

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350179

研究課題名(和文) 睡眠障害性代謝異常のメカニズムの解明とその時間栄養学的改善方法の開発

研究課題名(英文) Chrono-nutrition research to improve the circadian disruption-related metabolic disorders

研究代表者

大石 勝隆(OISHI, Katsutaka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：50338688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを使った実験により、不適切な時間帯の摂食が代謝異常を引き起こすメカニズムの解明を目指した。非活動期である明期のみでの時間制限給餌が、暗期のみでの時間制限給餌に比べ、体温及び活動量の低下、レプチン抵抗性の惹起による摂餌量の増加、高インスリン血症による肝臓での脂質合成の亢進、末梢組織における体内時計の脱同調を引き起こし、肥満を誘導することを明らかにした。

PER2::LUCマウス由来の神経細胞を用いて、約100種類の生薬成分について体内時計への作用を検証したところ、シコニンやアコニチン、アリソールA、ペオノール、[6]-ショーガオール、ケイ皮酸に、体内時計の周期短縮効果があることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Feeding at unusual times of the day (inactive phase) is thought to be associated with obesity and metabolic disorders in experimental animals and in humans. We compared metabolic functions between mice fed only during the sleep phase (daytime) and those fed only during the active phase (nighttime). Feeding during daytime desynchronizes peripheral clocks and causes obesity and metabolic disorders by inducing leptin resistance, hyperphagia, physical inactivity, hepatic fat accumulation and adiposity.

To find natural compounds that could modulate the biological clock, we developed a real-time molecular clock reporter system using neuronal cells derived from PER2::LUC mouse embryos. We discovered that natural compounds such as shikonin, aconitine, alisol A, paeonol, and (E)-cinnamic acid could shorten the circadian period of neuronal clock in vitro.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 食生活 肥満 メタボリックシンドローム 時計遺伝子 機能性食品

1. 研究開始当初の背景

現在我が国においては、国民の5人に1人が睡眠に関して何らかの問題を抱えているとされている。これには、社会の24時間化や不規則な食生活、様々な精神的ストレスなどによる体内時計の乱れが一因となっているものと考えられる。睡眠障害は、うつ病や神経症などの精神疾患や、肥満や糖尿病、高血圧などの代謝性疾患の原因となるばかりでなく、交通事故をはじめとした大小様々な産業事故の引き金となっており、精神的、肉体的、そして経済的な社会問題である。2006年には、我が国における睡眠障害による経済損失が3兆5,000億円であるとの発表がなされている(日本大学・内山真)。今後は、超高齢化社会における生産年齢人口の減少や保険医療費などの社会保障費の増大が予測され、睡眠障害や体内時計の乱れによる疾患発症機構の解明は、我が国において解決しなければならない重要課題であると思われる。

睡眠障害と代謝性疾患との関係については、多くの疫学的研究がなされてきた。例えば、非肥満女性68,000人を対象とした16年間にも及ぶ前向き調査から、睡眠時間と肥満症との関連が報告されており(Patelら、*Am J Epidemiol*, 2006)、睡眠時間と糖尿病マーカーとの関連も報告されている(Nakajimaら、*Sleep Med*, 2008)。また、健常者に対する3日間の断眠実験を行うことで、インスリン感受性や耐糖能が悪化すること(Tasaliら、*PNAS*, 2008)、糖尿病患者の睡眠の質が、糖尿病マーカーの増減と関連すること(Knutsonら、*Arch Intern Med*, 2006)なども報告されている。申請者はこれまで、時計遺伝子の変異マウスを使った研究により、体内時計の乱れが糖・脂質代謝の異常を誘発することを見出してきた。その一方で、睡眠障害による糖尿病や肥満症の発症メカニズムについては、ヒトへの外挿が可能な睡眠障害モデル動物が存在しなかったこともあり、これまでほとんど解明されていない。

