

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870868

研究課題名(和文) 睡眠不足・喫煙が引き起こす脂質の代謝異常とその検出マーカーの探索

研究課題名(英文) The analysis of lipid metabolism changes by short sleep duration and smoking

研究代表者

宮田 聖子 (MIYATA, Seiko)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：40560917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、睡眠不足および喫煙による脂質代謝の変化および日中の生活機能への影響を検討した。短時間睡眠により、自然睡眠時に比し、認知課題中の脳血流反応が抑制されることが明らかとなった。また、若年者においても喫煙前に比し、喫煙後に動脈硬化指標の一つである血管内皮機能の低下が認められた。質量分析法を用いた脂質分子種の検討では、自然睡眠時と短時間睡眠時、喫煙者と非喫煙者および喫煙前後の比較で、いくつかの分子種が有意に変化していた。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of short sleep duration and smoking on lipid metabolic changes and brain and endothelial function. Three nights of sleep restriction reduced the cortical oxygenation response during cognitive task compared to that in natural sleep. Endothelial function after smoking was significantly impaired than that at rest in young smokers. We identified significant changes of 168, 72 and 39 lipid species between natural sleep and sleep restriction, smokers and non-smokers, and pre- and post-smoking using electrospray ionization mass spectrometry.

研究分野：睡眠医学

キーワード：生活習慣病 脂質 質量分析

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症は、狭心症、心筋梗塞および脳梗塞など心血管病の危険因子であり、生活習慣と強く結び付いていることは良く知られている。近年の研究では、若年者においても成人と同様に運動不足や過食などの生活習慣の悪化により、動脈硬化が進展することが明らかにされている (McMahan et al, Am J Cardiol 2007)。思春期に脂質異常の認められない者であっても、運動不足、肥満や喫煙により中年期以降に脂質異常症を発症しやすくなる。しかし、若年期から中年期にかけて運動不足の解消や禁煙などによる生活習慣を改善できた者では、脂質代謝異常の改善が認められている (Magnussen et al, Arch Pediatr Adolesc Med 2011)。

動脈硬化の発見には、超音波検査による頸動脈内中膜厚、上腕・足首間の血圧や脈波伝搬速度の測定による脈波伝搬速度および心臓足首血管指数が有用である。これらの指標は、心血管病の発症予測に有用であることも報告されている。しかし、若年者 (<40 歳) においては、心血管病の危険因子を有する者とそうでない者との間で、有意な差を示さない (Namekawa et al, BMC Cardiovasc Disord 2011)。これら若年者においては、肥満や喫煙など危険因子を持っているにもかかわらず、通常の健康診断では動脈硬化の危険性を見逃される可能性が高い。これまでの研究では、中年以降の生活習慣病を発症しやすい年代においては血中一酸化窒素やアディポネクチンの有用性は確認されているが、若年者では有用なマーカーは確立されていない。

脂質異常症をはじめとする生活習慣病患者は 30 代から増え続け、その患者数は増加の一途をたどっている。また、近年問題になっている医療費の増加にも生活習慣病患者・予備軍の増加が寄与しており、その予防策は重要な課題となっている。コレステロール、血糖値、血圧などの検査結果に異常が認められるのは中年以降に多く、この年代では社会的地位や長年にわたって確立されたライフスタイルのために、生活指導による病状の改善は難しい。そのため、疾患発症の前段階をとらえるマーカーを同定することは、若年期からの予防・早期発見に有用であると考えられる。

近年、質量分析手法を用いた脂質メタボロームの包括的解析により、正常あるいは疾患モデル動物のサンプルプロファイルを解析し、病態生理に關与する因子を同定しようとする試みがなされている。肥満モデルマウスでは、肥満に先行するかたちで、リン脂質グループの質的・量的バランスの変動がみられ、特定の脂質分子種グループの代謝変動が肥満病態への移行に關与していることが示された (田口, 実験医学 2008)。脂質質量分析

法により、ヒトにおいて動脈硬化が発症する前段階のマーカーをとらえることができれば、動脈硬化・生活習慣病予防において非常に有益である。

### 2. 研究の目的

若年における動脈硬化発症のリスク予測と予防は重要であるが、そのための有益なマーカーは未だ見つかっていない。脂質分子種グループは疾患の発症前より変動している。脂質メタボロームの包括的解析法を用い、睡眠や喫煙など環境因子の変動と脂質分子種の変動とを比較することにより、疾患発症前の脂質代謝の変化をとらえるマーカーを探索することを目的とした。

