

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21597

研究課題名（和文）時間栄養学に基づくアンチエイジングへの挑戦

研究課題名（英文）Anti-aging challenge based on chrono-nutrition

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Polg mutantという早期老化マウスを用いることで研究を加速し、食餌時刻の制限（TRF）が寿命や老化に効果的かを調べる目的で研究した。しかし、Polg mutantマウスでは、TRFの効果はほぼ何も確認することができなかった。一方でWTマウスでは握力、トレッドミル試験でポジティブな効果が見られている。また、米国の他の研究グループが、WTを用いてTRFを行い、寿命延長効果があると2020年に報告していた。よって、TRFはWTには効果を示す可能性が高いと考え、「Polg mutantマウスではミトコンドリア機能が低下しているため、TRFによる抗老化効果が見られない」と考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Polg mutantという早期老化マウスを用いることで、食餌時刻の制限（TRF）が寿命や老化に効果的である可能性について調べた。すなわちTRFはPolg mutantマウスの寿命を延ばすこと期待した。しかしながら、対照群のワイルドに比較すると、全く効果が見られなかったため、正常なミトコンドリアこそが、抗老化に大事であることが分かった。一般的に抗酸化作用を持つ食品は寿命延長作用があると信じられているが根拠がほとんどなかった。本研究結果から、実際、ミトコンドリア機能が過酸化反応で障害を受けないようにすることが寿命延長に重要であることを社会に示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to accelerate the study by using a premature aging mouse called Polg mutant, and to investigate whether dietary time restricted feeding (TRF) is effective for longevity and aging. However, in Polg mutant mice, almost no effect of TRF could be confirmed. On the other hand, WT mice showed positive effects in grip strength and treadmill tests. In addition, another research group in the United States conducted TRF using WT and reported in 2020 that it had a life-prolonging effect. Therefore, we considered that TRF is likely to have an effect on WT, and considered that "the anti-aging effect of TRF is not observed in Polg mutant mice because mitochondrial function is reduced." The normal function of mitochondria is important for longevity.

研究分野：時間栄養学

キーワード：体内時計 時間制限給餌 ミトコンドリア 老化

1. 研究開始当初の背景

概日時計の乱れは多くの疾患発症、悪化に寄与すること、またその逆で多くの疾患は概日時計を乱し不眠などをもたらすことが明らかになり、疾患と概日時計の乱れは負の連鎖を引き起こす。しかし、概日時計をターゲットにした治療は疾患の根本的な治療にはなり得ず、予防医学、健康科学として、概日時計をいかに健康に保つかという方が概日時計の臨床応用として考えやすい。時間栄養学は、食が概日時計リセットに有効であることから、食のタイミング・内容を考え、いかに概日時計を健康に保つかを考える新しい学問である。申請者は、食餌が末梢臓器の時計遺伝子発現変化を起こすことを2001年に世界に先駆け報告し、さらに食後のインスリン分泌がその作用機序の一部であること、絶食期間の長さがその後の給餌による時計リセット効果に重要であること、時計リセットに効果のある様々な機能性食品成分の探索、腸内細菌叢の関与、などなど時間栄養に関わる研究について報告を行ってきた。また最近では、老齢マウスは光による概日時計応答が減弱しているが、食による応答はしっかりと機能していることを報告した (npj Aging, 2017)。さらに、ハンチントン病モデルマウスに、本申請と同様の規則正しい食生活介入を行った結果、睡眠リズムの改善、主症状である運動機能低下の予防効果が得られたことを、米国の研究者と共に2018年に報告した (Whittaker et al., JBR, 2018)。この食事介入 (8-12時間の規則的な食餌時刻制限) は、肥満、プレ2型糖尿病、高血圧など、様々な疾患に効果的であることが近年報告されている。これらの結果から、老化に対しても規則正しい食生活介入の効果が得られることが期待できると考えた。

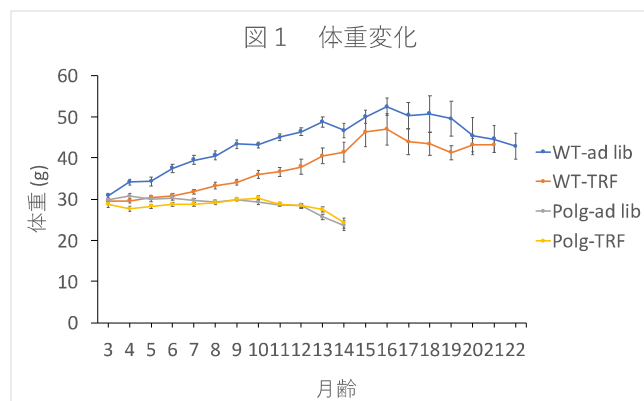
2. 研究の目的

老化促進モデル (Polg mutant) マウスを使うことで、研究スピードを加速しながら、食餌介入が概日時計を改善し、寿命延長や老化に伴う変化を予防できるのか調べることを目的とした。自然老化を研究対象とした場合、申請の研究期間では結論を出すことが難しいと考えた。