ヒトにおける睡眠障害は、遺伝的な要因というよりも、ストレスなどの環境因子によって後天的に誘発されているものと思われる。我々は、睡眠障害による様々な疾患発症メカニズムの解明を目指して研究を行ってきた経緯を持ち、2010年、ヒトへの外挿が可能なストレス性睡眠障害モデル動物の開発に成功した。本モデル動物は、休息期(明期)前半の過活動と、活動期(暗期)の活動量の減少を特徴としており、脳波測定の結果からも、休息期における覚醒比率の増加と、活動期における睡眠比率の増加のみならず、深睡眠の指標となるデルタ波の減少や、睡眠覚醒時間の断片化も認められ、ヒト

における不眠症モデルとなり得る可能性がある。

最近になって我々は、ストレス性睡眠障害モデルマウスにおける過食を伴う耐糖能異常を見出し、本モデル動物を用いることで、睡眠障害性代謝異常の発症メカニズムの解明が可能であるとの発想に至った。

2. 研究の目的

- (1) 飼育環境における明暗サイクルの乱れがマウスの生理機能に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) 睡眠障害を診断するための新規バイオマーカーの開発を目指し、我々が開発したストレス性睡眠障害モデルマウスにおいて、血液中のアミノ酸組成に与える睡眠障害の影響を明らかにする。
- (3) 体内時計の積極的な制御を目指し、神経培養細胞を用いた生体リズム測定システムを構築し、体内時計に作用する天然化合物を探索する。
- (4) 習慣的な運動が体内時計によって制御される様々な生理機能のリズムに与える影響を調べる。
- (5) 不規則な食生活が生体に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 飼育環境における明暗サイクルの乱れがマウスの生理機能に及ぼす影響を明らかにするために、マウスを明期3時間:暗期3時間の6時間周期の明暗サイクル下で飼育し、活動リズム、深部体温リズム、体重、摂餌量、肝臓での時計遺伝子発現などに及ぼす影響を検討した。また、摂取させる飼料を、通常食にした場合と高脂肪食にした場合での影響を比較した。
- (2) ストレス性睡眠障害モデルマウスにおいて、血液中のアミノ酸組成に与える睡眠障害の影響を明らかにするため、1週間の睡眠障害をマウスに負荷し、肝臓における時計遺伝子発現や酸化ストレス関連遺伝子の発現、血中アミノ酸プロファイルに対する影響を検討した。
- (3) 体内時計の積極的な制御を目指し、神経培養細胞を用いた生体リズム測定システムを構築し、これまでに繊維芽細胞の時計への作用が確認されていたハルミンの神経細胞への作用を確認するとともに、生薬成分を対象として体内時計に作用する化合物を探索した。
- (4) 習慣的な運動が体内時計によって制御される様々な生理機能のリズムに与える影響を調べる目的で、マウスに対して回転かごを用いた自発運動を4週間負荷し、体重や摂餌量、臓器重量とともに、深部体温や摂餌の日内リズム、ホルモンの分泌リズムや末梢組織における時計

遺伝子の発現リズム、代謝関連遺伝子の発現リズムなどを比較した。

- (5) 不規則な食生活が生体に及ぼす影響を明らかにする目的で、マウスに対して1週間の時間制限給餌を行った。具体的には、マウスの活動時間帯である暗期のみ8時間給餌を行った群と、マウスの非活動時間帯である明期のみ8時間給餌を行った群で、回転かごを用いた活動リズム、体重及び摂餌量、臓器重量、血中生化学項目、肝臓脂質、肝臓での代謝関連遺伝子の発現リズム、血中ホルモンのリズム、視床下部での摂食関連ペプチドの発現などを比較した。

4. 研究成果

- (1) マウスを明期3時間：暗期3時間の6時間周期の明暗サイクル下で飼育することにより、活動リズムは、約26時間周期でフリーランした。一方、深部体温のリズムは、外界の明暗サイクルに同調した6時間周期のリズムを示した。末梢時計は、体温リズムの影響を受けることが知られているが、肝臓や心臓、白色脂肪において時計遺伝子の発現を調べたところ、多くの時計遺伝子の発現リズムが消失しており、個体間脱同調ではなく、転写レベルでの影響である可能性が示された。

