

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00940

研究課題名(和文) 加齢に伴う睡眠障害性代謝異常のメカニズムの解明と時間栄養学的予防・改善方法の開発

研究課題名(英文) Evaluation of the underlying mechanisms of metabolic disorders induced by sleep disruption and the development of prevention procedures of chrono-disruption

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・生命工学領域・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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠障害や摂食リズムの乱れによる肥満や糖尿病などの代謝異常の発症メカニズムの解明を目指した研究を行った。ヒトの不眠症への外挿が可能な睡眠障害モデルマウスを用いて、睡眠障害による糖代謝異常には、肝臓での糖新生の亢進が関与している可能性を明らかにした。夜食などの食リズムの乱れに伴う代謝異常にはレプチン抵抗性が関与しており、運動習慣の有無にかかわらず非常に短期間で肥満を誘発する可能性を示した。睡眠障害モデルマウスを使った実験により、ココアや乳酸菌による睡眠障害の改善効果を明らかにした。魚油による代謝改善効果が、夕食時の摂取に比べて朝食での摂取によって高まる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの不眠症への外挿が可能な睡眠障害モデルマウスを用いた実験により、慢性的な睡眠障害による糖代謝異常の発症メカニズムを明らかにするとともに、ココアに睡眠障害の改善効果があることを示した。マウスを使った実験により、食リズムの乱れに伴う肥満発症のメカニズムを明らかにし、活動リズムに合致した摂食のリズムが、肥満の抑制に非常に重要であることを示した。時間栄養学的な視点から、魚油の健康改善効果を高めるためには、朝食時の摂取が効果的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythm disruption causes various physiological impairments such as sleep disorders, depression, and metabolic disorders. Chrono-nutrition is the research field that studies the time-of-day effect of food intake on health and that develops the functional food that improves circadian rhythms of physical performance.

Using a mouse model of chronic sleep disorders (CSD), we found that CSD impaired glucose tolerance by inducing gluconeogenesis and suppressing glycolysis. We also found that dietary natural cocoa attenuates disrupted circadian rhythms in locomotor activity and sleep-wake cycles in mice with CSD. Previously, we had demonstrated that mice fed a diet only during the sleep phase (daytime feeding; DF) developed metabolic disorders. In this project, we revealed that short-term feeding at unusual times is sufficient to induce leptin resistance, and that leptin resistance is involved in the underlying mechanisms of DF-induced obesity and metabolic disorders.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 サーカディアンリズム 時間栄養 睡眠 生活習慣病 モデル動物 食品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では、国民の5人に1人が睡眠に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時間化に伴う夜勤やシフトワーク、不規則な食生活、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、交通事故を含めた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(内山真)。

睡眠障害と代謝性疾患との関係については、これまで多くの疫学的報告がなされてきた(Shiromaniら編、*Sleep Loss and Obesity - Intersecting Epidemics*, Springer, 2012年)。例えば、非肥満女性68,000人を対象とした16年間の前向き調査から睡眠時間と肥満症との関連が(Patelら、*Am J Epidemiol*, 2006)、女性72,000人を対象とした10年間の前向き調査から睡眠時間と心血管疾患との関連が(Ayasら、*Arch Intern Med*, 2003)それぞれ明らかとなっている。睡眠時間と糖尿病との関連もSpiegelら(*Lancet*, 1999)が世界で初めて報告した後、多くの研究成果が報告されており、食や運動といった生活習慣とともに、睡眠習慣は生活習慣病の予防・改善にとって重要な要素となっている。

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、ヒトの不眠症への外挿が可能なストレス性睡眠障害モデル動物を開発した(Miyazakiら、*PLoS One*, 2013)。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、血中レプチンの減少に伴う過食なども認められる(Oishiら、*BBRC*, 2014)。そこで我々は、本モデル動物を用いることにより、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。

一方、シフトワーカーにおいては、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症リスクが高いことが知られており、夜食や朝食欠食などの食リズムの乱れが代謝異常を引き起こしているのではないかと推測した。我々は、マウスを使った時間制限給餌実験を行い、活動リズムに逆らった給餌によって短期間で肝臓への脂質の蓄積や脂肪重量の増加、高インスリン血症などの代謝異常を引き起こすことを発見した(Yasumotoら、*Metabolism*, 2016)。本実験系を用いることにより、食リズムの乱れによる代謝異常の発症メカニズムを明らかにできるものと考えた。

