

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292069

研究課題名(和文)代謝のキー制御因子としての摂食タイミングの分子作用機序と中枢-末梢時計の同調機構

研究課題名(英文)Eating timing is a key regulator of metabolism

## 研究代表者

小田 裕昭(Oda, Hiroaki)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20204208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：規則正しい食生活は、健康によいとされている。本研究では、摂食タイミングは、代謝のキー制御因子であることを示し、その分子メカニズム明らかにするために以下の実験を行った。3次元ラット初代培養肝細胞を用いた研究より、肝細胞の概日時計維持に微小管が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。摂食リズム崩壊モデルラットに高コレステロール食を与え、血清コレステロール代謝に及ぼす影響について検討した。今回の研究では、夜食症候群モデルに相当する休息期のみ食事を与える方法と、夜摂食と昼摂食を1週間ごと繰り返すプロトコルを用いた。両群で高コレステロール血症を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Regular eating is good for your health. In our study, in order to clarify that eating timing is a key regulator of the metabolism, the following experiment was conducted. In three-dimensional primary cultured rat hepatocytes, microtubules played an important role in the circadian clock oscillation of hepatocytes. Eating rhythm disrupted rats fed a high cholesterol diet were used to see effects on serum cholesterol metabolism. Midnight snack syndrome model and rat model fed night and day every week repeatedly showed hypercholesterolemia.

研究分野：時間栄養学

キーワード：時間栄養学 概日時計 メタボリックシンドローム 肝臓時計

## 1. 研究開始当初の背景

規則正しい食生活は、健康によいとされている。何をどれだけ食べるかは、いまでも重要な課題であるが、どのようなタイミングで「いつ」食べるかなどについて、分子生物学的研究は十分にされていない。一方、時間生物学の進歩により時計遺伝子が発見されて、生物時計の分子生物学は進み、すべての細胞が概日リズムを持つことが明らかとなった。

時計遺伝子の改変動物で代謝異常が示されるようになってきたが、申請者は不規則な摂食タイミングだけで代謝異常が起きることを世界で初めて示した (Circulation Res. 105, 545 (2009))。つまり、正常動物において、同じ食事を同じ量食べていても摂食タイミングの異常がコレステロール代謝を異常にさせることを分子レベルで明らかにした。申請者は不規則な食生活が不健康になることを明らかにしたが、2012 年米国のグループが、「超」規則正しい食生活が高脂肪食による肥満を完全に抑えることを示した。つまり、何をどのくらい食べるかより「いつ」食べるかの方が、代謝制御因子として重要であることを示している。そして、私たちはこの同調メカニズムの一つとして、インスリンが重要であることを突き止めた (Scientific Rep. 2, DOI10.1039/srep00439 (2012))。

国民健康・栄養調査から、エネルギー摂取が減っているにもかかわらず、肥満やメタボリック・シンドロームが増加していることが示され、その原因は食事因子(脂質や糖など)ではないこと推定され、申請者は朝食の欠食など食事のタイミングに注目した。その健康への影響は、十分に理解されておらず、限定的だと考えられてきた。しかし、申請者の研究や米国の研究は、摂食タイミングは、代謝のキー制御因子であることを示し、生活習慣病を予防できる可能性を現実的なものとした。

シフトワーカーなど仕事柄不規則な生活をせざるを得ない人や、社会で活躍している人はどうしても食生活が不規則になってしまう(社会的時差ぼけ)。これは脳中枢時計

末梢肝臓時計が同調しない状況であり、申請者はこの動物モデルを考案した。

## 2. 研究の目的

摂食タイミングにより、代謝の中心的臓器である肝臓時計を介して代謝を正常化させて、健康に結びつけるための分子的基盤を明らかにすることを目指す。特に、代謝のキー制御因子として、代謝異常により起こる動脈硬化症の原因となる脂質代謝異常を改善させる。現代社会では、肝臓時計の乱れだけでなく、脳の中枢時計と末梢時計の不協調が問題として指摘されている。シフトワーカーなど仕事柄不規則な生活をせざるを得ない人(社会的時差ぼけ)には、生活習慣病の罹患率が多い。そのため、中枢時計と末梢時計の同調機構を明らかにすることにより、社会的

