

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23680074

研究課題名(和文)食品成分の生体内有効性を制御する概日リズム因子のデータベース構築とその応用

研究課題名(英文) Database about circadian system regulating bioavailability of food factors, and their applications.

研究代表者

榊原 啓之 (Sakakibara, Hiroyuki)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20403701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,100,000円

研究成果の概要(和文)：食品成分が体内で機能を発揮する過程に関与している様々な因子が刻んでいる日周リズムについて、文献学的かつマウスを用いた動物試験により追跡し、そのデータベースを構築した。次に、体内で刻まれている様々なリズムが、光暴露や単独隔離ストレスのような外的因子によって影響を受ける可能性を得た。さらに、アントシアニン等の食事成分の体内への吸収パターンが摂取時刻によって異なることを示した。

研究成果の概要(英文)：Circadian profiles, for example typical clock genes such as Bmal1, Clock and Cry, and transporter genes such as Sglt1, Pept1 and Mdr1, existing in the liver and small intestine were analyzed in mice. Following, database about circadian system regulating bioavailability of food factors were summarized. These circadian system including clock genes was affected by the environmental factors, for example nocturnal light and isolation stress exposure into mice. Furthermore, the effects of consumption timing at active- or inactive-phase on bioavailability of bilberry anthocyanins were evaluated. Their gastric emptying rate was significantly faster upon administration at the active-phase than that of the inactive-phase. Their amounts appeared in the plasma suggested also different time-dependent property, implying that the intensity of beneficial effects of anthocyanins might be different in the alimentary canal and/or physiological environment according to their consumption timing.

研究分野：時間機能性食品学

キーワード：体内時計 機能性成分 概日リズム 生体内有効性 マウス 脂質代謝 アントシアニン

1. 研究開始当初の背景

ヒトや実験動物をはじめとする生物の体内では、多くの生体機能、例えば、睡眠/覚醒、神経活動、ホルモン分泌、体温、酵素活性に約 24 時間周期のリズム(概日リズム)が認められている。ところが、夜行性であるマウスなどの実験動物を用いた多くの食品成分の有効性評価(*in vivo* 試験)は、生体の概日リズムを考慮に入れて実施されてこなかった。

2. 研究の目的

上述のような背景から、*in vivo* 試験で得られる食品成分の機能性を見誤らない為にも、我々が食品を摂取する活動期、つまりげっ歯類にとっての暗期にも休眠期と同様に食品成分の機能性評価試験を実施していく必要性があると考えた。そこで本研究では、機能性食品研究の新展開の足場作りをエンドポイントとして、様々な生体因子、特に食品成分の吸収・代謝に関与している酵素群(活性)の概日リズムによって、摂取した食品成分の生体内有効性がどのように制御されているのかを明らかにし、その制御機構のデータベースを構築するとともに、概日リズムを調節できる食品成分を探索した。

3. 研究の方法

本研究で実施した動物試験は、静岡県立大学動物実験指針ないしは宮崎大学動物実験指針に従って実施した。

(1) 概日リズムのデータベース作成

摂取した食品成分が生体内で機能を発揮する過程に関与している様々な因子が刻んでいる概日リズムについて、文献学的に調査した。

次に、吸収・代謝を司っている機構を中心に、実際にマウスを用いた試験系により確認した。具体的には、C57BL/6 マウス(8 週齢)を用い、6 時間間隔で ZT6、12、18、24、6* に解剖に処し、採取した肝臓および消化管粘膜細胞中の吸収・代謝に係る遺伝子の発現パターンをリアルタイム PCR 法を用いて解析するとともに、血中のトリグリセリドやコレステロールなどの脂質量、コルチコステロンやプラスミノゲンアクチベーター-1 (PAI-1) 等の酵素量を測定した。また、解剖前には日内の食事パターンを追跡した。