明暗サイクルの乱れによる活動量や摂餌量、体重変化に対する食餌の影響を調べる目的で、普通食と高脂肪食を負荷しながら6週間、明暗6時間周期で飼育を行い、明暗24時間周期で飼育した場合との比較を行った。普通食の場合、活動量や摂餌量、体重の変化に影響は認められなかったが、高脂肪食を負荷した場合、明暗サイクルの乱れに伴い、活動量の減少と摂餌量の増加、体重の増加が認められ、明暗サイクルの乱れに伴う行動生理学的な影響が高脂肪食によって重篤化する可能性が示された。

- (2) 我々が独自に開発したストレス性睡眠障害モデルマウスにおいて、肝臓での時計遺伝子発現及び血中アミノ酸プロファイル調べた。本モデル動物では、活動リズムが顕著に乱れており、休息期（明期）の過活動と活動期（暗期）の活動量の低下が認められるが、肝臓での時計遺伝子の日周発現については、どの時計遺伝子においても対照群との差異は認められなかった。肝臓での酸化ストレスマーカー遺伝子の発現が時刻依存的に有意に影響を受けていた。一方、血中アミノ酸について、明期と暗期の2時刻で調べたところ、明期においては、睡眠障害モデルマウスにおいてほとんどのアミノ酸が減少しており、活動期の暗期においては、バリン、ロイシン、イソロイシンといった分岐鎖アミノ酸が有意

に増加していることが示された。以上より、血中アミノ酸プロファイルが、睡眠障害の診断マーカーとなり得る可能性が示された。

- (3) 時計遺伝子 *Per2* の遺伝子下流にルシフェラーゼ遺伝子をノックインした *PER2::LUC* マウスを用意し、胎仔脳より神経前駆細胞を採取した後、*in vitro* で分化誘導を行った神経細胞を使って、神経細胞系で時計機能を調べるシステムを構築した。これまで繊維芽細胞に対する時計周期の延長作用を報告してきたハルミンを用いて、*PER2::LUC* 神経細胞や視交叉上核（SCN）のスライス培養系においても時計周期を延長することを明らかにした。

約100種類の生薬成分を用いて体内時計への作用を検証したところ、シコニンやアコニチン、アリソール A、ペオノール、[6]-ショーガオール、ケイ皮酸に、神経細胞における体内時計の周期短縮効果があることが判明した。

- (4) マウスに回転かごを用いた自発運動を4週間継続させ、深部体温や摂餌、ホルモンの分泌、時計遺伝子発現等の日内リズムを調べた。その結果、回転かごの無い状態で飼育したマウスに比べ、深部体温や摂餌、ホルモンの分泌、末梢組織における時計遺伝子発現などの位相が、30分程度早まっていることが判明した。また、コルチコステロンの分泌リズムの振幅が有意に増大していることが判明した。これらの結果から、習慣的な運動には体内時計によって制御されている行動生理学的リズムの位相を早める効果があるものと思われる。

- (5) マウスに対して1週間の時間制限給餌を行った。回転輪の輪回し行動は、休息期（明期）摂餌群、活動期（暗期）摂餌群ともに明暗サイクルに同調した夜行性の活動リズムを示した。明期摂餌群においては、活動量が減少したのにもかかわらず、摂餌量は有意に増加し、脂肪蓄積を伴う体重増加が認められた。明期摂餌群における摂餌量の増加は視床下部での食欲促進ペプチドの発現増加と相関していたが、これらのペプチドの発現を抑制して食欲を抑制する血中レプチンは顕著に増加しており、レプチン抵抗性が生じているものと考えられた。明期摂餌群では、血中総コレステロールの増加、肝臓での総脂質、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸の増加が認められた。肝臓や白色脂肪において、脂肪酸合成に関わる律速酵素遺伝子 *Scd1*, *Acaca*, *Fasn* などの mRNA 発現が亢進しており、このことが血中や臓器中における脂質増加の原因であると考えられた。興味深いことに、DF群においては顕著な高インスリン血症が認められ、血中インスリンの増加が、脂肪