(1) 血液中脂質と睡眠との関係: 睡眠に障害をきたすと、脂質異常症、高血圧、心血管病や認知機能の低下をもたらす。睡眠時間とその変動をアンケートおよび行動量記録器より調査し、日中の生活機能への影響と血中の脂質分子種の変動を、自然な睡眠時と短時間睡眠時とで比較し、脂質代謝変動をとらえるマーカーを探索した。

(2) 血液中脂質と喫煙との関係: 喫煙は動脈硬化症の危険因子であり、禁煙によりその危険度が低下することはよく知られている。若年では喫煙者であっても、動脈硬化の検査結果には影響が少なくその危険性を認知することは難しい。1 日の喫煙量、喫煙年数を調査し、血中の脂質分子種の変動を、喫煙者と非喫煙者とで比較し、脂質代謝変動をとらえるマーカーを探索した。

### 3. 研究の方法

若年者を対象に、睡眠時間による脂質代謝への影響、喫煙者と非喫煙者における脂質代謝の違い、および喫煙前後での脂質代謝への影響を検討した。ベースライン調査として、全例に次の項目について調査した。本研究は中部大学生命倫理審査委員会の承認のもと行われた。対象者には事前に、研究の目的と方法を説明し、同意書を取得した。

(1) 不眠のアンケート (ピッツバーグ睡眠質問票): 自覚的な不眠症状の評価に使用する。不眠は、生活習慣病患者に多く認められ、睡眠が障害されることにより生活習慣病を悪化させる原因にもなっている。睡眠の質・入眠時間・睡眠時間・睡眠効率・睡眠障害・睡眠剤の使用・日常生活における支障の 7 項目を 0-21 点で評価し、6 点以上で不眠の疑いありとなる。

(2) 過眠のアンケート (エプワース眠気尺度): 自覚的な過眠症状の評価に使用する。過眠の原因は、睡眠の問題・眠気を引き起こす薬の使用など様々である。本アンケートに異常な値を示す被験者にさらに質問しその

原因をつきとめ、睡眠の問題による過眠のみを抽出する。眠気を引き起こしやすい8項目（読書、昼食後、渋滞中など）の状況について0-3点で評価し、総計11点が過眠と判定される。

（3）行動量記録：自覚的な睡眠評価は、実際の睡眠時間と異なることもあり、研究にバイアスを生みやすい。睡眠を評価するには睡眠ポリグラフ検査が必須であるが、検査室のみでしかおこなえないこと、一晩の記録では睡眠・覚醒リズムの評価には不十分であることから、携帯型の行動量記録器が使用されている。活動量を圧電型加速計により測定し運動強度0-9に分類し記録し、睡眠判定アルゴリズム（Enomoto et al, Sleep Biol Rhythms 2009）を使用し睡眠と覚醒を判定する。本機器により、日中の活動量、睡眠時間、睡眠効率、睡眠潜時を評価できる。

（4）喫煙記録：喫煙と脂質メタボロームとの関係の検討のためにおこなった。たばこに含まれるニコチンが脂質代謝の異常に関与していることは明らかである。被験者にたばこの銘柄、1日の喫煙数を1週間記録させた。

（5）実験プロトコール

睡眠時間の影響の検討：健常大学生を対象に、自然睡眠時（8時間就床）および3日間の短時間睡眠時（4時間就床）における翌朝の脳血流反応および脂質プロファイル変動を検討した。対象者はベースライン調査により、睡眠時間が6-8時間であり、不眠や過眠の症状を有しておらず、睡眠に影響を与えるような疾患を有しておらず、研究期間中は喫煙や服薬をしていないものであった。研究期間中、被験者は行動量記録機器を装着し、日中の活動時間および睡眠時間をモニターした。脳血流反応は、近赤外線スペクトロスコピーを用いて認知課題中の前頭葉領域における反応を評価した。