* ZT: Zeitgeber time の略。本研究では、12 時間の明暗サイクルに調節した室内において、明期の開始時刻を ZT0 として表示している。

(2) 外的因子が時計遺伝子に与える影響

副腎を摘出した C3H マウスに対して、ZT14 に光照射をおこなった。その後、継時的に採取した肝臓中の時計遺伝子や PAI-1 遺伝子の発現量を測定した。また、血中のコルチコステロンや PAI-1 量についても継時的に測定した。

C57BL/6 マウスを用い、社会的単独隔離ストレスの負荷が、時計遺伝子やストレスマーカーであるコルチコステロンの分泌量に及ぼす影響を経時的に測定した。

(3) 摂取時刻が生体内有効性に及ぼす影響

C57BL/6 マウスを用い、12 時間の絶食後の ZT0 ないしは ZT12 に等量(100 mg/kg 体重)のビルベリーアントシアニンを経口投与した。そして、投与直前、15、30、60、120 分後に胃および回腸内容物中のアントシアニン量を測定することで、胃内通過速度を測定した。次に、血中アントシアニン量を測定することで、摂取時刻の違いによるアントシアニンの生体内への吸収パターンの違いを評価した。

(4) 培養細胞系を用いた食品成分が時計遺伝子に与える影響評価

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用い、培養細胞系で食品成分が時計遺伝子に与える影響を評価した。具体的には、血清を除いた培地で 12 時間培養した HepG2 細胞に対して、50%の血清入り培地で刺激を与えることで、細胞内で刻まれている時計遺伝子をリセットさせた。その後、生体内に存在する濃度のカフェイン等の食品成分を添加し、時計遺伝子が刻むリズムに対する影響を経時的に測定した。

(5) ヒト試験へ向けた献立開発とその利用

臨床的に食品成分の摂取時刻が機能性に与える影響を評価するときに重要となる食事献立を管理栄養士とともに開発した。具体的には、代表的な機能性成分であるフラボノイドをほとんど含まないが、日本人の食事摂取基準を満たした献立 2 日分を作成し、その献立中にフラボノイドが含まれていないことを HPLC 法により確認した。さらに、開発した献立を用いて、フラボノイド(被験成分はアントシアニンを選定)の吸収量を調べる臨床試験を実施、その有効性を確認した。

4. 研究成果

(1) 概日リズムのデータベース作成

既報を網羅的に調査し作成した食品成分が生体内で機能を発揮する過程に関与している様々な因子が刻んでいる概日リズムのデータベースを雑誌論文とで報告した。

図 1 に、マウス消化管粘膜細胞中の時計遺伝子やトランスポーター遺伝子の日周リズムを示す。*Bmal1* や *Per1* のような時計遺伝子が明確な日周リズムを刻んでおり、そのリズムが既報と同様であったことから、本研究で用いた手法で試験を行うことで、体内で刻まれている時計遺伝子のリズムをかく乱することなく臓器採取等の作業が行えることを確認した(雑誌論文)。また新たに、有機カチオントランスポーターおよび有機