酸合成の誘導に寄与している可能性が考えられた。時計遺伝子の発現解析の結果、肝臓においては給餌のタイミングに依存して位相がシフトしたが、骨格筋では発現位相のシフトが認められず、DF群においては、末梢組織の体内時計が脱同調している可能性が考えられた。

以上の結果から、不適切な時間帯の摂食は、レプチン抵抗性の惹起による摂食量の増加、活動量の減少、高インスリン血症による脂質合成の亢進のみならず、末梢時計の脱同調を誘導することにより肥満の原因となる可能性が示された。

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 21 件)

Horikawa K, Hashimoto C, Kukuchi Y, Makita M, Fukudome S, Okita K, Wada N, Oishi K (2016) Wheat alkylresorcinols reduce micellar solubility of cholesterol *in vitro* and increase cholesterol excretion in mice. *Nat Prod Res*, in press.

Oishi K, Higo-Yamamoto S, Yasumoto Y (2016) Moderately high-dose of the artificial sweetener saccharin potentially induces sleep disorders in mice. *Nutrition*, in press.

Yasumoto Y, Hashimoto C, Nakao R, Yamazaki H, Hiroyama H, Nemoto T, Yamamoto S, Sakurai M, Oike H, Wada N, Yoshida-Noro C, Oishi K (2016) Short-term feeding at the wrong time is sufficient to desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. *Metabolism* 65(5): 714-727.

Oishi K, Higo-Yamamoto S, Yamamoto S, Yasumoto Y (2015) Disrupted light-dark cycle abolishes circadian expression of peripheral clock genes without inducing behavioral arrhythmicity in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 458(2): 256-261.

Yasumoto Y, Nakao R, Oishi K (2015) Free access to a running-wheel advances the phase of behavioral and physiological circadian rhythms and peripheral molecular clocks in mice. *PLoS One* 10(1): e0116476.

Oishi K, Yamamoto S, Itoh N, Nakao R, Yasumoto Y, Tanaka K, Kukuchi Y, Fukudome S, Okita K, Takano-Ishikawa Y (2015) Wheat alkylresorcinols suppress high-fat, high-sucrose diet-induced obesity and glucose

intolerance by increasing insulin sensitivity and cholesterol excretion in male mice. *J Nutr* 145(2): 199-206. Kondoh D, Tateno H, Hirabayashi J, Yasumoto Y, Nakao R, Oishi K (2014) Molecular clock regulates daily α 1-2-fucosylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) within mouse secondary olfactory neurons. *J Biol Chem* 289(52): 36158-36165.

Oishi K, Yamamoto S, Itoh N, Miyazaki K, Nemoto T, Nakakita Y, Kaneda H (2014). Disruption of behavioral circadian rhythms induced by psychophysiological stress affects plasma free amino acid profiles without affecting peripheral clock gene expression in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 450(1): 880-884. Kondoh D, Yamamoto S, Tomita T, Miyazaki K, Itoh N, Yasumoto Y, Oike H, Doi R, Oishi K (2014) Harmine lengthens circadian period of the mammalian molecular clock in the suprachiasmatic nucleus. *Biol Pharm Bull* 37(8): 1422-1427.

Oishi K, Higo-Yamamoto S (2014) Disrupted daily light-dark cycles induce physical inactivity and enhance weight gain in mice dependently upon dietary fat intake. *Neuroreport* 25(11): 865-869.

