

食餌性体内時計同調の作用機序に基づいた時間栄養学による リズム障害の改善効果

田原 優

早稲田大学大学院先進理工学研究所 博士課程

緒言

哺乳類の体内時計は視床下部にある視交叉上核 (SCN) により支配を受けている。各組織には時計遺伝子群が発現しており、それ自身が負の転写フィードバック機構を構成する事で、遺伝子発現に強固な日内変動・日内リズムを作り出している。また時計遺伝子は様々な遺伝子の発現を調節しており、マイクロアレイ解析によると全遺伝子の約 10% が日内変動をもっている事が分かっている¹⁾。

体内時計の調節(同調)には「外界の光」が一番効果的であり、光の情報は網膜、視神経を通り直接 SCN へ伝わる。それに対し、当研究室では「食餌」が光よりも強い同調作用がある事を報告しており、食餌はインスリン分泌を介して直接末梢時計に影響を与えている事が明らかになった^{2,3)}。当研究室は食餌による時計同調、または時間を考慮した食餌方法などを「時間栄養学」という分野を立ち上げて研究しており、本研究では「リズム障害に対していかなる食事方法が体内時計を介しての治療として役立つか」を、マウスを用いて検討した。

リズム障害の中でもより身近なものとして、交代勤務(シフトワーカー)による慢性的な時差ぼけが挙げられ、

その人口は近年増加しており社会問題にも発展しつつある。またそういった人は、癌や循環器系疾患、メタボリックシンドロームといった各種疾患へのリスクも高いという臨床データが数多く報告されている⁴⁾。このような症状は時計遺伝子のミュータントでも見られ^{5,6)}、シフトワーカーは体内時計が乱れている事が予想できる。しかし時計の乱れというものがどういうものかはまだ理解が進んでおらず、振幅の減弱、リズムの崩壊、位相のずれなどより具体的な状況を知る必要がある。そこで本研究は、シフトワークモデルマウスの作製、そしてその時計機能の評価、また免疫機能の評価を行った。また、シフトワークモデルマウスの時計を評価するにあたり、それぞれの個体により時計の位相や乱れが異なる事が予想されたので、1匹のマウスの時計を評価する測定系も新たに開発した。

実験方法

シフトワークモデルマウスの作製には、明暗サイクルを一週間おきに8時間前進・後退させたものと、一日3時間おきに明暗サイクルが変わるものの2種類を用意した。時計の評価には、インビボ・イメージングシステム

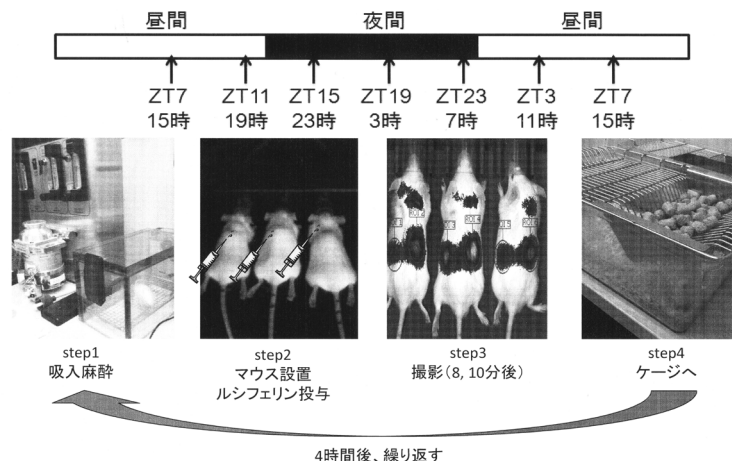


図1 インビボ・イメージングシステムを用いた発光リズム測定手順

しまうはずだが、今回測定した部位は血流量も多いためか発光が強く、組織の特定ができたので評価の対象として採用した。また、このマウスは元は C57BL/6J だったが、黒い体毛が光を吸収してしまい発光を測る事ができなかったため、ICR と掛け合わせて白いマウスに置換し、発光を容易に測定できるようにした。それぞれの組織での発光リズムの位相（ピーク時刻）はコサイナー法により検定した。結果、どの組織の位相も ZT19 付近（ZT は ZTO を明期開始時刻とする）であった。この位相は Per2 のタンパク質量の日内変動と同様であった。ルシフェラーゼによる発光は温度に依存すると言われているが、イメージング撮影中の体温を測定した結果、麻酔により低下しさらに測定台が 37 度一定に保たれているために、昼夜の体温差はほぼ考慮しなくてもよい変動しかない事が分かった。測定系の正当性をさらに証明するために、