アニオントランスポーターも同様にリズムを刻んでいることを見出した。

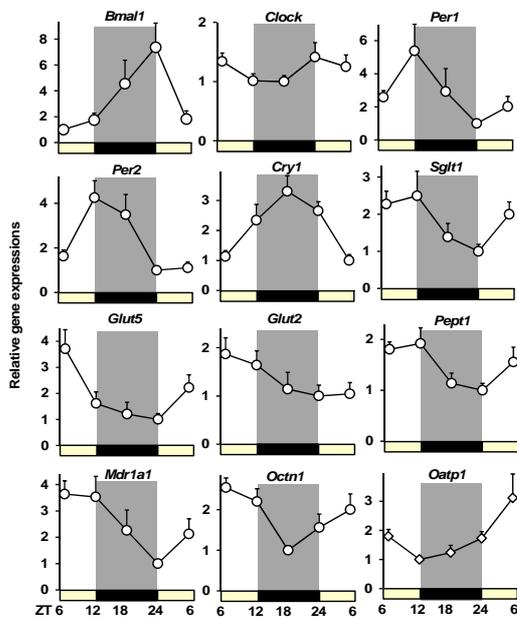


図 2. 小腸粘膜細胞で刻まれている時計遺伝子やトランスポーター遺伝子の日周リズム
 平均値 ± 標準誤差で表示 (n=5). *Bmal1*, brain and muscle ARNT-like protein 1; *Clock*, circadian locomotor output cycles kaput; *Per*, period; *Cry*, cryptochrome; *Sgl11*, sodium-glucose co-transporter 1; *Glut*, glucose transporter; *Pept1*, peptide transporter proton-coupled oligopeptide transporter 1; *Mdr*, multidrug resistance; *Octn1*, organic cation transporter; *Oatp*, organic anion transporting polypeptide.

(2) 外的因子が時計遺伝子に与える影響

体内時計をかく乱する要因の一つに光暴露がある。そこで、マウスに対して暗期に光照射を行ったところ、確かに時計遺伝子の発現が上昇した(図3)。興味深いことに、線溶系因子である *Pai-1* も上昇していたが、この上昇は副腎摘出によって消失したことから、暗期の光暴露は副腎を介して線溶系に作用することを見出した(雑誌論文)。一方、上昇した PAI-1 が睡眠に対して攪乱的に作用する可能性は低いと考えている(雑誌論文)。

グルココルチコイド(マウスの場合、コルチコステロン)は、ストレス負荷時に副腎から分泌が促進されるため、ストレス負荷を示唆するバイオマーカーとして利用されることが多い。その一方で、グルココルチコイドの血中濃度は明確な日周リズムを刻んでいることが知られている。マウスの血中コルチコステロンを継時的に測定したところ、確かに明確な日周リズムを刻んでいた(図4A)。そこで、軽微なストレス(単独隔離ストレス負荷モデル、雑誌論文)を二日間与えた後に、コルチコステロンの日周リズムを測定したところ、同様に明確なリズムは刻まれているが、特に起床直前の濃度が劇的に上昇することを見出した(図4B)。この結果は、単独隔離ストレスのような外的因子は体

内で刻まれている日周リズムに対して影響を及ぼすが、それは評価する時間帯によって異なる可能性を示唆している。

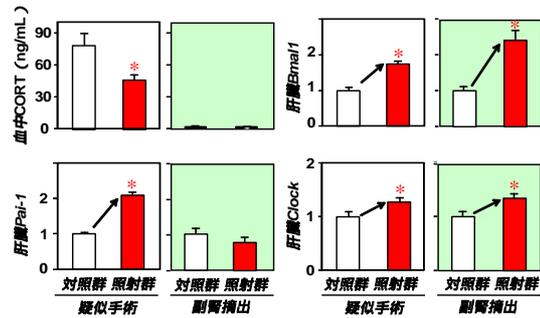


図 3. 暗期の光暴露が線溶系に及ぼす影響
 ZT14 から 1 時間の光照射を行った後、ZT18 に解剖に処した。白色の背景図は疑似手術群、黄緑色の背景図は副腎摘出群を示す。また白抜きの棒グラフは未照射群、赤色の棒グラフは光照射群を示す。平均値 ± 標準誤差で表示 (n=5)。*P<0.05 vs 対照群。

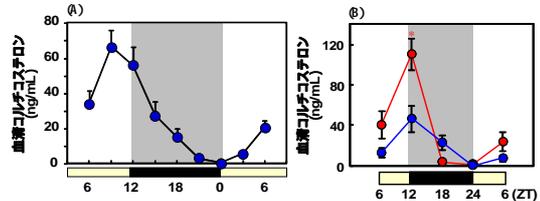


図 4. マウス血中コルチコステロンが刻んでいる日周リズム(A)と 2 日間の単独隔離ストレス負荷がそのリズムに与える影響(B)
 平均値 ± 標準誤差で表示 (n=5)。、ストレス未負荷の対照群；、単独隔離ストレス負荷群。P<0.05 vs 対照群。