[学会発表](計 60 件)

【招待講演】大石勝隆 (2015.11.29) 体内時計からみた食と健康 (第 11 回北里大学農医連携シンポジウム、北里大学主催) 北里大学白金キャンパス、東京都港区

【招待講演】大石勝隆 (2015.9.30) 食による体内時計の制御を目指した時間栄養学研究 (第 7 回「栄養とエイジング」国際会議、ILSI JAPAN) 東京大学弥生講堂、東京都文京区

【招待講演】大石勝隆 (2015.9.3) 体内時計と健康 (MES2015: 第 25 回マイクロエレクトロニクスシンポジウム) 一般社団法人エレクトロニクス実装学会、大阪大学、大阪府吹田市

【招待講演】大石勝隆 (2015.5.16) Regulation of circadian rhythms by dietary nutrients and natural compounds (ACN2015: 12th Asian Congress of Nutrition、第 69 回日本栄養・食糧学会大会) パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

【招待講演】大石勝隆 (2015.2.14) 食を中心とした生活習慣による生体リズムの積極的な制御を目指して (第 1 回時間栄養科学研究会、共催: SIP「時間栄

養・運動レシビ開発コンソーシアム」)
早稲田大学先端生命医科センター、東京都新宿区

大石勝隆 (2014.11.9) Regulation of circadian rhythms by dietary nutrients, natural compounds, and physical exercise (第21回日本時間生物学会学術大会、シンポジウム「時間生物学の産業応用：植物からヒトまで」)九州大学、福岡県福岡市

【招待講演】大石勝隆 (2014.8.2) 食と体内時計 (第6回 ISMSJ 学術集会、ランチオンセミナー、共催：第6回 ISMAJ 学術集会/武田薬品工業株式会社) 神戸ファッションマート9階イオホール、兵庫県神戸市

【招待講演】大石勝隆 (2014.7.5) 栄養とリズム (第18回睡眠科学研究講座「睡眠と栄養の基礎と最先端：しっかり押さえる」) 主催：日本睡眠学会教育委員会) 徳島大学大塚講堂小ホール、徳島県徳島市

【招待講演】大石勝隆 (2014.2.25) 食による体内時計の積極的な制御を目指して (フード・フォーラム・つくば ファイトケミカルズ分科会、「乳酸菌と食品成分による眠りの制御 睡眠快善」) (独)農研機構 食品総合研究所、茨城県つくば市

【招待講演】大石勝隆 (2014.1.12) 食による体内時計の積極的な制御を目指して (第17回日本病態栄養学会年次学術集会、シンポジウム「サーカディアンリズムと栄養学」) 大阪国際会議場、大阪府大阪市

【招待講演】大石勝隆 (2013.7.13) 睡眠障害のモデル動物を用いた食品の機能性評価 (第128回日本薬理学会関東部会 新薬理学セミナー2013、「時間生物学は創薬や機能性食品の開発に寄与するのか?」) 早稲田大学国際会議場、東京都新宿区

〔図書〕(計 2件)

大石勝隆、金田弘拳 (2013) 「SBL88 乳酸菌のストレス性睡眠障害改善作用」、*FOOD Style* 21, vol. 17, No. 8, pp. 59-61 (株式会社食品化学新聞社)

大石勝隆 (2013) 「時計遺伝子と末梢時計」、**日本臨牀 増刊号 最新臨床睡眠学 睡眠障害の基礎と臨床**、pp. 141-147 (株式会社日本臨牀社)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 15件)

名称：概日リズム改善剤
発明者：大石勝隆、山本幸織
権利者：国立研究開発法人 産業技術総合研究所

種類：特許
番号：特願 2015-085049
出願年月日：平成 27 年 4 月 17 日
国内外の別：国内

名称：概日リズム改善剤
発明者：大石勝隆、山本幸織
権利者：国立研究開発法人 産業技術総合研究所

種類：特許
番号：特願 2015-085039
出願年月日：平成 27 年 4 月 17 日
国内外の別：国内

名称：概日リズム改善剤
発明者：大石勝隆、山本幸織
権利者：国立研究開発法人 産業技術総合研究所

種類：特許
番号：特願 2015-025665
出願年月日：平成 27 年 2 月 12 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-bcl/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 勝隆 (OISHI, Katsutaka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長
研究者番号：50338688