

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82632

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01887

研究課題名(和文) 唾液中の時計遺伝子を用いた新コンディション評価

研究課題名(英文) New method of evaluating condition using salivary clock proteins

研究代表者

清水 和弘 (Shimizu, Kazuhiro)

独立行政法人日本スポーツ振興センター国立スポーツ科学センター・スポーツ研究部・研究員

研究者番号：00508286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、唾液中の時計遺伝子由来のタンパクであるBMAL1およびPER1に着目し、アスリートにおける疲労・概日リズムの評価指標としての有用性を明らかにするため、一過性の高強度運動および継続的な高強度運動に対する時計タンパクの応答について検討した。その結果、時計タンパクは高強度運動に反応し、時計タンパクが形成する概日リズムが乱れる可能性が示された。また、その乱れは高強度運動が継続することで持続もしくは乱れが大きくなる可能性が示された。これらのことから、時計タンパクのモニタリングはアスリートにおける疲労および概日リズムへの影響を評価する指標として有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は時計タンパクの運動応答を明らかにし、運動が疲労や生体リズムに及ぼす効果の研究の発展につながる基礎資料となる。また時計遺伝子は免疫系の調節に関わるため、疲労や免疫系の運動応答機序の解明につながる。アスリートは日常の激しい運動や海外遠征に伴う時差による影響で概日リズムを乱しやすい。しかし正確かつ有効な疲労および概日リズムの評価法は確立されていない。これらの評価法が可能になるとアスリートの疲労や時差の対策を早急に行うことができる。さらに慢性疲労が問題となる社会一般における疲労やストレスの評価等、医療・健康分野においても応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the effects of acute and chronic high-intensity exercise on salivary "clock protein" derived from clock genes. Acute high-intensity exercise suppressed BMAL1 activity varying with time, while PER1 did not show significant change by exercise. So, High intensity exercise could upset circadian rhythm formed by clock proteins such as BMAL1 and PER1. Moreover, chronic high intensity exercise decreased resting BMAL1 and PER1 in saliva. Therefore, continuous high intensified exercise could upset circadian rhythm of BMAL1/PER1 still more. These results suggested that monitoring BMAL1 and PER1 could be useful for evaluating circadian rhythm and fatigue in athletes.

研究分野：スポーツ医学

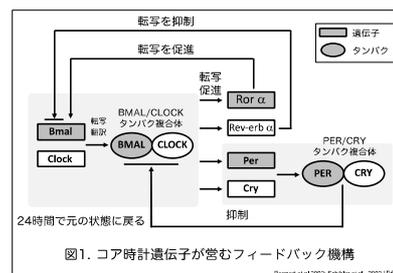
キーワード：時計遺伝子 時計タンパク 運動 アスリート 疲労 概日リズム

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アスリートが日常的に行う高強度運動は、その量や頻度が過度になると競技パフォーマンス低下や慢性疲労を伴うオーバートレーニング症候群を招いてしまう。また海外遠征が多く、時差による概日リズムの乱れが疲労を招くことも課題となっている。

近年、概日リズムを司る時計遺伝子が疲労の発生に重要な関わりを示すとして注目されている。時計遺伝子は、視交叉上核や肝臓、唾液腺、口腔粘膜、末梢血単核球など、様々な細胞に存在し、転写制御やリン酸化による修飾によって核の移行や安定化・分解などを促し、概日リズムを形成している。時計遺伝子群は相互に関係してフィードバック機構を形成し、



概日リズム調節を行っている。例えば、Bmal1 遺伝子は Clock 遺伝子と BMAL/CLOCK 複合体を形成し、Per 遺伝子や Cry 遺伝子等の転写を活性化し、Per 遺伝子は Cry 遺伝子と PER/CRY 複合体を形成し、BMAL/CLOCK を抑制させるフィードバック機構を形成している（図1）^{3,4)}。

