

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25年 5 月 27 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659126

研究課題名（和文） マウスを用いた時間運動学の確立

研究課題名（英文） Establishment of chrono-exercise on mouse experiment

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

研究成果の概要（和文）：体内時計は末梢臓器に広く機能しており、それぞれの臓器特異的な役割を演じている。以前の報告では、食事を行うタイミングが肥満形成に重要で、夕食にウェイトを置いた食事が肥満にないやすいことが分かった。運動では夕方の運動が朝の運動より肥満予防・改善効果が強く、エネルギー代謝を調べると脂肪燃焼が弱いことが分かった。また、給餌との関係では、運動して餌を取る場合と餌を取って運動する場合では、後者は肥満予防効果がみられた。

研究成果の概要（英文）：It is well known that circadian clock system operates in whole body including peripheral organs. Previously we found bigger supper caused obesity in comparison with bigger breakfast in mice, suggesting that timing of food is important. Here we examined the timing of exercise as wheel-running on obesity and energy metabolism in mice. Exercise in the evening rather than in the morning protects the obesity and increases lipid metabolism. Feeding followed with exercise caused anti-obesity effect than exercise followed with feeding. These results suggest the importance of timing of exercise on obesity.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：体内時計、運動、時間栄養学、肥満、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

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。時計遺伝子の発見で分かったことは、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である。また、視交叉上核以外の末梢時計機構は給餌リズムに同調し、特に朝食・夕食では、朝食に同調しやすいことが分かった。夜食は太るという言葉があるように、1日の総餌量を一定にし、

朝・夕に分割摂餌させた場合、朝食を主体とした食事パターンは太りにくかった。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。ところで運動も同じような考えの基に、「時間運動学」を提唱することとした。すなわち（1）末梢時計機構、特に骨格筋などは規則的な運動習慣（ほぼ同じ時間帯に運動すること）でリセットする可能性を調べる。（2）メタボリックシンドロームの予防や治療に運動が良いことは周知の事実であり、ウォーキング等が勧められている。しかしながら、運動の時間帯に関する基礎的研究は行われていず、肥満予防・体内時計同調の観点からの適切な

時間帯の提案はない。マウスで肥満予防に適切な運動の種類と時間帯を見つけ、最終的には臨床応用に生かす。

2. 研究の目的

肥満・糖尿病治療に運動は欠かせなく、運動の種類や強度を調べる研究は多数あるが、運動する時間（時刻）に関する研究は少ない。運動療法は骨格筋、肝臓、膵臓、脂肪組織を対象としているが、これらの臓器の時計遺伝子が末梢時計として機能している。また、時計遺伝子の変異やシフトワークなどは肥満・糖尿病のリスク要因になっている。本研究は、運動を行う時刻依存的に、時計遺伝子の支配下にあるエネルギー代謝関連遺伝子の働きが影響を受けることを発見し、効果的な運動処方を見いだすことを目的としている。また、運動そのものが、朝の光と同様に体内時計をリセットさせ、生活リズムの形成に寄与することも明らかにする。これらの研究から、運動と体内時計の関係、すなわち「時間運動学」が構築され、実社会に応用されることを期待する。

3. 研究の方法

(1) ICR マウスを用い、肥満形成の実験では40%脂肪の高脂肪食を用いる。輪回しを行える時刻を制限する装置を作製した。また、餌も任意の時間に自動的に与えることができる装置を作製した。運動を1日4時間に制限し、朝運動、夕運動の2群を作成した。また餌を朝に与える群と夕方を与える群、あるいは自由摂食できる群を用意した、4週間、いろいろな実験条件で飼育し、体重と摂食量の変化を記録した。また、4週間後には代謝測定装置にマウスを入れ、代謝活動のリズムを記録した。その後、安楽死させ、脂肪量を測定し、遺伝子発現測定用に、肝臓、脂肪、筋肉の一部を冷凍保存した。

(2) 運動が末梢臓器の体内時計をリセットさせる可能性を調べるために、ICRをバックグラウンドであるPer2::LUCIFERASEのノックインマウスを用意した。このマウスは、Ex-vivoの実験系で、末梢臓器の時計遺伝子発現をモニターできることが知られている。また、In-vivoでモニターするIVISシステムの開発にも成功した。そこで、これらの手法を用いて、朝や夕運動が、体内時計をリセットさせる可能性について調べた。朝運動もしくは夕運動を2週間行わせ、その後、Ex-vivoで観察した。IVIS系は、時間が間に合わず、今回は実行できなかった。