時差ぼけによるメタボリック・シンドロームの予防方法を提案することができる。

## 3. 研究の方法

### ラット初代培養肝細胞を用いた肝細胞の概日リズム発振機構の解析

ラット初代培養肝細胞を EHS-gel により 3 次元培養させて、肝細胞の概日リズムを維持させた培養肝細胞を用いる。肝細胞のリズム発振機構に関して、これまでは細胞形態や細胞外マトリクスに注目して研究を行ってきたが、本年度は細胞内の情報伝達に焦点を当てる。まず、細胞骨格タンパク質の影響を重合、脱重合阻害剤を用いて検討する。

コラゲナーゼ還流法により成熟ラットから肝細胞を調製し、EHS-gel 上で培養を行った。培地はウェイマウスを用いて、無ホルモン、無血清で培養を行った。細胞骨格の重合もしくは脱重合を阻害する薬剤(サイトカラシン D、コルヒチン、タキソール、ピンズラスチン、ノコダゾール、IDPN など)を 12 時間処理を行った。肝細胞から全 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法、ノーザン法により mRNA を定量した。このとき正規化用の遺伝子として、アポリポタンパク質 E を用いた。

### 夜食症候群モデル、シフトワーカーモデル動物における、脂質代謝異常

ヒトにおいて夜食症候群と呼ばれる、夜に主に食べる人は肥満など脂質代謝異常が多いことがわかっている。これは、生物時計の観点から見ると、光に制御される脳の時計と、食事に制御される末梢の代謝時計が同調していない状態と見ることができる。また、シフトワーカーはそれを繰り返すような生活をしている。そこで、摂食される時間を休息期(明期、0800-2000)だけにした場合とそれを一週間おきに繰り返す方法を用いた。食事は高コレステロール食とし、84 日飼育した。実験最終日に 4 時間おきに 7 点で解剖を行った。血清脂質を測定し肝臓 RNA を抽出してリアルタイム PCR 法により、mRNA を定量した。

## 4. 研究成果

### ラット初代培養肝細胞を用いた肝細胞の概日リズム発振機構の解析

細胞骨格タンパク質の影響を重合、脱重合阻害剤を用いて検討した。微小管重合阻害剤であるコルヒチン、ピンズラスチン、ノコダゾールを処理すると DBP 遺伝子発現の概日リズムが顕著に抑制された。このことは肝細胞の概日時計維持に微小管が重要な役割を果たしていることを示している。一方パクリタキセルにより微小管の脱重合を阻害すると平面培養した肝細胞の概日リズムが顕著になったことから細胞形態に依存した概日時計は微小管に強く依存していることが明らかとなった。つまり、微小管の動的不安定性が減少して、微小管ネットワークがしっかりしていると細胞時計が維持されやすいこと

を示している。サイトカラシンDによりアクチンフィラメントの重合を阻害したり、IDPNにより中間径フィラメントネットワークを弱くした場合には、細胞時計に変化は見られなかった。このことは、アクチンフィラメントや中間径フィラメントは肝細胞時計の維持に関与していないことを示している。

#### 夜食症候群モデル、シフトワーカーモデル動物における、脂質代謝異常

夜食症候群のモデルとして、活動期に食べさせず、休息期のみ摂食させると、高コレステロール血症を引き起こすことが明らかとなった。このことは、光により制御される脳の時計と食事のタイミングによって制御される肝臓をはじめとする末梢臓器時計の非同調が、脂質代謝異常をもたらしたことを意味している。夜摂食と昼摂食を繰り返す実験群(シフトワーカーモデル)では、休息期の昼摂食時に血清コレステロールが上昇し、活動期の夜摂食で低下することがわかったが、実験期間を通して、活動期の夜摂食群まで下がることなく高い値を維持したままであった。肝臓の遺伝子発現を検討すると、夜食症候群も昼摂食と夜摂食を繰り返す群(シフトワーカーモデル)とともに、脂質代謝関連酵素の遺伝子発現の異常が観察された。しかし Clock, Bmal1, Per1/2, Cry1/2 などのコアの時計遺伝子の発現リズムは、摂食タイミングに合わせて調節されていることがわかった。つまり、摂食タイミングを変化させると、時計遺伝子リズムは比較的すぐに摂食タイミングに合わせて調節されることが確認された。一方、時計遺伝子の影響も受けている脂質代謝の遺伝子発現は摂食タイミングの変化に対応できておらず、異常になってしまうことがわかった。時計遺伝子リズムは、夜食症候群で真逆になるのに対して、脂質代謝遺伝子リズムのピークもしくは谷が真逆になることはなかった。つまり、脂質代謝の遺伝子発現は、肝臓の時計遺伝子による制御以外に神経系もしくは液性因子を介して、脳からの情報を受けて制御されるものと考えられた。さらに、脂質代謝遺伝子リズムの振幅が大きくなっており、脂質代謝の亢進も見られた。この脂質代謝の摂食タイミングへ応答できないことが脂質代謝異常を引き起こす原因になっていることがわかった。一方、シフトワーカーモデルでは、実験期間の最後の1週間は活動期、夜摂食としたため、肝臓のコアの時計遺伝子は完全に正常化していた。時差ぼけなど体内時計の変化は1週間から10日ほどで適応できることが知られており、それを確認することができた。ところが、夜食症候群モデルでも述べたように、脂質代謝酵素の遺伝子発現リズムは、1週間で正常化することはなく、リズムは中間型を示していた。このことは、代謝のリズムの適応には