(3) 摂取時刻が生体内有効性に及ぼす影響

被験食品成分として、代表的な機能性成分であるアントシアニンを用い、その体内への吸収パターンに与える摂取時刻の影響を評価した。胃内通過速度を測定したところ、活動期に投与した方が速やかに胃から小腸に移動することが分かった(図5-AおよびB)。そして、血中への移行量は、 C_{max} に違いは見られないが、活動期に投与した方が、血中が

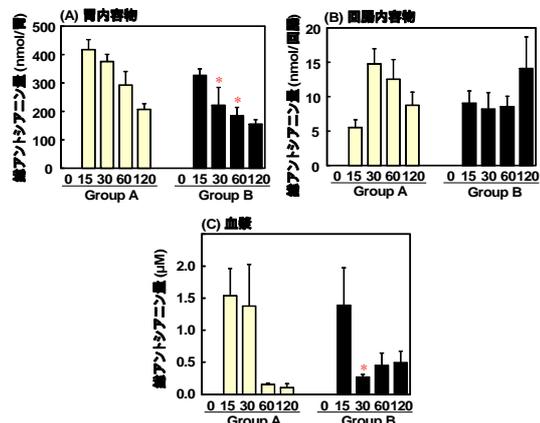


図 5. アントシアニンの体内挙動に与える摂取時刻の影響
 黄色の棒グラフは睡眠期開始時刻 (ZT0) に、黒色の棒グラフは活動期開始時刻 (ZT12) にアントシアニンを投与した。その後、各時間経過後に試料を回収した。平均値 ± 標準誤差で表示 (n=5)。*各時間における明期の値に対する有意差を示す (P<0.05, Fisher's PLSD)

ら速やかに消失する可能性が示された(図5C)(図書)。

その他、消化管で刻まれているペプチドトランスポーターの発現リズムに着目し、乳清タンパク質について同様に摂取時刻の違いが体内への吸収パターンに及ぼす影響を追跡中である。本試験でも同様に、活動期の最初に投与した方が胃内通過速度が速いことを示したが、予想に反して、血中への移行量は活動期の最初に投与した方が有意に低下するとの興味深い知見を得ている。現在、その機序について解析中である。

(4) 培養細胞系を用いた食品成分が時計遺伝子に与える影響評価

HepG2細胞に50%血清ショックを与えることで、BMAL1等の時計遺伝子のリズムをリセットできることを確認した。その後、カフェインやテアニン等の食品成分が時計遺伝子の発現に与える影響を追跡したところ、体内に存在する濃度のテアニンが時計遺伝子の発現に作用する可能性を示すデータを得た。

(5) ヒト試験へ向けた献立開発とその利用

摂取時刻が食品成分の機能性に及ぼす影響を臨床的に調べるときに有効な食事献立を開発した。具体的には、本研究で被験成分として選定したアントシアニン等のフラボノイド類を含まず、かつ日本人の食事摂取基準を満たした献立である(雑誌論文)。さらに開発した献立を用いて、実際に臨床的にアントシアニンの吸収性を評価できることを確認した(雑誌論文)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Sakakibara H., Ichikawa Y., Yajima S., Makino Y., Wakasugi Y., Shimoi K., Kobayashi S., Kumazawa S., Goda T., Practical application of flavonoid-poor menu meals to the study of the bioavailability of bilberry anthocyanins in human subjects, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2014, 78(10), 1748-52 (査読有)。