炎症性サイトカインのひとつである腫瘍壊死因子 α (TNF- α) は、時計遺伝子発現を抑制し、概日リズムの乱れを招くとされ、このことが疲労の発生に大きく関与していると報告されている¹⁾。アスリートが行うような高強度・長時間の運動は TNF- α 産生を亢進させるため、これが時計遺伝子による概日リズムの制御を失調させ、疲労の発生につながる可能性が考えられる。しかし現在のところ、時計遺伝子と運動との関係については解明されておらず、不明である。

最近、唾液中においても時計遺伝子が見出された。唾液は、非侵襲的かつ簡便に繰り返し採取が可能であり、スポーツ現場に適した生体試料であると言える。これまで申請者は、ウイルスや細菌の粘膜下への侵入を防ぐ役割があり、感染症の初期防御に大きく働く唾液中の分泌型免疫グロブリン A (SIgA) に着目し、運動応答や疲労との関連を検討してきた²⁻⁷⁾。唾液 SIgA は、高強度の運動で一時的に低下し、継続的な高強度運動により安静時においても慢性的に低下状態となる。このような唾液 SIgA の特徴から、唾液 SIgA は簡易的な疲労や免疫機能の評価指標として用いられてきた。時計遺伝子は、疲労発生のメカニズムにおいて上流で関わるため、より正確な疲労の評価を実現できる可能性がある。しかし、唾液中の時計遺伝子を用いて、アスリートの疲労や概日リズムの評価を試みた研究はこれまで無く、その有用性については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、唾液中の時計遺伝子由来のタンパクの疲労・概日リズムの評価指標としての有用性を明らかにするため、一過性の高強度運動に対する時計タンパクの応答（課題1）および継続的な高強度運動が時計タンパクに及ぼす影響（課題2）について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 一過性の高強度運動に対する時計タンパクの応答（課題1）

運動習慣のない健康な男性7名（23.9 \pm 1.2歳）を対象とした。本実験の1週間以上前に最大酸素摂取量の測定を行った。本実験ではクロスオーバー法を用いて、運動あり（Exercise 実験：自転車運動、75%VO_{2max}、60分）、運動なし（Rest 実験：座位安静を60分）の2実験をランダムに行った。運動実施前（7:00AM）、運動終了直後（8:00AM）、運動終了1時間後（9:00AM）、運動終了2時間後（10:00AM）、運動終了3時間後（11:00PM）において測定を行った。唾液採取の方法は、先行研究⁵⁾の方法を用いて実施した。時計タンパクである BMAL1 および PER1 の濃度は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Cloud-Clone Corp., USA) を用いて測定

した。唾液中の総タンパク (Total protein: TP) 濃度は測定キット (Pierce 660 nm Protein Assay Kit, Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA) を用いて測定した。BMAL1 および PER1 濃度について 2 分間あたりの唾液分泌量 (ml/2min) で補正し, BMAL1 および PER1 分泌量 (um/2min) として示した。また, BMAL1 および PER1 濃度を TP 濃度で除した補正值として BMAL1/TP および PER1/TP についても示した。さらに, BMAL1 濃度を PER1 濃度で除して BMAL1/PER1 比を示した。また, BMAL1 および PER1 について, それぞれの変化率を比にした % Δ BMAL1/% Δ PER1 比についても示した。主観的な疲労感を把握するために, Visual Analog Scale (VAS) を用いて, 疲労感について調べた。各測定値は, 平均値 \pm 標準誤差で示した。分析は, 繰り返しのある二元配置分散分析を行った。多重比較検定は, Tukey-Kramer 検定を行った。有意水準は 5% 未満とした。

3-2. 継続的な高強度運動が時計タンパクに及ぼす影響 (課題 2)

