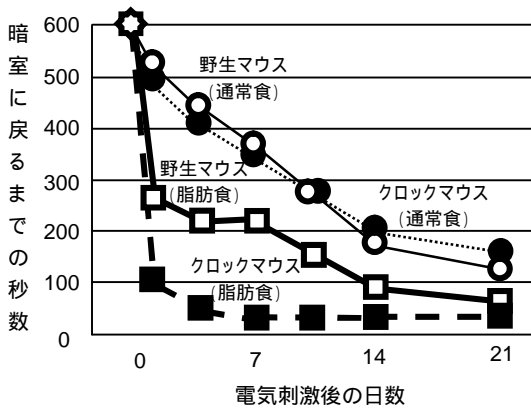
通常の夜間摂食条件に加えて、昼間摂食した場合の影響について、電気刺激回避試験と水迷路試験により解析した。

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度

マウスの記憶学習能力を測定するための装置（電流刺激回避測定装置と水迷路装置）の測定条件について検討し、それぞれの測定系を確立した。

牛脂に富んだ高脂肪食を *clock* マウスと *wild* マウスに与えて、経時的に電流刺激回避試験と水迷路試験により記憶学習能力の違いについて解析した結果、C3H 系と ICR 系の 2 系統でその能力に違いのあること、また餌の組成の違いによって行動リズムに差が生じることが判明した。また、時計遺伝子クロックが変異した *clock* マウスでは、普通食では同能力の低下傾向が認められただけだったが、高脂肪食の摂取により顕著に低下した。同様に、野生型マウスでも脂肪食の摂取により記憶学習能力が著しく低下することが判明した。このように、記憶学習能力は食生活や概日リズムとの関連性が大きいものであるという結果が得られた。

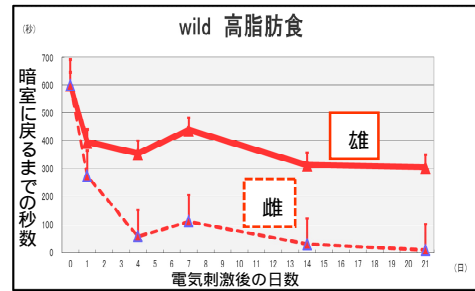


餌を与える時間帯を変化させた制限給餌の環境下において、マウスの記憶学習を比較した結果、特に大きな違いが認められたのは固体差によるものだった。

高脂肪食を 4 週間まで摂取したマウスの脳や肝臓における関連遺伝子の発現変化について調べたところ、グルタミン酸受容体遺伝子の発現が記憶能力と関連する可能性が示唆された。

(2) 平成 24 年度

前年度に検討したマウスの記憶学習能力を調べる最適条件下で、電流刺激回避測定装置を用いて実験した結果、牛脂に富んだ高脂肪食を摂取したマウスの能力に性差が存在すること、特に雌マウスにおける記憶学習能力の低下が顕著であることが判明した。この性差による違いは水迷路装置を用いて行った空間認識記憶実験においても認められたが、電流刺激回避測定の結果と比較すると違いは小さかった。



各組織において関連遺伝子の相互作用への影響を解析するために、それぞれの飼育条件下にあるマウスから血液と脳、肝臓を採取し、脂質代謝系遺伝子と時計遺伝子や転写因子の発現変動について比較した結果、肝臓中の *clock* や *per2* で検討した時計遺伝子の発現リズムは、共に高脂肪食摂取後に移相のずれが認められた。このとき性差による有意な差は認められなかった。

脳におけるニューロトロフィンやその受容体の遺伝子、グルタミン酸受容体関連遺伝子の発現では、NGFB や BDNF、NTF に大きな変化はなく、NMDA-2A と KIF17-1 の発現に食組成と性差による違いがみられた。また、本来の餌摂取時刻ではない明期（マウスの休息期）にのみ餌を与えたところ、高脂肪食摂取群で KIF17-1 発現が増加していた。

長期に渡って高脂肪食摂取させたマウスを用いて、加齢による記憶学習能力への影響を調べた結果、普通食摂取マウスと比較して高脂肪食をほぼ 1 年間自由に摂食させ続けた C3H 系マウスにおいて明らかに記憶学習能力が低下していた。

野菜を中心とする抗酸化活性を有する食材をマウスに与えて調べる実験では少なくとも 4 週間程度の摂食期間では明らかな効果を認めなかった。

本研究を通して、人の認知症への応用が可能と考えられる食生活のあり方に関する基礎的なデータが得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) 堀江修一、時間栄養学(栄養学と時間生物学のコラボレーション)、日本栄養士会雑誌、査読無、54(4)、2011、32-35

(2) 堀江修一、時間栄養学(食事で体内時計を制御する1:肥満症の時間栄養学)、日本栄養士会雑誌、査読無、54(5)、2011、33-36

(3) 堀江修一、時間栄養学(食事で体内時計を制御する2:血栓症の時間栄養学)、日本栄養士会雑誌、査読無、54(6)、2011、36-39

〔学会発表〕(計8件)

(1) 中村紗佑里、堀江修一、平石さゆりら、高脂肪食摂取マウスにおける血栓症関連因子の変動と運動負荷による影響、第35回日本血栓止血学会2013年6月1日、山形

(2) 中村紗佑里、堀江修一、平石さゆりら、脂質食組成の差異に基づくマウスの脂質代謝の変動と血栓関連因子への影響、第133回日本薬学会、2013年3月29日、神奈川

(3) 堀江修一、時間栄養学からみた食と睡眠、第90回(公社)日本栄養・食糧学会関東支部大会(シンポジウム)、2012年10月13日、埼玉

(4) 堀江修一、Relation between a high-fat diet or the scheduled feeding and lung metastasis of melanoma B16BL6 in the mice、第71回がん学会、2012年9月21日、北海道

(5) 堀江修一、平石さゆり、平岡真実ら、時間栄養学からみたマウスにおける抗血栓機能の変動、第13回Pharmacology-Hematology シンポジウム、2012年6月15日、東京

(6) Shuichi HORIE et. al、Nutrhythm-dependent evaluation of high-fat diet on learning and memory in mice、International Behavioral Neuroscience Society 21st Annual Meeting、6 June 2012、Hawaii、USA

(7) 堀江修一、平石さゆり、平岡真実ら、マウス食餌中の脂肪酸組成の差異が血管内皮細胞の抗血栓性機能に及ぼす影響、第84回日本生化学会、2011年9月23日、京都

(8) Shuichi HORIE et.al、Augmentation of circadian PAI-1 expression in a ketogenic diet-fed PPAR α -null mice: the possible involvement of PPAR α activation in the

induction、XX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis、25 July 2011、Kyoto、Japan

〔図書〕(計1件)

堀江修一、医学書院、栄養ケアと薬物療法、新臨床栄養学 栄養ケアマネジメント 2011、9 (100-108)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.eiyo.ac.jp/teachers/teacher.php?teacher_id=15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 修一 (HORIE SHUICHI)
女子栄養大学・栄養学部・教授
研究者番号: 60157063

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

福島 真実 (FUKUSHIMA MAMI)
女子栄養大学・栄養学部・助教
研究者番号: 30286885
平石 さゆり (HIRAISHI SAYURI)
女子栄養大学・栄養科学研究所・助教
研究者番号: 20150659
香川 靖雄 (KAGAWA YASUO)
女子栄養大学・栄養学部・教授
研究者番号: 30048962