4. 研究成果

(1) 朝運動、夕運動が体重増加に及ぼす作

用を調べた。その結果、夕運動群は、有意に肥満防止を示した。また、朝運動群は、全日運動群と同じような体重曲線を示し、非運動群より僅かに体重増加が抑えられただけであった(図1)。

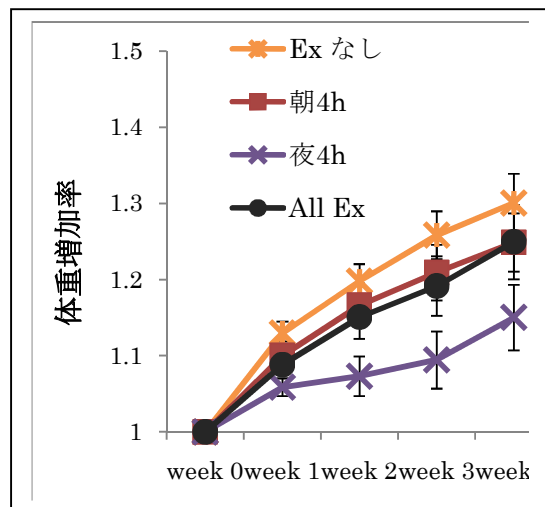


図1 朝運動と夕運動の体重増加に対する作用

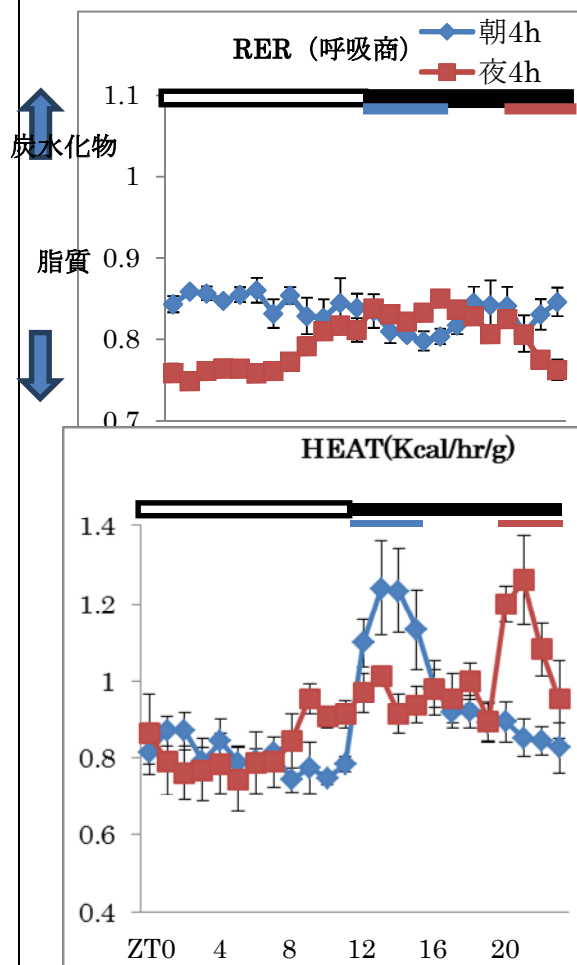


図2 朝運動と夕運動の呼吸商およびエネルギー消費のリズムに対する作用

(2) 朝運動、夕運動がエネルギー代謝リズムに及ぼす作用を調べた。その結果、夕運動群は、夜間に呼吸商を低下させ、1日あたりで観察しても、夕運動は朝運動に比較して有意に呼吸商が低かった。つまり、夕運動は脂肪燃焼作用が強いことが分かった。一方、消費エネルギーを調べると、夕運動と朝運動に有意な差は認められなかった(図2)。