「時間栄養学」とは、食品の機能性を利用して睡眠や体内時計機能の改善を目指す一方で、食品の一次機能(栄養機能)や三次機能(生体調節機能)に着目し、その摂取時刻の影響に関する研究などを行う学問である。我々は、独自に開発した睡眠障害モデルマウスを用いることにより、睡眠障害の改善効果を有する食品成分の探索を行うとともに、マウス実験により食品の機能性を高めるための至適摂取のタイミングに関する研究を行うことができるものと考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) ヒトの不眠症への外挿が可能なストレス性睡眠障害モデルマウスを用いて、睡眠障害による代謝異常の発症メカニズムを解明する。
- (2) マウスを使った時間制限給餌実験によって、摂食リズムの乱れに伴う肥満発症の分子メカニズムを解明する。
- (3) ストレス性睡眠障害モデルマウスを用いて、睡眠障害の改善効果を有する食品成分の探索を行う。
- (4) 魚油による脂質代謝改善効果について、マウスを使った実験により、摂取時刻の違いによる影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) マウスに6週間のストレス性睡眠障害(Miyazakiら、*PLoS One*, 2013)を負荷し、血中の生化学パラメーターやホルモン濃度の測定、肝臓、骨格筋、白色脂肪組織での代謝に関連する遺伝子の発現解析を行うとともに、糖負荷試験による耐糖能の測定を行った。実験期間を通してマウスには高脂肪食を自由摂餌させ、睡眠障害の有無による影響を比較した。
- (2) マウスを明暗各12時間の明暗条件下で馴化した後、活動期(暗期)の8時間のみ、あるいは非活動期(明期)の8時間のみに給餌を行う時間制限給餌を1週間行った。飼料は、高脂肪高シヨ糖食を用いた。レプチン抵抗性を調べるためのレプチン負荷試験については、1週間の時間制限給餌の後、給餌のタイミングに合わせて2日間のレプチン投与を行い、摂餌量や体重に与える影響を調べた。非活動期の時間制限給餌による肥満の促進に対して、レプチン抵抗性が関与している可能性を検証する目的で、レプチン受容体の変異した*db/db*マウスと、機能性レプチンを持たない*ob/ob*マウスを用いた。非活動期の時間制限給餌による肥満の促進に対して、運動習慣の有無による影響を調べる目的で、回転かごケージと通常ケージを用いて時間制限給餌を行いその影響を比較した。
- (3) ナチュラルココアによる睡眠障害改善効果を調べる目的で、ナチュラルココアパウダ

ーを2%含む高脂肪高シヨ糖食と、対照としてセルロースを2%含む高脂肪高シヨ糖食を用意した。マウスを対照群、睡眠障害群、ココア群、ココア摂取睡眠障害群の4群に分け、睡眠障害負荷と同時にココアの摂取を開始させた。回転かごケージを用いて活動量や活動リズムの測定を行うと同時に、30日間の睡眠障害負荷の後に脳波測定による睡眠への影響を評価した。

(4) 魚油摂取による脂質代謝の改善効果について、摂取時刻の違いによる影響を明らかにするために、マウスを、高フルクトース食を終日摂取させる対照群、活動開始時刻を中心に12時間のみ4%の魚油を含む高フルクトース食に置換した朝食時摂取群、活動終了時刻を中心に12時間のみ4%の魚油を含む高フルクトース食に置換した夕食時摂取群の3群に分けて2週間の実験を行った。1日4時刻で血液と肝臓、白色脂肪組織を採取し、血中脂肪酸濃度や、肝臓の脂質含量、脂質代謝関連遺伝子の発現などを調べた。魚油の吸収量を比較するために、24時間の糞便を回収し、脂肪酸分析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 6週間のストレス性睡眠障害負荷によって、体重の変化には影響がなかったものの、顕著な過食が認められた。食欲の抑制作用を有するレプチンの血中濃度や、白色脂肪組織におけるレプチン遺伝子の発現量が低下していたことから、これらが過食の原因となっている可能性が考えられた。糖負荷試験の結果、睡眠障害群において、空腹時血糖値の増加と耐糖能の低下が認められた。肝臓における糖代謝関連遺伝子の発現量を測定したところ、糖新生に係わる *Pck1* の発現量が増加し、糖代謝に係わる *Gck* の発現量が低下していることが判明し、これらが糖代謝異常の原因となっている可能性が考えられた。肥満やメタボリックシンドロームで見られる一般的な糖代謝異常においては、マクロファージの活性化などによる脂肪炎症が原因となっているものと考えられている。今回の睡眠障害モデルマウスを使った研究では、脂肪組織での炎症が全く認められなかったことから、睡眠障害による糖代謝異常の発症メカニズムは、肥満等による糖代謝異常とは異なる可能性が考えられた。

(2) マウスを用いて1週間の時間制限給餌を行ったところ、活動期摂餌群に比べて非活動期摂餌群では、脂肪重量の増加に伴う体重増加や肝臓への中性脂肪及びコレステロールの蓄積、肝臓や白色脂肪組織における脂肪酸合成遺伝子の発現増加が認められ、非活動期の時間制限給餌が代謝異常による肥満を促進することが示された。非活動期時間制限給餌群では、高インスリン血症や高レプチン血症が認められた一方で、視床下部における *Npy* や *Agrp* などの食欲促進ペプチドの mRNA 発現が促進していたことから、レプチン抵抗性が惹起されている可能性が考えられた。

レプチン抵抗性の有無を調べる目的で、6日間の時間制限給餌を行った後、7日目と8日目の給餌直前にレプチンを腹腔内投与し、その感受性を調べた。その結果、活動期摂餌群では、レプチン投与による摂餌量と体重の減少がみられた一方で、非活動期摂餌群ではレプチンによるこれらの作用が全く見られなかったことから、非活動期の時間制限給餌がレプチン抵抗性を誘発することが示された。

