

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11684

研究課題名(和文) 睡眠障害や食リズムの乱れに伴う生活習慣病の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of the lifestyle-related diseases by sleep disorders and inappropriate meal rhythms

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いた実験により、慢性的な朝食欠食が、活動期における深部体温リズムや睡眠脳波をかく乱し、認知機能を低下させることを明らかにした。独自に開発した慢性的なストレス性睡眠障害モデルマウスにおいて、認知機能の低下や不安様行動の増加を示すとともに、ナチュラルココアの摂取が睡眠覚醒リズムや活動リズムの乱れを抑制する可能性を明らかにした。また、本モデルマウスを用いて、唾液中のmiRNAが、睡眠障害の未病マーカーとなり得る可能性を示した。魚油に含まれるDHAやEPAによる脂質代謝改善効果とその至適摂取のタイミングについてヒト試験を行い、朝食時の魚油の摂取が有効であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

朝食欠食と学業成績との関連は児童・生徒を対象として多くの報告があったが、動物モデルを使うことによって生物学的にそのメカニズムを明らかにすることができた。我々が開発した睡眠障害モデルマウスが、睡眠障害性の神経行動障害のモデル動物となり得ることを示すと同時に、ココアの睡眠障害改善効果を明らかにすることで、本モデル動物が、睡眠改善食品の探索に有用であることを示すことができた。ヒト試験により、魚油の脂質代謝改善効果が、朝食時の摂取と夕食時の摂取で異なることを明らかにし、食品の機能性が摂取のタイミングで異なるという時間栄養学的な考え方を社会に広めるためのきっかけとすることができた。

研究成果の概要(英文)：Experiments using mice revealed that chronic skipping breakfast disrupts core body temperature rhythms and sleep electroencephalograms during the active period, which resulted in the reduction of cognitive function. A proprietary mouse model of chronic stress-induced sleep disorder showed decreased cognitive function and increased anxiety-like behavior, and clarified the possibility that natural cocoa intake suppresses disturbances in sleep-wake and activity rhythms. In addition, using this mouse model, we demonstrated the possibility that miRNA in saliva could serve as a pre-symptomatic marker for sleep disorders. A human study was conducted to determine the lipid metabolism-improving effect of DHA and EPA contained in fish oil and the optimal intake timing, and it was clarified that the intake of fish oil at breakfast is effective.

研究分野：時間生物学

キーワード：サーカディアンリズム 体内時計 時間栄養学 睡眠 認知機能 機能性食品 バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満や糖尿病の発症要因としては、従来、過食や運動不足によるエネルギーの摂取と消費のアンバランスが中心にあると考えられてきた。しかしながら、近年は摂取エネルギー量が年々減少している一方で、生活習慣病の患者数は増加しており(平成28年国民健康・栄養調査)、現代社会においてはエネルギー摂取過多以外の要因が生活習慣病の増加に関与している可能性が考えられる。その中で、社会の24時間化や食事時刻の乱れなどによる生活リズムの乱れが、さまざまな生活習慣病の発症要因として注目されている。また、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研究がなされてきた(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の発症リスクとの関連が(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の発症リスクとの関連が(Ayasら、*Arch Intern Med*, 2003)それぞれ明らかとなっている。睡眠時間と糖尿病の発症リスクとの関連も、Spiegelら(*Lancet*, 1999)が世界で初めて報告して以降、多くの報告が蓄積されてきた。これらの疫学的な知見が多く蓄積している一方で、睡眠障害や生体リズムの乱れによる生活習慣病の発症メカニズムについては全く解明されておらず、本研究成果は、生体リズムに関連する様々な生活習慣病の新たな治療戦略や予防法の開発につながるものと期待される。

### 2. 研究の目的

睡眠障害や生体リズムの乱れによる生活習慣病の発症や認知機能の低下などメカニズムを個体レベルで詳細に明らかにするとともに、科学的エビデンスに基づいた時間栄養学的アプローチにより睡眠や代謝を改善するための基盤技術の開発を行う。さらに、我々が独自に開発した睡眠障害モデルマウスを用いて、睡眠障害の未病段階を非侵襲的に早期発見するためのバイオマーカーの探索を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスにおける慢性的な朝食欠食が睡眠脳波や認知機能に与える影響

マウスの活動期(暗期)の前半6時間のみ絶食とする朝食欠食を2週間行い、脳波測定による睡眠覚醒リズムの測定、自発活動及び摂餌のリズムの測定、体内埋め込み式ロガーを用いた深部体温リズムの測定、新奇物体認識テストによる長期記憶に対する影響評価や海馬における認知機能関連遺伝子の発現解析を行った。