大学体育会男子ラグビー部に所属するアスリート 25 名を対象とした (20.2 \pm 0.3 歳)。合宿開始前 (0w), 開始 6 週間後 (6w), 7 週間後 (7w) の朝 (6:00-7:00) に測定を行った。なお, 合宿は開始 6 週間は練習合宿期間であり, それ以後 7 週間後までの 1 週間は試合合宿期間であった。唾液採取の方法は 課題 1 の方法と同様であった。得られた唾液より PER1 および BMAL1, SIgA について 課題 1 と同様に ELISA 法 (BMAL1 は 課題 2 実施時にキットの仕様に変更され, 課題 1 とは異なり高感度のキットを使用) を用いて濃度を測定し, 1 分間あたりの唾液分泌量 (ml/min) を用いて補正し, それぞれ分泌量として示した。各測定値は, 平均値 \pm 標準誤差で示した。分析は, 繰り返しのある二元配置分散分析を行った。多重比較検定は, Tukey-Kramer 検定を行った。有意水準は 5% 未満とした。

4. 研究成果

4-1. 一過性的高強度運動に対する時計タンパクの応答 (課題 1)

Exercise 実験の唾液分泌量は, pre に比べて post において有意に低下し ($p < 0.05$), Rest 実験では有意な変動は認められなかった (表 1)。Exercise 実験の唾液 BMAL1 濃度は pre に比べて post において有意に増加し, post と比べ post 1h および post 3h において低値を示した ($p < 0.05$)。Rest 実験の唾液 BMAL1 濃度については, 有意な変動は認めら

表 1: 唾液関連指標の変動

		pre	post	post 1h	post 2h	post 3h	p value
Saliva flow rate (ml/2min)	Exercise	3.32 \pm 0.69	2.04 \pm 0.51*	2.84 \pm 0.63	2.90 \pm 0.64	2.85 \pm 0.65	< 0.05
	Rset	2.95 \pm 0.75	2.96 \pm 0.74	3.30 \pm 0.77	3.02 \pm 0.67	2.89 \pm 0.66	0.39
Total protein concentration (ug/mL)	Exercise	252 \pm 33	502 \pm 99 *	293 \pm 33 †	300 \pm 32 †	284 \pm 28 †	< 0.05
	Rset	223 \pm 23	222 \pm 19	228 \pm 26	232 \pm 25	230 \pm 29	0.97
BMAL1 concentration (ng/mL)	Exercise	3.61 \pm 1.04	9.17 \pm 2.00 *	4.80 \pm 1.66 #	6.88 \pm 1.81	5.17 \pm 1.05 †	< 0.05
	Rset	4.04 \pm 2.22	6.33 \pm 2.00	5.42 \pm 1.59	6.99 \pm 2.28	6.05 \pm 1.85	0.09
BMAL1 secretion (ng/2min)	Exercise	9.37 \pm 1.81	13.29 \pm 2.73	8.57 \pm 1.28	14.04 \pm 2.73	9.92 \pm 4.93	0.17
	Rset	5.91 \pm 2.86	11.95 \pm 2.72	11.52 \pm 2.58	13.35 \pm 2.85	12.68 \pm 3.60	0.23
PER1 concentration (ng/mL)	Exercise	18.6 \pm 4.3	29.0 \pm 4.6 *	20.9 \pm 3.9 †	23.2 \pm 3.3	22.8 \pm 3.8	< 0.05
	Rset	17.0 \pm 3.8	23.2 \pm 2.9	21.4 \pm 3.8	20.7 \pm 3.4	20.9 \pm 3.6	0.27
PER1 secretion (ng/2min)	Exercise	54.0 \pm 12.0	47.9 \pm 9.2	51.9 \pm 15.8	57.4 \pm 12.5	55.1 \pm 14.2	0.84
	Rset	36.6 \pm 10.1	58.1 \pm 12.4	58.4 \pm 13.5	51.5 \pm 11.1	53.5 \pm 15.8	0.32
BMAL1/PER1 ratio	Exercise	0.19 \pm 0.03	0.31 \pm 0.06 *	0.20 \pm 0.04	0.28 \pm 0.05	0.21 \pm 0.04	< 0.05
	Rset	0.16 \pm 0.07	0.25 \pm 0.06	0.24 \pm 0.05	0.30 \pm 0.07 *	0.26 \pm 0.06 *	< 0.05
SIgA concentration (ug/mL)	Exercise	23.9 \pm 2.67	27.4 \pm 3.77	22.2 \pm 2.89	24.3 \pm 3.47	22.9 \pm 4.58	0.48
	Rset	26.3 \pm 3.92	28.2 \pm 6.78	22.5 \pm 3.12	21.3 \pm 3.11	20.4 \pm 3.77	0.35
SIgA secretion rate (ug/2min)	Exercise	77.7 \pm 17.3	48.6 \pm 9.4 *	61.1 \pm 15.6	65.9 \pm 15.2	62.6 \pm 17.8	< 0.05
	Rset	71.3 \pm 18.9	79.3 \pm 29.8	63.8 \pm 12.4	55.1 \pm 9.9	48.2 \pm 7.8	0.36