マウスの明暗サイクルを反転させて 2 週間後に測定すると、ちゃんと反転した発光リズムが得られた。また、食餌時間の制限が未梢時計を変化させる事も分かっているので、昼間のみまたは夜間のみ食餌制限によりマウスの時計がその食餌時刻に同調しているかをこの測定系で確認した（図 3）。また、この測定法はとても安定しており、誰が測定しても同じ結果を作り出す事ができた。

2. シフトワークモデルマウスの作製と、免疫機能評価

明暗サイクルを 8 時間シフトしたマウスの行動リズムは、5 日ほどかけて新しい位相に同調した。その明暗シフトを前進・後退 3 サイクル行った後、LPS (7.5mg/kg,i.p.) を腹腔内投与した結果、通常飼育マウスと比べて死亡率が高くなった（図 4）。また、メラノーマ細胞の増殖も速く、シフトワークのモデルとして免疫機能の

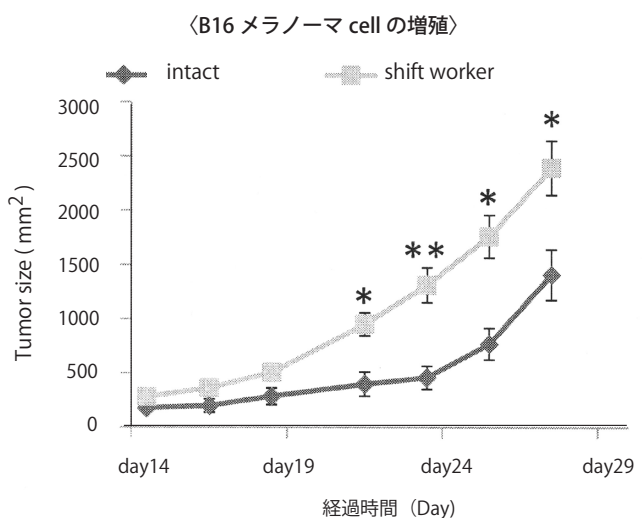
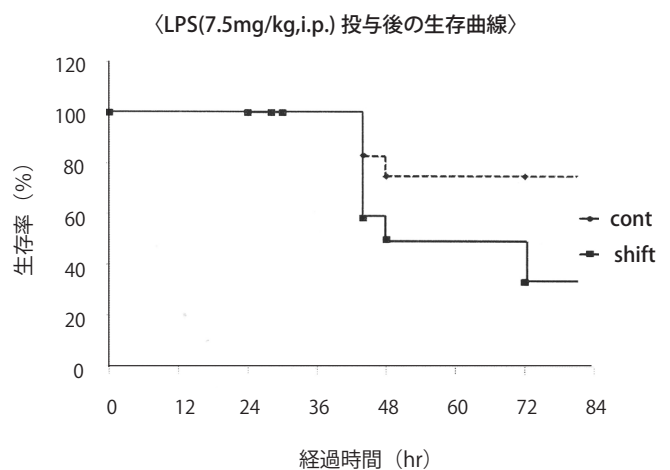
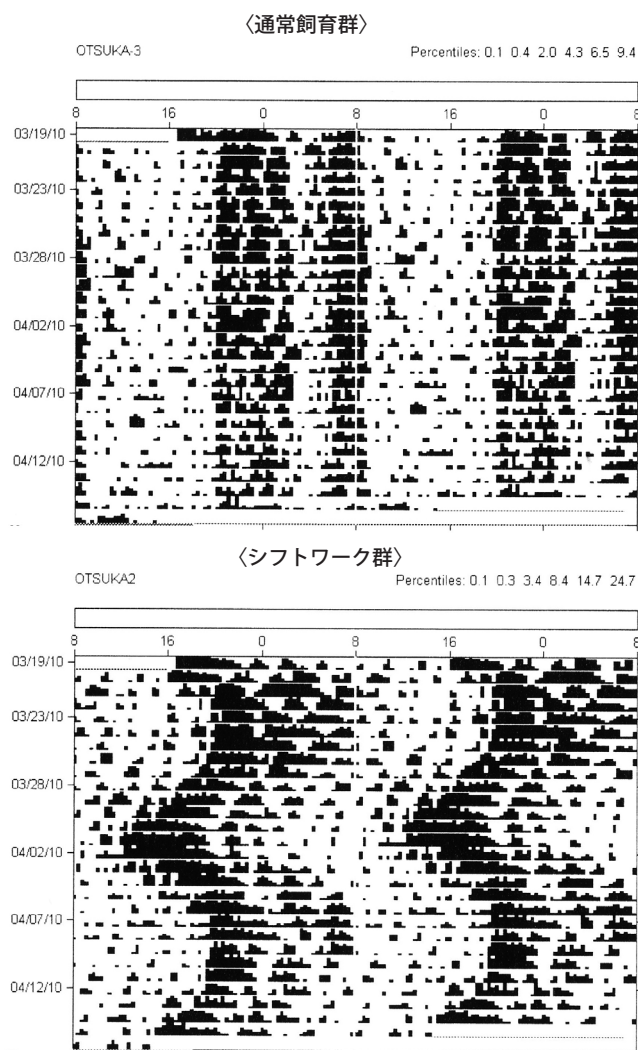