次に、非活動期の時間制限給餌によるレプチン抵抗性が、肥満の原因なのか結果であるのかを調べる目的で、レプチン抵抗性のモデル動物である機能的レプチン受容体を持たない *db/db* マウスを用いて時間制限給餌実験を行った。その結果、非活動期時間制限給餌による脂肪重量や体重の増加、肝臓への中性脂肪及びコレステロールの蓄積の促進、肝臓や白色脂肪組織における脂肪酸合成遺伝子の発現増加などがすべて見られなくなった。興味深いことに、レプチンを欠損した(レプチン抵抗性にならない) *ob/ob* マウスでは、野生型マウスとは逆に非活動期時間制限給餌によって体重増加が抑制されることが判明した。以上の結果より、レプチン抵抗性の惹起が、非活動期時間制限給餌による脂質代謝異常の原因である可能性が示された。

(3) 30日間のココアの摂取と同時にストレス性睡眠障害の負荷を行った。ココア摂取のみの影響を比較したところ、回転かごによる活動リズムや脳波測定による睡眠覚醒リズムにはほとんど影響しないことが分かった。睡眠障害の負荷により、活動期(暗期)の活動量が顕著に減少し、非活動期(明期)前半のノンレム睡眠時間の減少と覚醒時間の増加、活動期前半の覚醒時間の減少とノンレム睡眠時間の増加が認められたが、ココアを摂取したマウスにおいては、これらのいずれも顕著に抑制されていることが分かった。また、睡眠障害負荷の有無にかかわらず、ココアの摂取により、レム睡眠時間が延長される可能性も示された。

(4) 魚油による脂質代謝改善効果について、マウス実験により、摂取時刻の違いによる影響を調べた結果、1日に当たりの魚油の摂取量がほぼ等しいにもかかわらず、朝食時摂取群において血液中や肝臓中の中性脂肪の低減効果が認められ、夕食時摂取群においては有意な低減効果が認められなかった。この結果は、脂肪酸合成酵素遺伝子の発現量にも合致しており、肝臓や脂肪組織において、朝食時摂取群の方が夕食時摂取群に比べて有意に低値を示した。血漿の脂肪酸分析の結果、魚油に含まれる DHA や EPA の血中濃度は、朝食時摂取群の方が夕食時摂取群に比べて有意に高値を示した。さらに、糞便中に含まれる DHA や EPA は、夕食時摂取群の方が朝食時摂取群に比べて有意に高値を示した。これらの結果から、魚油に含まれる DHA や EPA の腸管からの吸収には日内リズムが存在し、朝食時(活動開始時)に高くなる可能性が考えられる。本成果については、産総研とマルハニチロ株式会社から共

同プレス発表を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Oishi K, Hashimoto C.	4. 巻 35
2. 論文標題 Short-term time-restricted feeding during the resting phase is sufficient to induce leptin resistance that contributes to development of obesity and metabolic disorders in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chronobiol Int.	6. 最初と最後の頁 1576-1594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2018.1496927.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okauchi H, Hashimoto C, Nakao R, Oishi K.	4. 巻 36
2. 論文標題 Timing of food intake is more potent than habitual voluntary exercise to prevent diet-induced obesity in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiol Int.	6. 最初と最後の頁 57-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2018.1516672.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higo-Yamamoto S, Yamamoto S, Miyazaki K, Nakakita Y, Kaneda H, Takata Y, Nakamura T, Oishi K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Dietary Heat-Killed Lactobacillus brevis SBC8803 Attenuates Chronic Sleep Disorders Induced by Psychophysiological Stress in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 164-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3177/jnsv.65.164">https://doi.org/10.3177/jnsv.65.164</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Oishi K, Konishi T, Hashimoto C, Yamamoto S, Takahashi Y, Shiina Y.	4. 巻 52
2. 論文標題 Dietary fish oil differentially ameliorates high-fructose diet-induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice depending on time of feeding.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Nutr Biochem	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2017.09.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oishi K, Ohyama S, Higo-Yamamoto S.	4. 巻 495
2. 論文標題 Chronic sleep disorder induced by psychophysiological stress induces glucose intolerance without adipose inflammation in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 2616-2621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oishi K, Yasumoto Y, Higo-Yamamoto S, Yamamoto S, Ohkura N	4. 巻 483
2. 論文標題 Feeding cycle-dependent circulating insulin fluctuation is not a dominant Zeitgeber for mouse peripheral clocks except in the liver: differences between endogenous and exogenous insulin effects.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 165-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.12.173.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oishi K, Yamamoto S, Oike H, Ohkura N, Taniguchi M	4. 巻 9
2. 論文標題 Cinnamic acid shortens the period of the circadian clock in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 232-237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.12.008">http://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.12.008</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計46件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 体内時計と生活習慣病
3. 学会等名 第33回糖尿病チーム医療の為の懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 遺伝子発現からみた体内時計と時間栄養学
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 時間栄養学とは何か
3. 学会等名 第30回北里大学バイオサイエンスフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 食品の機能性に着目した時間栄養学研究
3. 学会等名 第20回日本病態栄養学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----