3. 研究の方法

Polg mutant マウスは、ミトコンドリア DNA の修復酵素に変異のあるマウスである。マウスの繁殖は Jackson Lab の記載に合わせて、常に WT x Het から生まれた Het マウスを用いて、Het x Het から生まれた WT または Homo のマウスを実験に使用した。尚、Het マウスは先行研究からフェノタイプが弱く、寿命短縮効果も見られていなかったので本研究では使用しなかった。Homo マウスの寿命は、平均 13 ヶ月齢と報告されていた。

実験開始時 3 ヶ月齢の WT、Homo マウスに対して、自由給餌 (ad lib) 群、時間給餌 (Time-restricted feeding; TRF) 群を各ジェノタイプで設定し、合計 4 群で飼育した。TRF は、摂食量の低下が起きない 1 日 12 時間として、暗期 12 時間を毎日の食餌時刻として、自動給餌装置にて飼育した。3 ヶ月齢から実験開始し、現在最初の WT マウスは約 2 年齢になっている (萌芽研究によるサポートは 2 年間であるため、まだ研究が完了していない)。4, 7, 10 ヶ月齢で、睡眠-覚醒リズムを赤外線センサ、または輪回し行動にて計測した。さらに、4, 7, 10, 13, 16, 19 ヶ月齢で、筋力試験を行った。筋力試験は、握力測定、ロータロッド試験、トレッドミル試験の 3 種類を行った。これらの実験計測と共に、生存曲線も記録した。実験は、繁殖によりマウスが確保できた日に合わせて 5 回に分けてスタートした。N 数は、4 群共に N = 9 以上を最終的に確保した。



4. 研究成果

図 1 に実験期間におけるマウスの体重変動を載せた。図から分かる通り、Polg mutant (homo) マウスは 3 ヶ月齢の時点で既に WT マウスよりも低体重を示し、その後しばらく体重を維持するが、12 ヶ月齢付近から体重減少が起きた。WT マウスは徐々に体重が増加し、個体によっては肥満を呈した。次に TRF の効果は、体重に関しては WT にのみ影響を与え、TRF 群で過度な体重増加を抑える結果となった。興味深い事に、WT の 16 ヶ月齢付近から ad lib 群は体重減少傾向が見られたが、TRF 群ではその傾向はなく、21 ヶ月齢の時点で ad lib と TRF は同程度の体重となっている。

次に、睡眠-覚醒リズムについて図 2 に示す。まず、赤外線センサ、輪回し活動どちらの計測においても、WT と mutant で 10 ヶ月齢にて差が見られ、mutant で活動量の低下が起き

ていた。TRFによる効果は、装置の都合上輪回し行動でのみ計測したが、大きな効果は得られなかった。また、赤外線センサを用いて、行動リズムの概日時計周期についても、恒暗条件下で計測した（フリーラン周期と呼ぶ）。Mutant マウスで周期が長い傾向が見られたが、有意な差を検出するまでには至らなかった。こちらは現在、別のコホートにて10ヶ月齢で再度N数を増やして計測中である。

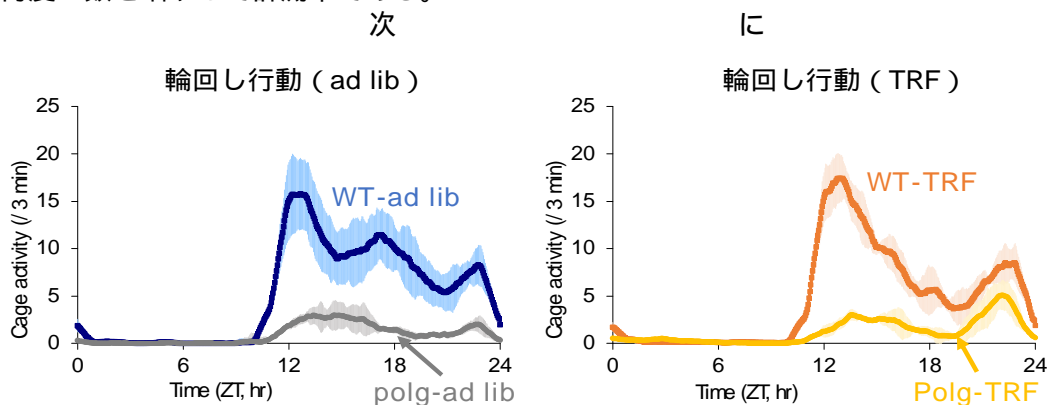
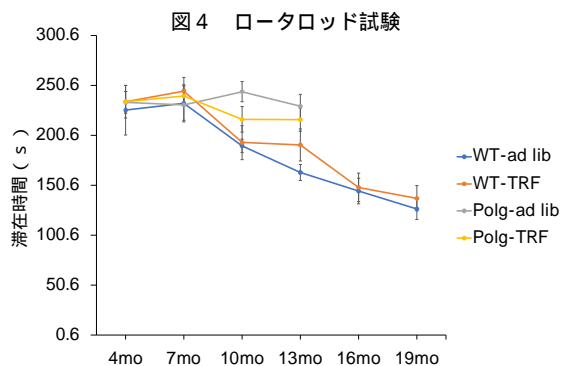
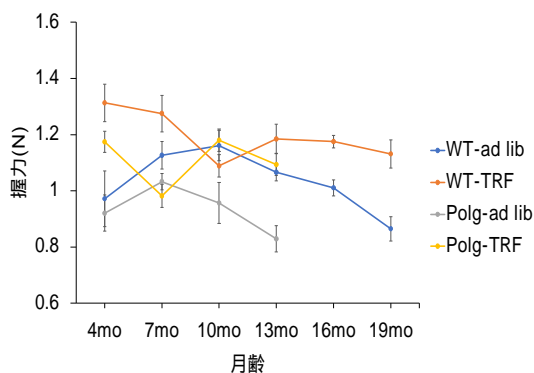