Values are expressed as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. pre; † $p < 0.05$ vs. post.

れなかった (表 1)。唾液 BMAL1 分泌量について, 両実験とも有意な変動は認められなかった (表 1)。Exercise 実験の BMAL1/TP は有意な変動は認められなかったが (図 2), Rest 実験では

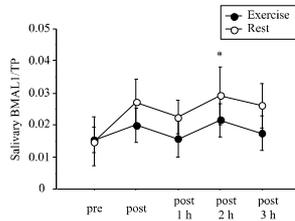


図2: BMAL1/TPの変動
Values are expressed as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. pre; † $p < 0.05$ vs. post.

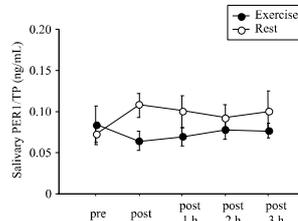


図3: PER1/TPの変動
Values are expressed as mean \pm SE.

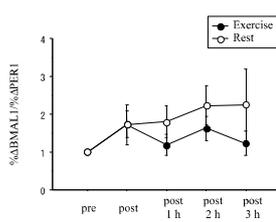


図4: %ΔBMAL1/%ΔPER1比の変動
Values are expressed as mean \pm SE.

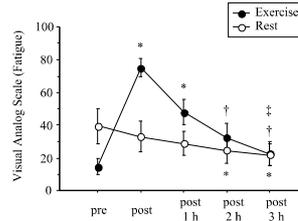


図5: 疲労感の変動
Values are expressed as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. pre; † $p < 0.05$ vs. post; ‡ $p < 0.05$ vs. post1.

pre に比べて post 2h において有意に増加した ($p < 0.05$)。Exercise 実験の唾液 PER1 濃度は, pre に比べて post において有意に増加し, post と比べ post 1h において低値を示した ($p < 0.05$) (表 1)。Rest 実験の唾液 PER1 濃度については, 有意な変動は認められなかった。唾液 PER1 分泌量について, 両実験とも有意な変動は認められなかった (表 1)。PER1/TP について, 両実験とも有意な変動は認められなかった (図 3)。Exercise 実験の唾液 BMAL1/PER1 比は, pre に比べて post において有意に高値を示した ($p < 0.05$) (表 1)。Rest 実験の Bmal1/Per1 比については, pre に比べて post 2h および post 3h において有意に高値を示した ($p < 0.05$)。%ΔBMAL1/%ΔPER1 比は各群で有意な変動は認められなかった (図 4)。唾液 SIgA 濃度について, 各群において有意な変動は認められなかった。Exercise 実験の唾液 SIgA 分泌量は, pre に比べて post において有意に低値を示し ($p < 0.05$)。Rest 実験においては有意な変動は認められなかった (表 1)。Exercise 実験の疲労感は, pre に比べて post および post 1h において有意な上昇を示し, その後は低下した ($p < 0.05$) (図 5)。Rest 実験の疲労感は, pre に比べて post 2h および post 3h において有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