図 4 シフトワークモデルにおける免疫機能低下

低下を示した(図4)。一方、明暗を3時間おきに变化させたマウスは行動が暗期に集中する個体と、周期を約23.5時間でフリーランさせる個体の2パターンが現れた。前者は明暗サイクルに同調した行動を示したという意味では時差ぼけしていないが、後者は同調できずに独自の周期で行動していることから、慢性的な時差ぼけ状態であると予想できる(図5)。

3. シフトワークモデルマウスの時計の乱れ

上述のシフトワークモデルマウス(3時間明暗サイクル)を2ヵ月その環境で飼育した後、インビボ・イメージングシステムで発光リズムを測定した。その結果、コントロールと同じような綺麗な発光リズムがそれぞれの組織で確認できた(図5)。また振幅は腎臓において若干減弱していたが、他の組織ではコントロール群と変わらなかった。この発光リズムは行動が暗期に同調した個体も、フリーランした個体も変わらなかった。

考 察

交代勤務、夜勤等のシフトワーカーにおける体内時計の乱れを明らかにするため、本研究では2種類のシフトワークモデルマウスを作製した。明暗サイクルの8時間前進・後退によるモデルはより人に近いモデルであり、そのマウスを用いて免疫機能の低下を見出す事ができた。今後、このモデルの時計機能を評価すると共に、今回実験が間に合わなかった食事による治療という課題に挑戦したいと考えている。それにあたり、食餌時間を暗期に固定する事で、明暗サイクルが8時間前進した際に、食餌時間も前進するので、より早く同調できると考えている。もう一方の3時間おきの明暗サイクルによるモデルは、行動リズムが明暗に同調できず、慢性的に時差ぼけ状態になっていると考えられ、時差ぼけの負荷を施すには良いモデルができただろう。また、このモデルでさえしっかりとした発光リズムが見れた事は想定外であり、今後の「乱れた時計」の認識を見直すべきデータと言えるだろう。