図2 輪回し行動リズム（10ヶ月齢）

筋力試験の結果について図3に示す。握力は、WT, mutantのad lib群で共に年齢と共に低下した。

図3 握力試験



下したが、TRF群ではその低下が見られなかった。特に、WTのTRFにてad lib群と差が見られた。また、WT, mutant間の差は、ad lib同士を比較すると、10, 13ヶ月齢にて差が見られ、mutantで筋力低下が起きていることが分かった。一方でロータロッド試験では（図4）回転ロッドの滞在時間が長いほど運動機能が高いことを示すが、こちらはad lib, TRF関わらず、mutantの方がWTよりも滞在時間が長い結果となった。これは、WTにて体重増加が大きく、肥満傾向であったため、ロッドに滞在することが困難になったからだと考えた。よって、この試験は体重に左右されるので運動機能の評価には今回は適さなかったと判断した。トレッドミル試験では（図5）走る速度を1分おきに早くすることで、体力や運動機能によって走るのをリタイアするまでの時間を評価した。結果、WTに比べmutantでは、10, 13ヶ月齢にてリタイアまでの時間が有意に低下した。一方で、TRFの効果はWTのみ見られ、13, 16ヶ月齢にて有意にTRF群で長く走ることができた。よってまとめると、TRFの効果は、握力試験、ロータロッド試験で、WTのみに見られたことになる。

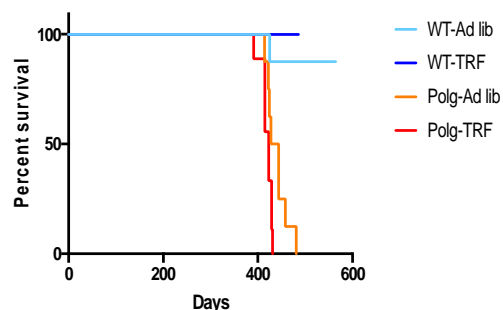
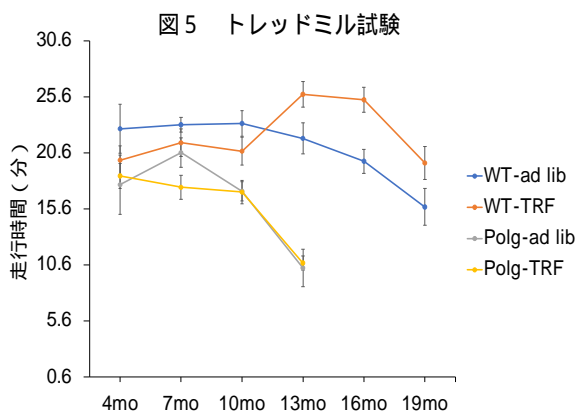


図6 生存曲線

最後に、生存曲線を図6に示す。まだWTマウスは実験途中であり、生存率を評価できないが、mutantマウスは13ヶ月齢付近で全てのマウスが死んでしまった。統計上有意ではないが(Log-rank (Mantel-Cox) test, $p = 0.052$) TRF群の方がad lib群よりも早く死んでしまっていた。よって、TRFはPolg mutantマウスには寿命延長効果という点において、効果を示さなかったことになる。