4-2. 継続的な高強度運動が時計タンパクに及ぼす影響 (課題 2)

表2: 唾液関連指標の変動

	pre	6w	7w	p value
Saliva flow rate (mL/min)	2.46 \pm 0.17	1.53 \pm 0.07 *	1.51 \pm 0.09 *	< 0.05
BMAL1 concentration (pg/mL)	147.6 \pm 18.0	165.2 \pm 42.2	134.8 \pm 23.4	0.67
PER1 concentration (ng/mL)	19.5 \pm 3.3	20.1 \pm 2.8	21.2 \pm 4.6	0.8
BMAL1/PER1 ratio	2.38 \pm 0.93	5.57 \pm 0.67	7.40 \pm 1.03 *	< 0.05
SIgA concentration (cg/mL)	194.1 \pm 19.7	151.4 \pm 21.8	154.8 \pm 14.4	0.05
SIgA secretion rate (cg/min)	441.1 \pm 45.3	209.7 \pm 23.9 *	232.6 \pm 25.5 *	< 0.05

Values are expressed as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. pre.

唾液分泌量は, pre に比べて 6w および 7w において有意に減少した ($p < 0.05$) (表 2)。BMAL1 濃度および PER1 濃度は有意な変動は認められなかった (表 2)。唾液 BMAL1 分泌量は pre に比べて 6w および 7w において有意に減少した ($p < 0.05$) (図 6) 唾液 PER1 分泌量は pre に比べて 6w において有意に減少した ($p < 0.05$) (図 7)。

考察

本研究では, 課題 1 において一過性的高強度運動により, 唾液中の BMAL1 の時間経過による上昇が抑制された。Okamoto

et al.²⁾によると, 激しい運動の実施は時計遺伝子の経時的変動を遅らせる可能性を示している。Okamoto et al.²⁾においては, PER3 や Nrd1, Nrd2 の運動応答を検討しており, 本研究の指標とは

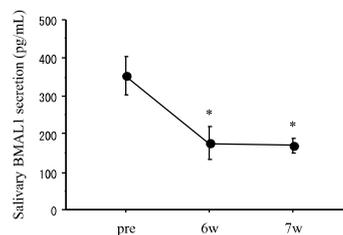


図6: BMAL1分泌量の変動
Values are expressed as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. pre.

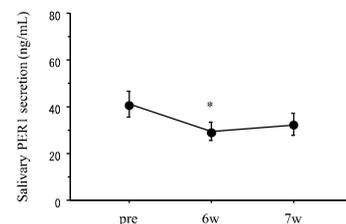


図7: PER1分泌量の変動
Values are expressed as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. pre.

異なるが、本研究でも運動終了3時間以降に BMAL1 の上昇が認められた可能性が考えられる。何れにせよ、唾液中の BMAL1 は運動に应答することが明らかとなった。課題2では継続的な高強度運動による時計タンパクへの影響を検討した。その結果、BMAL1 および PER1 は同時間帯であっても高強度運動を継続すると低値を示すことが明らかとなった。課題1では一過性の高強度運動で BMAL1 は減少はしなかったが、時間経過による上昇が抑制され、PER1 への運動の影響は認められなかった。しかし高強度運動を継続することで BMAL1 および PER1 の両者に影響し、発現が抑制されてしまう可能性が示された。また、課題2では合宿開始から6週目までは練習中心の合宿、7週目は試合中心の合宿であり、6wまでは7wより運動強度が高く実施時間も長かった。PER1 が7wに回復傾向が認められ、BMAL1 は7wも低下したままであった。課題1において一過性の高強度運動に対して BMAL1 は应答し、PER1 は应答を示さなかった。従って BMAL1 は PER1 に比べて運動による影響を受けやすい可能性が考えられる。