喫煙の影響の検討：健常大学生を対象に、喫煙者と非喫煙者、喫煙者における喫煙前後で、動脈硬化指標および脂質プロファイルの変動を検討した。ベースライン調査時に、喫煙記録から非喫煙者（これまでに1度も喫煙の経験がない）と喫煙者の判定を行った。喫煙者では1日当たりの喫煙量も調査した。睡眠の影響を排除するため、対象者は、前日は7-8時間睡眠を取るよう指示され、喫煙者においては起床後、研究開始まで喫煙しないよう指示された。動脈硬化の指標として、血流依存性血管拡張反応（Flow mediated dilation：FMD）を用いた。

（6）脂質質量分析：空腹時に、EDTA2Na加採血管にて末梢血2mlを採血し、3000g、15

分間の条件で血漿を遠心分離した。分注した血漿は-80℃の冷凍庫で保管した。冷凍保管していた血漿を室温にて溶解した後、polyvinylidene difluoride（ポアサイズ0.2μm）上に、メタノール10μlを滴下後、血漿10μlを滴下し乾燥させた。溶媒抽出表面分析 Liquid Extraction Surface analysis（LESA）と組み合わせたナノ electrospray ionization（ESI）質量分析法を用いた（田口ら、メタボロミクス：その解析技術と臨床・創薬応用研究の最前線 2010）、QTRAP6500（SCIEX）を用いて、ホスファチジルコリン（Phosphatidylcholine：PC）、ホスファチジルセリン（Phosphatidylserine：PS）、ホスファチジルイノシトール（Phosphatidylinositol：PI）、ホスファチジリエタノールアミン（Phosphatidylethanolamine：PE）、ホスファチジルグリセロール（Phosphatidylglycerol：PG）、スフィンゴミエリン（Sphingomyelin：SM）、中性脂肪（Triglyceride：TAG）領域の質量分析を実施した。測定データから、LipidViewソフトウェア（SCIEX）を用いて分子種が同定された。

測定対象	Positive ion mode	
PC & SM	Precursor Ion	184.1 Da
PS	Neutral loss	185.1 Da
PI	Neutral loss	277.1 Da
PE	Neutral loss	141.0 Da
PG	Neutral loss	189.1 Da
TAG16:0	Neutral loss	273.2 Da
TAG18:1	Neutral loss	299.2 Da
TAG18:2	neutral loss	297.2 Da

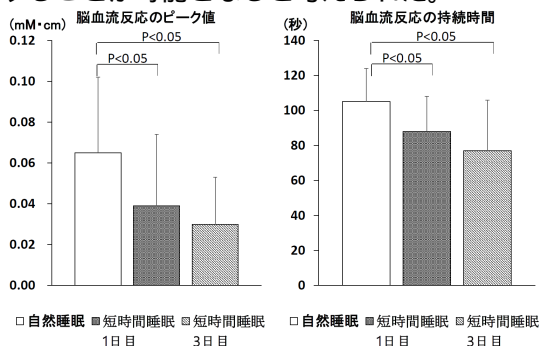
（7）統計解析：睡眠時間の影響の検討においては、えられた結果をANOVA（繰返しあり）を用いて検定した。喫煙の影響の検定においては、非喫煙者と喫煙者の結果の検定には、対応のない2群のt検定、喫煙者における喫煙前後の結果の検定には、対応のある2群のt検定を用いた。

4．研究成果

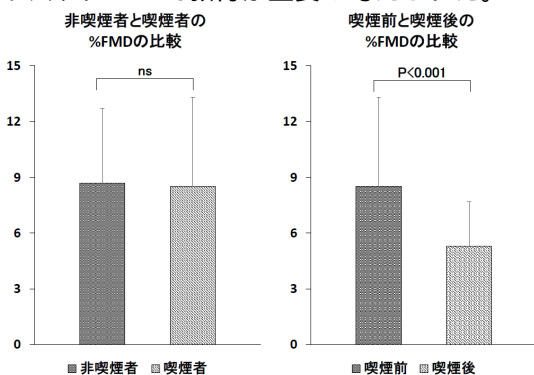
（1）睡眠と生体指標との関連：短時間睡眠1日目の脳血流反応のピーク値は、自然睡眠時に比し、有意に低下していた。短時間睡眠3日目にも同様に、脳血流反応ピーク値の有意な低下が認められた。認知課題中の脳血流反応の積分値は、ピーク値と同様に、自然睡眠時に比し、短時間睡眠1日目および3日目に有意に低値を示した。さらに、脳血流反応の持続時間は、短時間睡眠の1日目および3日目に、自然睡眠時より有意に短縮していることが明らかとなった。一方、課題開始からピーク値までの時間には、自然睡眠時と短時間睡眠1日目または3日目との間に有意な差を示さなかった。これまでの研究により、短時間睡眠により交感神経活性の上昇（Tobaldini et al, Eur J Intern Med 2013）