#### (2) マウスにおける慢性的な睡眠障害が認知機能や不安情動に与える影響

独自に開発した睡眠障害モデルマウス(Miyazaki *et al.*, *PLoS One* 2013)を用いて、1週間の睡眠障害を負荷した後に、新奇物体認識テストによる長期記憶に対する影響評価やオープンフィールドテストによる不安情動に対する影響評価、海馬における認知機能関連遺伝子の発現解析を行った。

#### (3) ナチュラルココアの摂取がマウスにおける慢性的な睡眠障害に与える影響

独自に開発した睡眠障害モデルマウスを用いて、1ヶ月間の長期睡眠障害を負荷するとともに、ナチュラルココアを混餌にて摂取させた。活動リズムとともに脳波測定による睡眠覚醒リズムの測定と、脳組織における熱ショックタンパク質(HSP)の発現解析を行った。

#### (4) 中鎖トリグリセリドを含むケトン食の摂取がマウスの睡眠や生体リズムに与える影響

一般的なケトン食とは、低糖質・高脂質食を指し、血中ケトン体濃度の上昇とともに、炭水化物やタンパク質の不足による飢餓状態が誘発される。我々は以前、ケトン食の負荷が、マウスにおける時計遺伝子の発現や活動リズムに影響することを報告したが(Oishi *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009)、これらの影響が、ケトン体によるものなのか、飢餓状態による影響なのかを区別することが困難であった。今回我々は、糖質やタンパク質を十分に含んだ状態でケトン体の産生を誘発することができる中鎖トリグリセリドを含むケトン食を開発し(Fujikura *et al.*, *FASEB J* 2021)、マウスに2週間摂取させた後に、睡眠や生体リズムに対する影響について評価を行った。

#### (5) ヒトにおける魚油の摂取のタイミングの違いが脂質代謝改善効果に与える影響

ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)を含んだ魚油は、脂質代謝の改善効果を有することが知られている。我々はこれまで、魚油摂取のタイミングの違いが、マウスにおける脂質代謝改善効果に影響することを明らかにしてきた(Oishi *et al.*, *J Nutr Biochem* 2018)。今回は、同様の効果がヒトでも確認できるかどうか検証を行った。健常者を対象に、DHA・EPAを強化したソーセージまたはプラセボソーセージを朝食時または夕食時に8週間摂取してもらい、血中の脂質代謝関連パラメーターを測定した。

(6) 慢性的な睡眠障害モデルマウスを用いた睡眠障害の非侵襲的バイオマーカーの探索  
睡眠障害を未病段階で早期発見するための非侵襲的バイオマーカーの開発を目指し、独自に開発した睡眠障害モデルマウスから点灯時刻(就眠のタイミング)と消灯時刻(活動開始のタイミング)に唾液を採取した。唾液から抽出した total RNA を用いて cDNA ライブラリーを作製し、miRNA-seq 解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウスにおける慢性的な朝食欠食が睡眠脳波や認知機能に与える影響

朝食欠食の繰り返しは、摂餌量や体重には影響しないものの、活動期前半の深部体温を4日間かけて徐々に低下させ、同様に活動量も減少させた。脳波解析の結果、活動期前半の覚醒時間が有意に減少し、レム睡眠時間やノンレム睡眠時間の延長が認められた。驚くべきことに、朝食欠食により、1日の総覚醒時間の短縮と総ノンレム睡眠時間の延長が認められたことから、朝食欠食が、睡眠の恒常性調節機能にも影響している可能性が考えられた。朝食欠食群の海馬においては、*Camk2a* や *Fkbp5*, *Gadd45b*, *Gria1*, *Sirt1*, *Tet1* といった記憶関連遺伝子の発現量が有意に低下しており、新奇物体認識テストによって、長期記憶形成が低下している可能性が示された。これらの結果から、慢性的な朝食欠食は、深部体温や覚醒レベルを低下させ、海馬における記憶関連遺伝子の発現に影響するとともに、長期記憶の形成を抑制する可能性が考えられる (Okachi *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 2020)。本成果は、第74回日本栄養・食糧学会大会トピック賞を受賞した。

##### (2) マウスにおける慢性的な睡眠障害が認知機能や不安情動に与える影響

新奇物体認識テストおよびオープンフィールドテストにより、慢性的な睡眠障害モデルマウスにおける認知機能の低下と不安様行動の増加が示された。これらの結果は、本睡眠障害モデルマウスが、睡眠障害によって引き起こされる神経行動障害の根本的なメカニズムを研究するのに役立つ可能性を示している。海馬における、学習や記憶、不安やうつ病に関連する遺伝子の mRNA 発現を調べた結果、睡眠障害が、*Crhr1*, *Ngf*, *Phlpp1* の mRNA 発現を増加させ、*Ace*, *Egr2*, *Slc6a4* の mRNA 発現を抑制することが示された。これらの遺伝子の機能を踏まえると、*Crhr1* mRNA の発現増加が精神疾患の発症と関連しているのに対し、他の5つの遺伝子の発現変化は、症状の軽減に向けられているものと推測された。海馬の *Crhr1* 発現の制御は、睡眠障害誘発性の精神障害を媒介する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) -CRH 受容体1シグナル伝達の活性化に部分的に寄与している可能性がある (Sakamoto *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 2020)。