本研究では、Polg mutantという早期老化マウスを用いることで研究を加速し、食餌時刻の制限が寿命や老化に効果的かを調べる目的で研究をスタートさせた。しかし、Polg mutantマウスでは、研究成果に述べたようにTRFの効果はほぼ何も確認することができなかった。一方でWTマウスでは握力、トレッドミル試験でポジティブな効果が見られている。また、米国の他の研究グループが、WTを用いてTRFを行い、寿命延長効果があると2020年の時間生物学会にて報告していた。よって、TRFはWTには効果を示す可能性が高いと考え、Polg mutantマウスではTRFの効果が見られない、つまり発想を転換し、「Polg mutantマウスではミトコンドリア機能が低下しているため、TRFによる抗老化効果が見られない」、「TRFによる抗老化効果はPolgが関わるミトコンドリア機能へ作用することが必要」という研究結果と結論つけることができた。現在、この仮説を証明するために、WTマウスでしっかりとTRFの効果が見られるのか実験を継続している。また、3-6ヶ月齢にてad libまたはTRFを行った後に、肝臓等の臓器を摘出し、RNA-seqにてmRNA発現解析を行っている。これらの実験から、Polg mutantではどうしてTRFの効果が見られなかったのか、その原因を調べられると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Masaki, Ozaki Mamiho, Miyashita Masashi, Fukazawa Mayuko, Nakaoka Takashi, Wakisaka Takuya, Matsui Yuji, Hibi Masanobu, Osaki Noriko, Shibata Shigenobu	4. 巻 73
2. 論文標題 Effects of timing of acute catechin-rich green tea ingestion on postprandial glucose metabolism in healthy men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108221 ~ 108221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2019.108221	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 Tateishi Norifumi, Morita Satoshi, Yamazaki Izumi, Okumura Hitoshi, Kominami Masaru, Akazawa Sota, Funaki Ayuta, Tomimori Namino, Rogi Tomohiro, Shibata Hiroshi, Shibata Shigenobu	4. 巻 50
2. 論文標題 Administration timing and duration-dependent effects of sesamin isomers on lipid metabolism in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07420528.2019.1700998	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 Haraguchi Atsushi, Nishimura Yutaro, Fukuzawa Miyabi, Kikuchi Yosuke, Tahara Yu, Shibata Shigenobu	4. 巻 38
2. 論文標題 Use of a social jetlag-mimicking mouse model to determine the effects of a two-day delayed light- and/or feeding-shift on central and peripheral clock rhythms plus cognitive functioning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 426 ~ 442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07420528.2020.1858850	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 Komada Yoko, Sato Makoto, Ikeda Yuko, Kami Azusa, Masuda Chika, Shibata Shigenobu	4. 巻 18
2. 論文標題 The Relationship between the Lunar Phase, Menstrual Cycle Onset and Subjective Sleep Quality among Women of Reproductive Age	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 3245 ~ 3245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph18063245	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 Teoh Ai Ni, Kaur Satvinder, Mohd Shukri Nurul Husna, Shafie Siti Raihanah, Ahmad Bustami Normina, Takahashi Masaki, Lim Pei Jean, Shibata Shigenobu	4. 巻 40
2. 論文標題 Psychological state during pregnancy is associated with sleep quality: preliminary findings from MY-CARE cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2021.1902338	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 該当する

1. 著者名 Mineshita Yui, Kim Hyeon-Ki, Chijiki Hanako, Nanba Takuya, Shinto Takae, Furuhashi Shota, Oneda Satoshi, Kuwahara Mai, Suwama Anzu, Shibata Shigenobu	4. 巻 21
2. 論文標題 Screen time duration and timing: effects on obesity, physical activity, dry eyes, and learning ability in elementary school children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Public Health	6. 最初と最後の頁 422-427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12889-021-10484-7	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 Akter Salina, Uddin Kazi Rasel, Sasaki Hiroyuki, Shibata Shigenobu	4. 巻 11
2. 論文標題 Gamma Oryzanol Alleviates High-Fat Diet-Induced Anxiety-Like Behaviors Through Downregulation of Dopamine and Inflammation in the Amygdala of Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.00330	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柴田重信
2. 発表標題 時間栄養学の基礎と応用
3. 学会等名 第14回 ファンクショナルフード学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田重信
2. 発表標題 時間栄養学に沿った健康づくり
3. 学会等名 東御市健康づくり講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田重信
2. 発表標題 体内時計、時計遺伝子、栄養学でわかった 睡眠・健康・食事の関係
3. 学会等名 スリープテックEXP02019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田重信
2. 発表標題 「時間栄養学からみえるもの」
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム26（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 柴田重信
2. 発表標題 「糖尿病治療に対する時間栄養の応用」
3. 学会等名 第54回 糖尿病学の進歩 特別企画（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

柴田重信の研究室
<https://www.waseda-shibatas.com/>

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
研究分担者	田原 優 (Yu Tahara) (80707399)	早稲田大学・理工学術院・准教授(任期付) (32689)	

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			
マレーシア	UCSI university			
バングラデシュ	Jahangirnagar university			