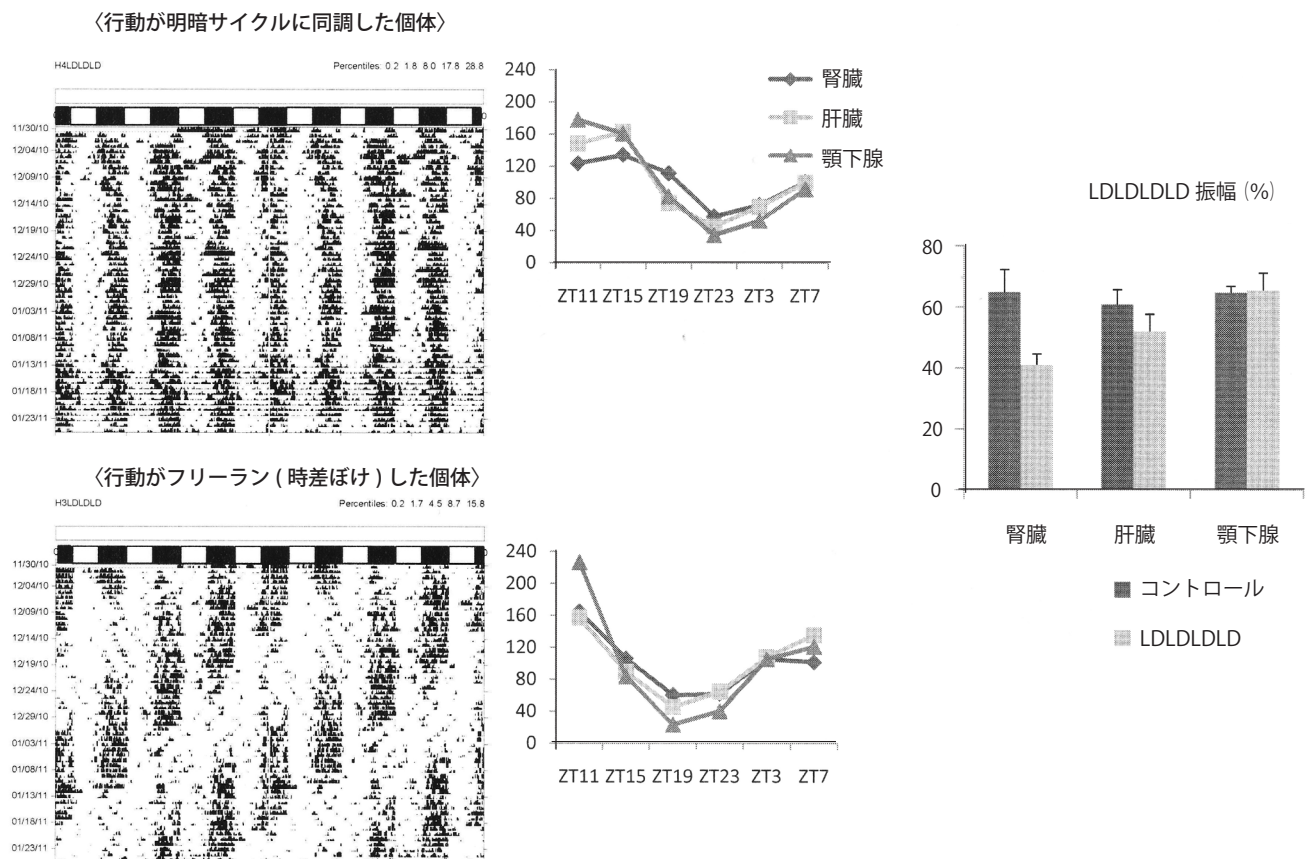


図5 シフトワークモデル(3時間明暗)の発光リズム

本研究において確立した1個体の末梢時計測定法は、簡便かつ安定で、とても有用な手法であり、体内時計分野のさらなる発展に貢献できるものと考えている。また、今回の実験結果より、末梢時計は意外にも安定に正常な時計を刻んでいる事が分かった。しかし今回の条件における中枢時計は全く評価できておらず、今後はさらに時計の乱れについて中枢時計と末梢時計の位相のずれについて検討していきたいと考えている。というのは、時計の乱れの原因として「中枢時計と末梢時計の位相のずれ、情報伝達の遅れ」が体にとって不調をきたすのではないかという考えもあるからである。今回シフトワークモデルマウスの末梢時計は正常に近く見えたが、実は中枢時計との位相差がある可能性も十分に考えられるので、今後検討する必要がある。そして発光量の少ない脳を撮影対象にするにあたり、頭蓋骨の切除やカメラの感度、露光時間などを検討し、現在プロトコルの改良を行っているところである。

要 約

明暗サイクルを変化させることによりシフトワーク・慢性時差ぼけのモデルマウスを作製し、その免疫機能の低下をLPS投与、移植癌の増殖スピードで確認した。

また、マウスの末梢組織の体内時計を一個体で測定する系を世界で初めて確立した。この系を用いて、シフトワークモデルマウスの体内時計を測定した結果、腎臓で振幅の低下が若干見られたが、他はほぼ正常に近い日内変動を示した。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より学術奨励金のご支援を賜りました。心より感謝いたしますと共に厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたりご指導頂きました柴田教授に御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Vollmers C, et al.; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106,21453-21458, 2009.
- 2) Tahara Y, et al.; *J Biol Rhythms*, 25,9-18,2010.
- 3) Tahara Y, et al.; *J Biol Rhythms*, 26,230-240,2011.
- 4) Schernhammer ES, et al.; *J.Natl Cancer Inst*, 93, 1563-1568,2001.
- 5) Fu L, et al.; *Cell*, 111, 41-50,2002.
- 6) Kondratov RV, et al.; *Genes Dev*, 20, 1868-1873,2006.