##### (3) ナチュラルココアの摂取がマウスにおける慢性的な睡眠障害に与える影響

実験に用いた睡眠障害モデルマウスは、活動リズムや睡眠覚醒リズムの減衰とともに、1日の総活動量の減少や、過食、耐糖能の低下などを特徴としている。ココア摂取の有無にかかわらず、睡眠障害負荷による過食が認められ、摂餌量や体重に対するココア摂取の影響は認められなかった。一方、活動リズムについては、ストレス性睡眠障害を負荷しない状態においては、まったく影響が認められなかったものの、睡眠障害負荷時においては、ココアの摂取により活動リズムの減衰が有意に抑制され、1日の総活動量の減少も抑制された。脳波測定の結果からは、ココアの摂取が、睡眠障害負荷時において、活動期(暗期)のノンレム睡眠を有意に抑制して覚醒を増加させ、非活動期(明期)の睡眠を増加させることが判明した。ココアの摂取は、通常時においては活動量や活動リズムに影響しないものの、ストレス性睡眠障害を負荷した際には、睡眠障害による活動量の低下を抑制し、活動リズムや睡眠覚醒リズムを維持する効果があるものと期待され、そのメカニズムとして、ココア摂取によって脳内で発現が増加する HSP70 が関与している可能性が考えられた (Oishi *et al.*, *Nutrition* 2020)。

##### (4) 中鎖トリグリセリドを含むケトン食の摂取がマウスの睡眠や生体リズムに与える影響

中鎖トリグリセリドを含むケトン食 (MCT-KD) の摂取は、マウスの血漿  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸レベルを、特に活動期に増加させることが示された。MCT-KD は、体重や血糖値にほとんど影響せず、カロリー摂取量と総活動量をわずかに減少させた。深部体温リズムや、回転かごを用いて測定したフリーラン周期には、群間の差が認められなかった。MCT-KD は、非活動期(明期)のレム睡眠時間を有意に短縮したが、ノンレム睡眠時間や覚醒時間には影響が認められなかった。末梢各組織における時計遺伝子の mRNA 発現を調べた結果、肝臓と精巣周囲脂肪組織において、*Per2* と *Per1* の発現振幅がわずかに増大した他は、MCT-KD による影響は認められなかった。これらの結果は、MCT-KD が概日時計システムに与える影響が限定的であることを示している。以前報告した、一般的なケトン食による活動リズムと時計遺伝子の発現リズムの位相前進 (Oishi *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009) は、ケトン体自体による影響というよりも、低血糖によって引き起こされた可能性が考えられる。本研究は、MCT-KD によるレム睡眠時間の減少を示した最初の報告である (Zhuang *et al.*, *Food Res Int* 2023)。

(5) ヒトにおける魚油の摂取のタイミングの違いが脂質代謝改善効果に与える影響

健康な日本人成人男女 20 名 (20~60 歳) を 2 群に分け、無作為化二重盲検並行群間試験で 8 週間実施した。試験食として、魚油 (DHA 1010 mg, EPA 240 mg/本) もしくは魚油と同量のオリーブ油を添加した魚肉ソーセージを用いた。朝食に魚油含有魚肉ソーセージ (朝摂取群) またはプラセボ魚肉ソーセージ (夕摂取群) を 1 本 (50g) 摂取し、夕食に異なるソーセージを 1 本摂取した。採血は、0, 4, 8 週目に 1 日 2 回、AM と PM に行った。採血の前日夕食と当日朝食は規定食を提供し、採血前の絶食を 8 時間以上確保した。各時点における血中中性脂肪値および血中脂肪酸量の測定を行い評価した。

ヒト臨床試験においても、動物試験 (Oishi *et al.*, *J Nutr Biochem* 2018) と同様の結果が得られた。魚油朝食群は、魚油夕食群と比較して、有意に n-3/n-6 比が上昇し、血中中性脂肪値の低下が認められた。また、血中飽和脂肪酸濃度の低下も確認され、酸化の亢進により中性脂肪の再合成が抑制されたことが示唆された。さらに、末梢血白血球を用いた脂質合成関連遺伝子の発現解析の結果、各群で *SCD1* の発現パターンが異なっていた。*SCD1* は、マウス肝臓においても朝摂取群で発現が抑制されており、*SCD1* を抑制するタイミングが、血中中性脂肪の低減に関連している可能性が考えられた。以上の結果から、魚油による脂質代謝改善は、朝食時に摂取した方が、より効果的であると考えられた (Konishi *et al.*, *Nutrition* 2021)。本成果は、多くのテレビ番組や週刊誌等で報道されるに至った。

