

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300278

研究課題名(和文) 体内時計を考慮した健康志向の食餌と運動処方のマウスモデル開発

研究課題名(英文) Mouse model searching for timing of combination of feeding and exercise on health science

研究代表者

柴田 重信 (Shigenobu, Shibata)

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) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：体内時計と食・栄養の関係(時間栄養学)と、体内時計と運動の関係(時間運動学)を組み合わせ、マウスの体内時計のリセット効果と、抗肥満効果について調べた。昼と夜の1日2食では体内時計の位相は自由摂餌の夜側から昼間側に引っ張られていくが、輪回し運動を同時に行うとこの作用がキャンセルされる。不規則な食餌による体内時計の乱れは運動で改善できた。食餌と運動の組み合わせでは、いずれの場合も食餌後の運動が抗肥満効果を示した。

研究成果の概要(英文)：It is known that interaction of circadian clock and feeding/nutrition as for chrono-nutrition, and of circadian clock and exercise as for chrono-exercise. Combination of chrono-nutrition and chrono-exercise could determine the phase of liver circadian clock; 2 meals (morning and evening) per day advanced the liver rhythm, but wheel running in the morning attenuated the phase advance. Exercise in the evening rather than in the morning attenuated high fat diet-induced obesity with increasing energy metabolism. Feeding/exercise caused anti-obesity effect than exercise/feeding, suggesting that combination of timing of exercise/feeding is critical for anti-obesity.

研究分野：生活科学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：体内時計 時間栄養学 時間運動学 メタボリックシンドローム 肝臓 肥満

1. 研究開始当初の背景

朝、昼、夜という時刻情報は体内時計から出力される信号で認知されていると考えられている。このような約1日を1周期とするリズムはサーカディアンリズムと呼ばれている。体内時計遺伝子Per1, Clockが発見され時計の発振機構の解明が進んだ。一連の研究からわかったことは、時計遺伝子の発現リズムは視交叉上核(主時計)に強力に発現されるのみならず、大脳皮質、海馬、線条体などの脳部位(脳時計)さらに末梢臓器の肝臓、膵臓、脂肪、骨格筋など(末梢時計)にも強く発現していることが分かった。これらの臓器はエネルギー代謝と深くかかわっていることから、体内時計と食・栄養との相互作用を調べる学問として時間栄養学が重要となってくる。実際、朝食が体内時計をリセットし、なかでもインスリンの分泌を引き起こしやすい食が効果的である。また、遅い夕食、夕食の比率が高いなどは肥満の要因になりやすいなど、時間栄養学的視点の研究が始まりつつある。同様に、体内時計と運動の関連で、時間運動学も重要になってくる。運動の習慣(毎日同じ時刻にジョギングなどを行うことを習慣づける)が中枢、末梢の体内時計をリセットできるであろうか。一方、運動効果が運動する時刻によって影響されるであろうか。人の場合夕方方の体温が高いときに運動をすると、筋肉の働きがスムーズとなり(生化学反応は一般的に温度が高いと速度が増す)スポーツでは良い成績が出るという。したがって、運動のタイミングは運動効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究課題では、輪回し運動のような自発的な運動で体内時計のリセットや抗肥満効果が得られることを期待している。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの予防、健康に食事療法・運動療法は広く勧められているのは周知の事実である。ところで治療のターゲット臓器である肝臓や脂肪の機能が時計遺伝子の働きにより時刻変動していることから、両者に有効な時間帯の組み合わせがより重要であると思われる。例えば朝食を多めに、運動は夕方に行うと肥満やインスリン抵抗性改善効果が大きい可能性があるが、実際そうであろうか。一方、朝食は体内時計のリセット効果(24.5時間の体内時計を毎日前進させ24時間に合わせること)、をもたらし、同様にほぼ同じ時刻の運動習慣も、体内時計のリセット効果をも

たらず可能性が考えられるので、朝運動と朝食を同時に行うことでより効果的であろうか。そこで、本研究目的は、健康増進に役立つ時間栄養学と時間運動学の組み合わせを明らかにする事である。