Aoshima Y., Sakakibara H., Suzuki T., Yamazaki S., Shimoi K., Nocturnal Light Exposure Alters Hepatic Pai-1 Expression by Stimulating the Adrenal Pathway in C3H Mice, *Experimental Animals* 2014, 63(3), 331-8 (査読有)。
榎原啓之、青島良輝、山崎隼輔、下位香代子、栄養素の消化・吸収機構に関与している体内時計、*New Food Industry*, 2013, 55(12), 1-8 (査読無)。

Tsurusaki T., Sakakibara H., Aoshima Y., Yamazaki S., Sakono M., Shimoi K.,

Diurnal rhythmicity in biological processes involved in bioavailability of functional food factors, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2013, 52(3), 208-14 (査読有)。

Sakakibara H., Suzuki A., Kobayashi A., Motoyama K., Matsui A., Sayama K., Kato A., Ohashi N., Akimoto M., Nakayama T., Shimoi K., Social isolation stress induces hepatic hypertrophy in C57BL/6J mice, *Journal of Toxicological Sciences*, 2012, 37(5), 1071-6 (査読有)。

榎原啓之、市川陽子、多島早奈英、牧野尚恵、若杉悠佑、熊澤茂則、佐々木敏、下位香代子、合田敏尚、日本人の食事摂取基準(2005年版)に基づいたフラボノイド低減食の作成方法の提案、*日本栄養・食糧学会誌*、第65巻 第5号、2012、229-35 (査読有)。

榎原啓之、小柳顯陽、青島良輝、鈴木敬明、木村昌由美、下位香代子、外部刺激に対する生体応答を評価するために - 夜行性のマウスを用いた時間生物学的アプローチ -、*谷本学校毒性質問箱*第13号、サイエンティスト社、116-23、2011 (査読無)。

Sakakibara H., Romanowski CPN, Jakubcakova V, Flachskamm C, Shimoi K., and Kimura M., Feeble awake effects of plasminogen activator inhibitor type-1 in mice, *Behavioural Brain Research*, 2011, 220(2), 354-7 (査読有)。

[学会発表](計 22 件)

Sakakibara H., Nara T., Kato K., Sakono M., Effects of Consumption Timing on Gastric Emptying Time and Bioavailability of Whey Protein, *ACN2015, Yokohama*, 2015.5.14-17.

榎原啓之、杉山広、馬場星吾、窄野昌信、雌性 C57BL/6 マウスの血清および肝臓中脂質量の日内変動、*日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学(岡山)* 2015 年 3 月 26-29 日

下位香代子、青島良輝、榎原啓之、単独隔離ストレス負荷は睡眠期の血中コルチコステロン分泌を高める、*日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学(岡山)* 2015 年 3 月 26-29 日

榎原啓之、体内時計が作り出す生体のリズム、第7回日本暖地畜産学会 企画セミナー(畜産学のフロンティア) 2014 年 10 月 26 日、宮崎

榎原啓之、青島良輝、山崎隼輔、下位香代子、単独隔離ストレスが血中コルチコステロンと時計遺伝子のリズムに与える影響、第37回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(福岡)

2014年9月11-13日

内之八重勇光、窄野昌信、榊原啓之、カフェインの新たな機能性の探索、第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会(宮崎)、2014年8月21~23日

津留崎貴史、奈良貴幸、加藤健、窄野昌信、榊原啓之、摂取時刻の違いが乳清タンパク質由来アミノ酸の吸収量に及ぼす影響、2014年度生物機能研究会(大分)、2014年7月12-13日

Sakakibara H., Aoshima Y., Yamazaki S., Tsurusaki T., Sakono M., Shimoi K., Effects of consumption timing on bioavailability of bilberry anthocyanins, ICPH2013, University of Buenos Aires, Argentina, Oct 16-19, 2013.

Sakakibara H., Aoshima Y., Yamazaki S., Shimoi K., Effects of consumption timing on gastric emptying time and bioavailability of bilberry anthocyanins, The 7th ASIAHORCS General Meeting and The 5th ASIAHORCS Joint Symposium, 26-28 November 2013, Nusa Dua, Bali.