(6) 慢性的な睡眠障害モデルマウスを用いた睡眠障害の非侵襲的バイオマーカーの探索

1 週間の睡眠障害を負荷したマウスと対照マウスから、点灯時刻と消灯時刻に唾液を採取し、miRNA の発現解析を行った。二元配置分散分析の結果、342 種類の miRNA の発現に睡眠障害の影響が認められた。睡眠障害または睡眠時間制限によって血中での発現増加が報告されている miR-30c-5p、miR-10a-5p、miR-146b-5p、miR-150-5p、miR-25-3p が、点灯時刻の睡眠障害群の唾液中において増加していた。これらの miRNA は、心血管疾患との関連も報告されており、実際に睡眠障害群においては、血中の脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 濃度が増加していた。今回の結果から、唾液中の miRNA の発現プロファイルは、血中での変動を反映している可能性が考えられ、非侵襲的な睡眠障害のバイオマーカーとなり得る可能性が示された (Yoshida *et al.*, *Stress* 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計31件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Horikawa Kazumasa, Hashimoto Chiaki, Kikuchi Yosuke, Makita Miki, Oishi Katsutaka	4. 巻 103-104
2. 論文標題 Wheat alkylresorcinol increases fecal lipid excretion and suppresses feed efficiency in mice depending on time of supplementation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 111796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nut.2022.111796	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 Yoshida Yuta, Yajima Yuhei, Fujikura Yuri, Zhuang Haotong, Higo-Yamamoto Sayaka, Toyoda Atsushi, Oishi Katsutaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Identification of salivary microRNA profiles in male mouse model of chronic sleep disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stress	6. 最初と最後の頁 21～28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10253890.2022.2156783	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 Zhuang Haotong, Fujikura Yuri, Ohkura Naoki, Higo-Yamamoto Sayaka, Mishima Taiga, Oishi Katsutaka	4. 巻 169
2. 論文標題 A ketogenic diet containing medium-chain triglycerides reduces REM sleep duration without significant influence on mouse circadian phenotypes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Research International	6. 最初と最後の頁 112852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodres.2023.112852	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 大石勝隆	4. 巻 52
2. 論文標題 ナチュラルココアによる慢性的な睡眠障害の改善効果	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊ファインケミカル	6. 最初と最後の頁 34～39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Sakamoto K, Higo-Yamamoto S, Egi Y, Miyazaki K, Oishi K.	4. 巻 529
2. 論文標題 Memory dysfunction and anxiety-like behavior in a mouse model of chronic sleep disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 175-179.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.218.	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 Konishi T, Takahashi Y, Shiina Y, Oike H, Oishi K.	4. 巻 90
2. 論文標題 Time-of-day effects of consumption of fish oil-enriched sausages on serum lipid parameters and fatty acid composition in normolipidemic adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, and parallel-group pilot study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 111247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2021.111247.	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 大石 勝隆	4. 巻 21
2. 論文標題 生活習慣病の予防や改善を目指した時間栄養学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oleoscience	6. 最初と最後の頁 121 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/oleoscience.21.121	査読の有無 無
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 Okauchi H, Higo-Yamamoto S, Sowa T, Oike H, Yamamoto S, Wada N, Sakamoto K, Oishi K.	4. 巻 524
2. 論文標題 Chronically skipping breakfast impairs hippocampal memory-related gene expression and memory function accompanied by reduced wakefulness and body temperature in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 129-134.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.077.	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, Okauchi H, Yamamoto S, Higo-Yamamoto S.	4. 巻 75-76
2. 論文標題 Dietary natural cocoa ameliorates disrupted circadian rhythms in locomotor activity and sleep-wake cycles in mice with chronic sleep disorders caused by psychophysiological stress.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrition.	6. 最初と最後の頁 110751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2020.110751.	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 -

[学会発表] 計33件 (うち招待講演 15件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 大石 勝隆
2. 発表標題 時間栄養学と魚油による代謝改善効果
3. 学会等名 第36回水産油脂技術懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石 勝隆
2. 発表標題 体内時計と時間栄養学
3. 学会等名 日本脂質栄養学会第29回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石 勝隆
2. 発表標題 ココアの睡眠障害改善効果
3. 学会等名 第25回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石 勝隆
2. 発表標題 朝食欠食が認知機能に与える影響
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 体内時計と時間栄養学
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 生活習慣病の予防・改善を目指した時間栄養学の可能性
3. 学会等名 第24回日本糖尿病教育・看護学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 Chrono-nutrition studies on sleep and metabolism
3. 学会等名 ICoFF2019/ISNFF2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 大石勝隆
2. 発表標題 非活動期の時間制限給餌による肥満にはレプチン抵抗性が関与する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019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

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