や炎症反応の増大 (Haack et al, Sleep 2007) が認められることが報告されており、前頭葉領域における脳血流反応の抑制には、短時間睡眠によるこれらのメカニズムが関与している可能性が考えられた。

自然睡眠時に比し、短時間睡眠時に有意に変化していた分子種は、PC 領域で 29 分子、PE 領域で 10 分子、PI 領域で 1 分子、PS 領域で 26 分子、SM 領域で 34 分子、TAG 領域で 68 分子であり、PG 領域では有意な差を示す分子種は認められなかった。これらの分子のうち、短時間睡眠 1 日目と 3 日目で同程度の変化を示すもの、短時間睡眠 1 日目より 3 日目に大きな変化を示すものなど、分子種により変化のバリエーションが認められた。脂質分子種の変化と短時間睡眠による認知課題中の脳血流反応との関連を検討することにより、睡眠による脳機能への影響のメカニズムを検討することが可能となると考えられた。



(2) 喫煙と生体指標との関連：動脈硬化指標である FMD は、喫煙者と非喫煙者との間で有意な差を示さなかった。しかし、喫煙者において、喫煙 10 分後の FMD は、喫煙前に比し有意に低値を示した。FMD は血管内皮機能の指標とされており、血管内皮機能の異常は動脈硬化の早期病態と考えられている。1 年間の禁煙により血管内皮機能が改善すること (Johnson et al, J Am Coll Cardiol 2010)、40 歳以前に禁煙することにより喫煙が原因の死亡率を低下させることが明らかになっている (Jha et al, N Engl J Med 2013)。心血管病予防のために、若年者においても、血管機能が強く障害される前に喫煙によるリスクについて教育が重要と考えられた。



喫煙者と非喫煙者の比較において、喫煙者で有意に変化していた分子種は、PC 領域で

12 分子、PE 領域で 1 分子、PI 領域で 1 分子、PS 領域で 7 分子、SM 領域で 21 分子、TAG 領域で 30 分子認められ、PG 領域では有意な変化を示す分子種は認められなかった。また、喫煙者における喫煙前と喫煙後における比較では、喫煙後に有意に変化していた分子種は、PC 領域で 13 分子、PE 領域で 5 分子、PI 領域で 1 分子、PS 領域で 6 分子、SM 領域で 10 分子、TAG 領域で 4 分子認められ、PG 領域では有意な変化を示す分子種は認められなかった。非喫煙時における喫煙者と非喫煙者との間で認められる脂質分子種と、喫煙前後で認められる脂質分子種の変化には差があり、これらの違いを比較検討することにより、喫煙の急性および慢性的な影響をとらえられるマーカーの探索が可能になると示唆された。

## 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 2 件)

- 1) Miyata S, Noda A, Iwamoto K, Kawano N, Banno M, Tsuruta Y, Noda Y, Ozaki N. Impaired cortical oxygenation is related to mood disturbance resulting from three nights of sleep restriction. *Sleep Biol Rhythms* 2015; 13: 387-394. DOI: 10.1111/sbr.12130 (査読有り)
- 2) Miyata S, Noda A, Ito Y, Iizuka R, Shimokata K. Smoking acutely impaired endothelial function in healthy college students. *Acta Cardiologica* 2015; 70: 282-285. DOI: 10.2143/AC.70.3.3080632 (査読有り)

[学会発表](計 1 件)

- 1) 宮田聖子, 野田明子. 睡眠不足と認知機能低下・気分障害との関係. 第 5 回日本認知症予防学会学術集会. 2015 年 9 月 25-27 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 聖子 (MIYATA, Seiko)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教  
研究者番号：40560917

(2) 研究協力者

野田 明子 (NODA, Akiko)  
中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・教授  
研究者番号：80252287  
田口 良 (TAGUCHI, Ryo)  
中部大学・生命健康科学部・教授  
研究者番号：20080210