3. 研究の方法

(1)末梢体内時計の位相を調べるために、インビボイメージングを開発した。Per2::luciferaseのノックインマウスを用いて、リシフェリンを皮下投与し8-10分後に、生物発光値を測定した。この操作を4時間おきに、1日6回の計測を行い、リズムの位相、振幅とした。リズムの評価はコサイナー法で行い、振幅と goodness of fitness で、リズムの強さを評価した。インビボイメージングでは、末梢臓器は肝臓、腎臓、唾液腺でのみ生物発光リズムが観察されるので、これらの臓器のリズムを評価対象とした。(2)マウスは、12時間の明暗下で、水は自由飲水とした。40%高脂肪食を自由に摂餌できる条件や、マウスの活動期の12時間を3等分し、暗期の開始4時間を朝食群、真ん中の4時間を昼食群、暗期最後の4時間を夕食群とした。また、運動は輪回し運動とし、自由に運動できる群、また、暗期開始4時間の朝運動群、昼の4時間の昼運動群、暗期最後の4時間の夕運動群とした。また、食餌の制限と運動の制限の組み合わせは自由に設定した。高脂肪食を4週間与えながら、体重、摂餌量、運動量を計測した。その後、一部のマウスは代謝測定チャンバーに入れ、呼吸商とエネルギー消費量を測定した。最後に、安楽死させ、脂肪量、筋肉量を計測した。

4. 研究成果

(1)インビボイメージ測定法の確立
まず、インビボイメージングの妥当性について調べた。Per2::luciferaseのノックインマウスを用いて、4時間おきに、1日6回の計測を行い、リズムの位相、振幅を測定した。すなわち、麻酔薬による体温の低下、リシフェリンの血液体内動態などを調べた。その結果、肝臓、腎臓、唾液腺のPer2時計遺伝子の働きによる生物発光リズムの振動現象は、このような要因では影響を受けず、リシフェリンの生物発光リズムは体内時計の遺伝子発現を表現していることが分かった。本方法を用いて、まずは1日4食、5食、6食の分食の、位相に及ぼす影響を調べた。その結果、食事間隔を一定にし、一定量の餌を分食して与えた場合、臓

器すべての体内時計の位相は影響を受けなかった。すなわち、このような食パターンは体内時計を動かさないことが分かった。

(2) 1日3食が末梢体内時計の位相形成に及ぼす影響

ヒトの食パターンを模倣するモデルとして、1日3食を与えた。朝、昼、夕と与える群と、夕、夜中、朝と与える群を用意した。つまり、3食のうち1食を昼にとるか、あるいは夜中にとるかの違いによる影響を調べた結果、夜中にする群は、末梢臓器の時計の位相が大きく後退することがわかった。次に1日3食にし、夕食の時間のみ遅らせるプロトコルで実験を行った。これは、ヒトの食生活で夕食が遅くなるモデルである。その結果、夕食を午後7時から、午後10時や11時と遅らせていくと、末梢時計の位相は大きく遅れることが分かった。そこで、午後11時に半分の餌を、午後7時に残りを与える分食を行ったところ、位相の遅れが改善した。以上の結果から、1日3食のスケジュールでも、食べ方により、末梢時計の位相は変わることを、夜遅い食事は体内時計を夜型に変えることが分かり、分食により改善することから、夕食が遅い人に直ちに应用出来る研究成果であった。

(3) 時間栄養学と時間運動学による抗肥満効果。

40%脂肪の高脂肪食を負荷した状態で、(A)自由に輪回し運動にアクセスできる状態、(B)アクセスできる時間を1日4時とし、マウスにとっての朝、昼、夕に設定する。どの時間帯の運動が一番抗肥満効果を示すか調べた。その結果、夕運動が体重増加を抑制した。夕運動群を詳細に調べると、朝に摂食行動が盛んであった。すなわち朝から昼に食事をし、夕方運動することで、肥満用が起こることが分かった。

(4) 時間栄養学と時間運動学の順番による抗肥満効果。

次に食事と運動の順番効果を明らかにすべく、運動時間を昼間に固定し、餌を運動の前に与えるか、あるいは運動後に与えるかの2つのグループを用意した(図1, 2)。一方、食餌を昼間に固定し、朝運動+昼食事、あるいは、昼食事+夕運動の2つのグループを用意した(図3, 4)。運動と食事のタイミングの組み合わせが、肥満予防に良い可能性が考えられる。いずれの組み合わせも、食餌後に運動する組み合わせは、運動後に食餌をする群に比較して、内臓脂肪蓄積が少なく、逆に骨格筋の増大という、顕著な抗肥満効果が見いだせた(図1、図