(3) 摂食量を一定にするために、1日あたり3.5gの高脂肪食を以下の5群に与えた。朝摂餌(ZT12F-NoEx)、夕摂餌(ZT24F-NoEx)、朝摂餌後に夕方運動(ZT12F-Ex)、夕方運動と同時に摂餌(ZT20F-Ex)、夕方運動後に摂餌(ZT24F-Ex)。これらの群を比較すると、運動なしで朝もしくは夕に摂餌する群が体重増加が著しかった。また、この場合朝摂餌と夕摂餌に差は見られなかった。朝摂餌後に運動もしくは、摂餌と運動を同時に行った群は、運動後に摂餌した群に比較して、体重増加が抑えられた(図3)。したがって、夕運動が朝運動に比較して、体重増加が抑制されるのは、運動後に摂餌しないことが重要であることが分かった。

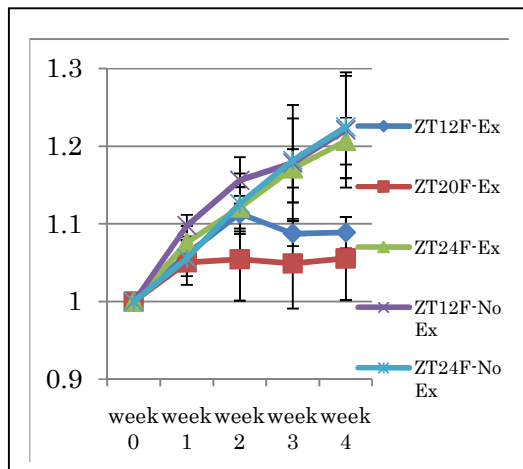


図3 各種食餌と運動条件による体重変化(高脂肪食負荷前を1とする)

(4) 高脂肪食により肥満になるが、夕方運動、もしくは摂餌後の運動で、肥満形成を予防できることが明らかとなった。一方、肥満・糖尿病に運動療法が効果的であることはわかっているので、今度は、肥満マウスに対する、朝運動、夕運動の効果について調べた。まず、高脂肪食で、平均55gに肥満させたマウスに輪回し運動を行わせた。その結果、肥満形成の実験と同様に、夕運動は、朝運動に比較して、肥満状態を改善する傾向がみられた。また、白色組織の大きさも、夕運動で小さくなる傾向がみられた。以上の研究から、

夕運動は、肥満防止また肥満治療の両方に有効な手段であると考えられた。

(5) 規則的な運動習慣が末梢臓器の体内時計をリセットするか否かについて調べた。Per2::LUCIFERASEノックインマウスを、朝運動もしくは夕運動させ、その後、肝臓切片を作製し、Lumicycleという装置を用いて、3日間の遺伝子発現のリズム変動を調べた(表1)。その結果、体内時計の位相、周期のいずれも運動の効果は認められなかった。つまり、運動は抗肥満効果を示すが、これは体内時計に影響を及ぼした結果ではないことが分かった。

	peak1	p1-p2
cont(n=3)	17.13885	20.625
ZT12 WR(n=4)	16.77989	20
ZT0 WR(n=3)	17.68333	19.58333

表1 朝運動(ZT12)もしくは夕運動(ZT0)の肝臓時計遺伝子発現リズムに対する作用 Peak1は、位相を表し、p1-p2は周期を表す。cont群は運動を負荷しない群。3者間に全く差は認められない。

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15件)

(1) Kuroda H, Tahara Y, Saito K, Ohnishi N, Kubo Y, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Hirao A, Shibata S. Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks. *Scientific Reports*. 2:711, Oct 5, 2012 査読あり <http://www.nature.com/srep/index.html>

(2) Takita E, Yokota S, Tahara Y, Hirao A, Aoki N, Nakamura Y, Nakao A, Shibata S. Biological clock dysfunction exacerbates contact hypersensitivity in mice. *Br J Dermatol*. Jul 27, 2012 査読あり 10.1111/(ISSN)1365-2133

(3) Fuse Y, Hirao A, Kuroda H, Otsuka M, Tahara Y, Shibata S. Differential roles of breakfast only (one meal per day) and a bigger breakfast with a small dinner (two meals per day) in mice fed a high-fat diet with regard to induced obesity and lipid metabolism. *J Circadian Rhythms*. 10(1):4, 2012 査読あり <http://www.jcircadianrhythms.com/>

(4) Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Shibata S. In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in

the mouse. *Current Biology*, 22:1029-34, 2012 査読あり

<http://www.cell.com/current-biology/>

(5)Uchida Y, Osaki T, Yamasaki T, Shimomura T, Hata S, Horikawa K, Shibata S, Todo T, Hirayama J, Nishina H. Involvement of the stress kinase mitogen-activated protein kinase kinase 7 in the regulation of the mammalian circadian clock. *J Biol Chem*. 287(11):8318-26, 2012 査読あり