さらに長い時間が必要であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. 小田裕昭 (2014) 時計遺伝子とメタボリック・シンドローム. 薬剤師会雑誌 66, 567-571. 査読有
2. 小田裕昭 (2014) がんとアミノ酸代謝. 生化学 86, 332-337. 査読有
3. 小田裕昭 (2014) 時計遺伝子と食事のリズム - メタボリックシンドロームにならないために -. 大阪市役所医師会報 130, 12-15. 査読無
4. 小田裕昭 (2015) 時間栄養学とメタボリックシンドローム(1). 全栄協月報 652, 9-25. 査読無
5. 小田裕昭 (2015) 不規則な摂食タイミングが肝臓概日時計異常とコレステロール代謝異常を導く分子メカニズムの解析. オレオサイエンス 15, 61-67. 査読有
6. 小田裕昭 (2015) 時間栄養学とメタボリックシンドローム(2). 全栄協月報 653, 7-28. 査読無
7. Hiroaki Oda (2015) Chrononutrition. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 61, S92-S94 (IF: 0.868, 2013) 査読有

[学会発表](計7件)

1. 小田裕昭, 片岡裕太郎, 小林悟, 望月聡 (2014) 摂食タイミング異常による肝臓概日時計の異常と脂質代謝異常. 日本分子生物学会 2014.11.17 パシフィコ横浜
2. 小田裕昭 (2014) 摂食タイミングが体内時計を制御する分子メカニズム. 第68回日本栄養・食糧学会 シンポジウム「時間栄養学 - 実験動物からヒトへ -」2014.6月.1 酪農学園大学 招待講演
3. 小田裕昭 (2015) 食スタイル(食の5W1H)の時間栄養学: 食はどこに効くのか. 第1回時間栄養科学研究会 シンポジウム「体内時計と食・栄養、食品 運動」2015.2.14 早稲田大学 招待講演
4. Hiroaki Oda (2015) SmartNutriStyle (Eating 5W1H): How regular eating timing regulates liver clock and metabolism. 2015 Asian Congress of Nutrition. 2015.5.16 パシフィコ横浜 招待講演
5. 小田裕昭 (2015) 時計遺伝子と疾患 ~ 食べるタイミングと末梢臓器の時計 ~. 第27回東海心臓リハビリテーション研究会 2015.7.25 名古屋プライムセントラルタワー 招待講演
6. 小田裕昭, 金多恩, 半澤史聡, ローラン・トマ, 池田彩子, 吉田安子, 後藤資実, 有馬寛 (2015) 朝食欠食モデルラットにおける肝臓時計と体温概日リズムの変動. 第22回

日本時間生物学会学術大会 2015.11.21  
東京大学

7. 半澤史聡、松本知大、ローラントマ、梅木美樹、望月聡、池田彩子、小田裕昭 (2016)  
不活動モデルラットにおける脂質代謝異常の統合オミクス解析. 日本農芸化学会 2016年度大会 2016.3.30 札幌コンベンションセンター

〔図書〕(計1件)

1. 「健康栄養学 第2版 -健康科学としての栄養生理化学-」小田裕昭、加藤久典、関泰一郎 編、共立出版(東京)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nutrition2.agr.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 裕昭 (ODA, Hiroaki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：20204208