Sakakibara H., Effects of diurnal rhythmicity in biological processes on bioavailability of nutrients, 第13回日伊科学技術宮崎国際会議2013 シンポジウム&フォーラム, Miyazaki, Japan, October 11, 2013.

榊原啓之、食品・栄養化学分野における“時間”の概念の重要性、第37回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、雲仙新湯ホテル(長崎)、2013年9月27日

榊原啓之、食べる時間帯によって食品の機能性は異なるのか? ~時間機能性食品学研究の最前線~、第23回西日本食品産業創造展'13、福岡(シンポジウム)、2013年5月16日

榊原啓之、機能性食品研究に携わって17年目の挑戦 - 食品成分と体内リズムのクロノコミュニケーション - , 金沢和樹先生退職記念講演会 - 食品・医薬品研究の最前線, 2013年3月16日(ANAクラウンホテル, 神戸)

津留崎貴史、青島良輝、奈良貴幸、加藤健、窄野昌信、下位香代子、榊原啓之、乳清タンパク質摂取後の血中アミノ酸量に及ぼす摂取時刻の影響、第18回日本フードファクター学会学術集会、東京農業大学世田谷キャンパス(東京)、2013年11月9-10日

榊原啓之、農芸化学領域における時間機能性食品学、平成24年度日本農芸化学会西日本支部会若手シンポジウム「農芸化学で斬り込む新領域」、2012年9月27日、鹿児島(シンポジウム)

青島良輝、榊原啓之、山崎隼輔、鈴木敦美、下位香代子、外界からのストレス刺激がマウス肝臓中時計関連遺伝子の発現に与える影響、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月23-25日、京都

榊原啓之、青島良輝、下位香代子、機能性食品成分と生体イベントのクロノコミュニケーション、シンポジウム「食品の機能性を時間生物学的視点から考える」、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月23-25日、京都(シンポジウム)

青島良輝、榊原啓之、鈴木敬明、山崎隼輔、原のりこ、高林ふみ代、下位香代子、暗期の光曝露が時計遺伝子およびPai-1遺伝子発現に与える影響、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月25-28日、京都

榊原啓之、光と生物リズム、環境科学講座「光と現代社会 ~電波から放射線まで、光利用とその影響についてもっと知ろう、学ぼう、そして考えよう~」、2011年11月9日、B-nest、静岡

青島良輝、榊原啓之、本山径子、鈴木敦美、下位香代子、体内時計はストレスで狂う?、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア2011、2011年12月13日、ふじさんめっせ(静岡)

21 青島良輝、榊原啓之、鈴木敬明、小柳顯陽、山崎隼輔、原のりこ、下位香代子、暗期の光曝露は副腎シグナル系を介して肝臓中のPai-1発現を上昇させる、第18回時間生物学会学術大会、2011年11月24-25日、名古屋大学(愛知)

22 青島良輝、榊原啓之、鈴木敬明、小柳顯陽、山崎隼輔、原のりこ、熊澤茂則、下位香代子、食品成分が発揮する生体内有効性に生体リズムが与える影響、フードサイエンスフォーラム第20回記念学術集会、2011年9月17-18日、コテージヒムカ フェニックスシーガイアリゾート内(宮崎)

〔図書〕(計1件)

Sakakibara H., Aoshima Y., Yamazaki S., Shimoi K., Effects of consumption timing on gastric emptying rate and bioavailability of bilberry anthocyanins, 監修: Siti Nuramaliati Prijono, Andria Augusta, Agus Triyono, Purwanto, Trina Fizzanty, Yopi, Kazuki Kanazawa, dan Zhengqiang Jiang (Ed.), LIPI Press, Jakarta, November 2014, Proceedings ASIAHORCS 2013, pp177-182 (総ページ数435) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 啓之 (SAKAKIBARA, Hiroyuki)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 20403701