<http://www.jbc.org/>

(6)Hirao A, Furutani N, Nagahama H, Itokawa M, *Shibata S. The Protective and Recovery Effects of Fish Oil Supplementation on Cedar Pollen-Induced Allergic Reactions in Mice. *Food Nutrition and Sciences*, 3(1):40-47, 2012 査読あり

<http://www.scirp.org/journal/fns/>

(7)Kubo Y, Tahara Y, Hirao A, *Shibata S. 2,2,2-Tribromoethanol phase-shifts the circadian rhythm of the liver clock in Per2::Luciferase knockin mice: lack of dependence on anesthetic activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 340(3):698-705, 2012 査読あり

<http://jpet.aspetjournals.org/>

(8)柴田重信、青木菜摘、「時間栄養学」、G. I. Research vol.20 no.5、先端医学社、2012年 査読なし

ISSN: 0918-9408

(9)柴田重信、用語解説「時間栄養学」、栄養一評価と治療—Vol.29 No.3/2012.8、(株)メディカルレビュー社、2012年 査読なし

ISSN: 0915-759X

(10)平尾彰子、柴田重信、「体内時計を用いた理想的な食生活作りのために」、顕微鏡 第47巻 第2号 83-86、2012年 査読なし

<http://www.microscopy.or.jp/magazine/microscopy.html>

(11)柴田重信、暮らしの最前線 90「時間栄養学の現状とこれから」、日本家政学会誌 第63巻 第6号 337-341、2012年 査読あり
ISSN: 1882-0352

(12)柴田重信、時間栄養学、化学と生物、日本農芸化学会誌、2012年 査読あり
0453-073X / 0002-1407

(13)柴田重信、生体リズムと創薬、日本臨床薬

理学会誌、2012年 査読なし

ISSN: 1882-8272

(14)柴田重信、概日リズムと肥満・生活習慣病、「体内時計と栄養・食事の相互作用」、日本肥満学会誌、2012年 査読なし

<http://www.jasso.or.jp/contents/magazine/index.html>

(15)柴田重信、時計遺伝子と食事リズム—時間栄養学—、日本臨床栄養学会誌、2012年 査読なし

<http://www.jscn.gr.jp/activities/gakkaishi/index.html>

[学会発表] (計8件)

(1)柴田重信、「マウス体内時計遺伝子をリセットする食餌内容の研究」、(財)飯島記念食品科学振興財団 第25回学術講演会、東京(学士会館)、11月22日、2012年 oral

(2)柴田重信、「時間薬理学・時間栄養学の視点の生活習慣病」、平成24年度メタボリックシンドローム予防のための健康セミナー、大分(大分商工会議所)、11月10日、2012年 oral

(3)柴田重信、「時間栄養学—食の内容から食べ方まで—」、第20回日本植物油協会 植物油栄養懇話会、東京(如水会館)、11月9日、2012年 oral

(4)柴田重信、「体内時計と栄養」、第6回順天堂 Kampo 先端治療研究会、東京(順天堂大学)、11月7日、2012年 oral

(5)柴田重信、「時間栄養学～免疫・炎症から代謝障害まで～」、第5回基礎と臨床を結ぶ分子病態研究会、東京(学士会館)、10月27日、2012年 oral

(6)柴田重信、横田伸一、中村果愛、青木菜摘、「マウス絶食性脂肪肝は AChE 阻害剤により増強する」、第127回日本薬理学会関東部会、東京(東京国際フォーラム)、10月20日、2012年 oral

(7)柴田重信、『中枢神経系と肥満研究のフロンティア「時間栄養学と肥満・代謝障害」』、第33回日本肥満学会、京都(ホテルグランヴィア京都)、10月11～12日(10月12日)、2012年 oral

(8)柴田重信、「インビボとインビトロで調べた末梢時計の相違と特徴」、第 19 回日本時間生物学会学術大会、北海道（北海道大学学術交流会館）、9 月 15-16 日（9 月 15 日）、2012 年 oral

〔図書〕（計 1 件）

(1)堀川和政、柴田重信、「サーカディアンシグナリング」、イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典、羊土社、93-94、2012 年 査読なし

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