3)。運動と食事パターンの組み合わせ状態で、代謝ケージによりエネルギー代謝や呼吸商も計測し、これらのリズム性発現に対する影響についても調べた。その結果、運動後の食餌では、呼吸商の低下が起こらず、脂肪の燃焼が弱いことが分かった(図2、図4)。すなわち、運動と食事の組み合わせは重要であり、食事後の運動は、摂取したエネルギーの消費に有用であり、特に夕方の運動は効果的であることが分かった。この研究成果は、人へ十分に応用可能であることが分かった。

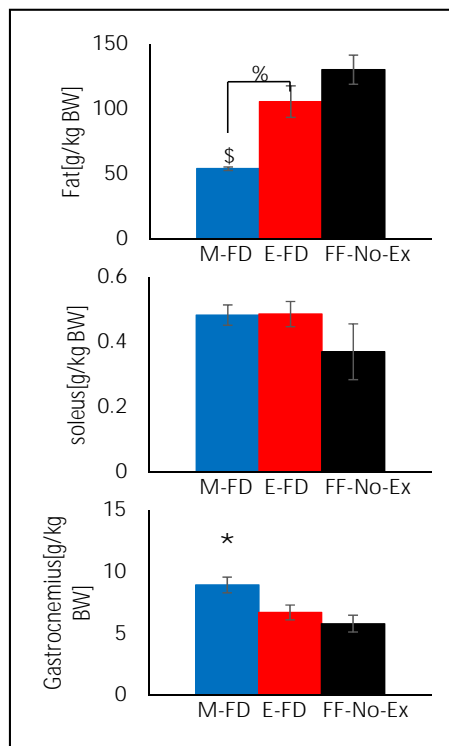


図1 運動を昼に固定し、朝食(M-FD)と夕食(E-FD)を比較。朝食群は脂肪低下と筋肉増大をもたらす。

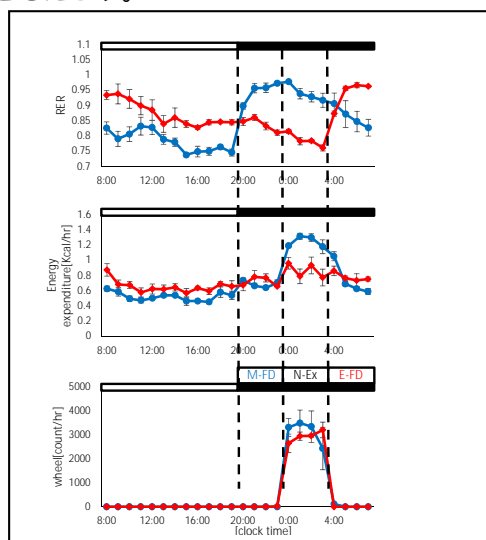


図2 エネルギー代謝と呼吸商への作用
朝食群はエネルギー消費を増大させ、非活動期に脂肪燃焼が大きい。

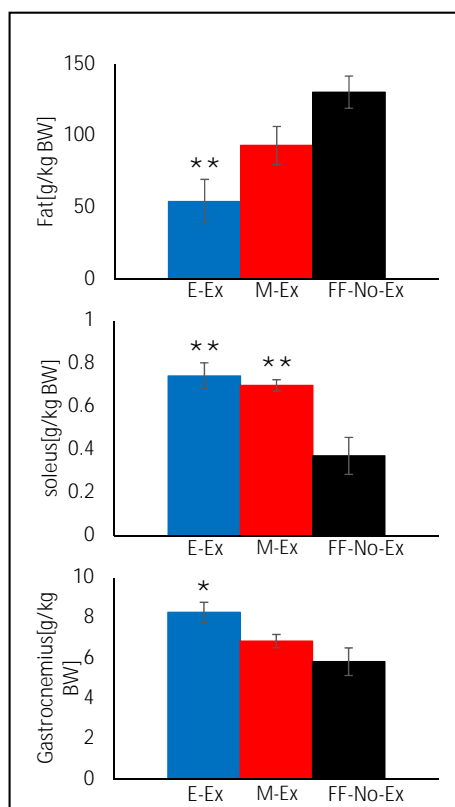


図3 昼食固定で朝運動 (M-Ex) と夕運動 (E-Ex) の比較。食餌後の運動である E-Ex は脂肪低下、筋肉増大をもたらす。

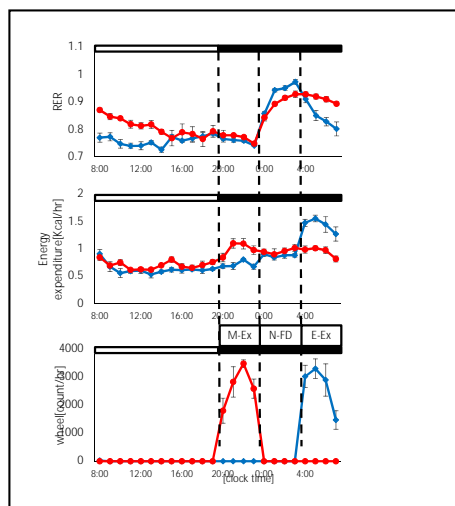


図4 エネルギー代謝と呼吸商への作用。夕運動はエネルギー消費を増大させ、脂肪を燃焼させる。

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 19 件)

(1). Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Hara M, Ikegami T, Tahara Y, Katoh R, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nishiyama C, Nakao A, Circadian Regulation of Allergic Reaction by the Mast Cell Clock. *J Allergy Clin Immunol*,

133,568-575, 2014 査読あり
<http://www.jacionline.org/>

(2). Horikawa K, Fuji K, Fukazawa Y, Shibata S. Two Distinct Serotonin Receptors Co-mediate Non-photic Signals to the Circadian Clock. *J Pharmacol Sci.* 123:402-406, 2013. 査読あり
<http://plaza.umin.ac.jp/~JPS1927/jps/index.html>

(3). Tahara Y., Shibata S. Chronobiology and nutrition. *Neuroscience* 253,78-88, 2013 査読あり
<http://www.journals.elsevier.com/neuroscience/>

(4). Cermakian N, Lange T, Golombek D, Sarkar D, Nakao A, Shibata S, Mazzocchi G. Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiol Int.* 30:870-888, 2013. 査読あり
<http://informahealthcare.com/loi/cbi>

(5). Itokawa M, Hirao A, Nagahama H, Otsuka M, Ohtsu T, Furutani N, Hirao K, Hatta T, Shibata S. Time-restricted feeding of rapidly digested starches causes stronger entrainment of the liver clock in PER2::LUCIFERASE knock-in mice. *Nutr Res.* 33:109-119, 2013. 査読あり
<http://www.nrjournal.com/>

(6). 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.* 168:39-46, 2013. 2 査読あり
10.1111/(ISSN)1365-2133

(7). 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>

(8). 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/>

(9). 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/>

(10). 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/>

(11).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/>

(12).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/>

(13).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

(14). 柴田重信、用語解説「時間栄養学」、栄養 - 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

(15). 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>

(16). 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

(17). 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

(18). 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

(19). 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>

〔学会発表〕(計 9 件)

(1)柴田重信、「時間栄養学 免疫・炎症から代謝障害まで」日本免疫食品学会、第9回学術大会、東京、2013年10月17日-18日 oral

(2)柴田重信 「時間栄養学に基づく生活習慣病予防」、日本体質医学会、久留米市、2013年10月5-6日、oral

(3)柴田重信 「時間栄養学とは何か」、35回日本臨床栄養学会総会、34回日本臨床栄養協会総会、第11回大連合大会、京都、2013年10月4-6日 oral

(4)柴田重信 「時間栄養学」 第15回ダノン健康・栄養フォーラム、有楽町朝日ホール、東京、2013年9月28日 oral

(5)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

(6)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

(7)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

(8)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

(9)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

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.waseda.jp/sem-shibatasa/>

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