BMAL/CLOCK 複合体の活性・抑制のフィードバック機構は24時間周期で行われ、生体時計の概日リズムが形成されている。そこで本研究では、複合体の活性に関わる BMAL1 と抑制に関わる PER1 について BMAL1/PER1 比とし、両者のバランスを観察することで、概日リズムについての評価を行った。課題1における BMAL1/PER1 比は、顕著な変動は示さなかったが、Rest 実験では徐々に上昇するような動きの中で、Exercise 実験では横ばいの状態であった。従って、本結果によっても高強度運動は時計タンパクが形成する概日リズムを乱す可能性が考えられた。また、課題2において BMAL1/PER1 比は高強度運動が継続されるに従い、上昇傾向がみられ、BMAL1 および PER1 が形成する概日リズムの高強度運動による乱れは運動の継続に伴い慢性化する可能性が示された。

唾液中の時計タンパクは唾液腺に発現する時計遺伝子の動態を反映すると考えられており、唾液腺における生物時計制御の動態を評価できる可能性がある⁶⁾。唾液中には、口腔内免疫に関わる SIgA やディフェンシン等の抗ウイルス・抗菌タンパクが含まれており、時計遺伝子はこれらのタンパクの分泌動態にも影響する可能性がある。唾液中の時計タンパクの動態を検討することは口腔内免疫のメカニズムの解明にも貢献できる学術的意義の高い課題である。唾液は非侵襲的かつ簡便に採取が可能であり、スポーツ現場において活用しやすい生体試料である。近年、SIgA やコルチゾール等の唾液中のタンパクの簡易測定キットが開発されている。時計タンパクについても同様の方法で簡易測定が可能となるため、スポーツ現場における実用化も近い将来実現できる可能性がある。そのためにも唾液中の時計タンパクのコンディション評価の有用性についてさらなる検討を進める必要がある。

参考文献

- 1) Cavadini G. et al. TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 12843-12848, 2007.
- 2) Okamoto A. et al. An out-lab trial: a case example for the effect of intensive exercise on rhythms of human clock gene expression. *J. Circadian Rhythms.* 11: 10, 2013.
- 3) Reppert SM. and Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 418: 935-941, 2002.
- 4) Schibler U. and Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell.* 111: 919-922, 2002.
- 5) Shimizu K. et al. Mucosal immune function comparison between amenorrheic and eumenorrheic distance runners. *J. Strength Cond. Res.* 26: 1402-1406, 2012.
- 6) Zheng L. et al. Clock genes show circadian rhythms in salivary glands. *J. Dent. Res.* 91: 783-788, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiraoka H, Hanaoka Y, Jesmin S, Kimura F, Matsuish, Shimizu K, Watanabe K	4. 巻 11
2. 論文標題 Variation of Salivary IgA During Weight Loss Period Before a Competition Among University Judo Players	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine Research	6. 最初と最後の頁 798-806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14740/jocmr3998	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平岡拓晃, 花岡裕吉, 清水和弘, 木村文律, 鈴木なつ未, 小野卓志, 目崎 登, 渡部厚一
2. 発表標題 交代浴が合宿期間中の大学柔道選手のコンディションに及ぼす影響
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水和弘, 花岡裕吉, 平岡拓晃, 渡部厚一
2. 発表標題 免疫学的指標を用いた柔道の減量時におけるコンディション評価
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 清水和弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 NSCAジャパン	5. 総ページ数 6
3. 書名 Strength & Conditioning Journal	

1. 著者名 清水和弘	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 medicina	

1. 著者名 清水和弘	4. 発行年 2017年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床スポーツ医学	

〔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
研究協力者	花岡 裕吉 (Hanaoka Yukichi)		
研究協力者	平岡 拓晃 (Hiraoka Hiroaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------