

【助成の種類】：【時間の心理と生理】のテーマでの研究助成

【研究テーマ】：加齢に伴う体内時計の変化と生活習慣との関連に関する研究

【氏名】高橋将記

【所属】早稲田大学重点領域研究機構

## 1. 背景

体内時計とは、生体内に周期をもたらす仕組みであり、睡眠・覚醒リズム、食事による消化・吸収・代謝リズム、体温調節など様々な生理機能を制御している<sup>1</sup>。この体内時計を作り出すメカニズムとして、細胞内の時計遺伝子が重要な役割を担っていると考えられており、細胞内において **Clock**、**Bmal1**、**Cry**、**Per** の時計遺伝子が転写・翻訳のフィードバック・ループにより調節している。また体内時計は、加齢の影響を受け、特に高齢者では体内時計の周期（長さ）が短くなり、前進することが示されてる<sup>2</sup>。

我々のグループでは、毛包細胞を用いた時計遺伝子発現リズムにより振幅（生体リズムの強さ）、ピーク時刻、生体リズムの良・不良により若年者から高齢者まで幅広い年齢層の体内時計を評価してきた。一方で、栄養・食生活あるいは睡眠習慣と時計遺伝子発現リズムとの関連の検討には至っていない。加齢に伴う体内時計の変化が生活習慣病発症リスクの増加や認知症増加に寄与することが示唆されていることから、加齢に伴う体内時計に関連する生活習慣を明らかにすることは重要と考えられる。

本研究では、若年者と高齢者を対象に体内時計を評価し、睡眠、活動時間、栄養・食生活などの生活習慣との関連を検討することを目的とする。

## 2. 方法

研究参加の同意を得られた若年男性 51 名、高齢男性（60 歳以上と定義）35 名を対象とした。除外基準として、日常生活を実施していくうえで支障がある方、医師より運動が禁止されている方、糖尿病、脂質異常症、呼吸器系疾患、心血管疾患、うつ病、認知症、関節リウマチならびに骨粗鬆症の診断が医師あるいは医療機関より出ている方は本研究の参加を控えてもらった。なお、本研究の特徴から顎鬚の毛包細胞から十分な RNA 量が取れなかった方、本研究参加の 1 週間以

内に時差を伴う旅行および交代制勤務の仕事に従事している方は対象者から除外した。本研究は、世界医師会のヘルシンキ宣言に則り実施し、早稲田大学のヒトを対象とする研究に関する倫理委員会の承認を受け実施した。

基本特性としての評価項目は、年齢、身長、体重、就寝時刻、起床時刻、睡眠時間、ピッツバーグ睡眠質問票 (The Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) スコア)、朝食時刻、昼食時刻、夕食時刻、朝型・夜型質問紙より算出した Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) スコアを評価した。なお、PSQI は総得点 5 点以下を睡眠の質が良好、総得点 6 点以上を睡眠の質が不良と判定した<sup>3</sup>。MEQ スコアは、総得点により朝型 (59-86 点)、中間型 (42-58 点)、夜型 (16-41 点) に分類した<sup>4</sup>。若年者および高齢者の基本特性は、表 1 に示す。先行研究の方法に従い、顎鬚の毛包細胞を用いて時計遺伝子発現リズムを評価した<sup>5</sup>。顎鬚の採取は、1 日 6 回、午前 6 時から翌日 2 時まで 4 時間ごとに採取した。得られた毛包細胞から時計遺伝子 *NR1D1*、*NR1D2*、*PER3* 発現を評価した。なお、それぞれの時計遺伝子発現リズムから、Single Cosinor Method Program (Acro.exe version 3.5) を用いて、振幅 (発現リズムの強さ)、ピーク時刻、Goodness of fit (GF) (リズムの良・不良) を算出し、若齢者と高齢者で比較した<sup>6</sup>。

各データは、平均値±標準誤差で示した。若齢者と高齢者における比較の統計解析は以下のように行った。各変数の正規性は、コルモゴロフ-スミルノフ検定により実施した。正規性が認められた若齢者と高齢者の 2 変数間の比較は、対応のない t-test により比較した。正規性が棄却された若齢者と高齢者の 2 変数間の比較は、マン・ホイットニーの U 検定を実施した。PSQI スコアにより分類された睡眠の質の良・不良の割合、また朝型・夜型質問紙による朝型・中間型・夜型の割合の比較は、カイ 2 乗検定により行った。若齢者と高齢者の時計遺伝子発現リズムの比較は、群 (若齢者・高齢者) と経時変化 (午前 6 時から午前 2 時までの 6 時点) における 2 要因分散分析にて解析した。なお、2 要因分散分析にて交互作用が認められた場合には、多重比較検定として Bonferroni 検定を用いて各時刻における若齢者と高齢者の比較を行った。また各群 (若齢者および高齢者) において基本特性と時計遺伝子発現リズムから算出した振幅、ピーク時刻、GF との関連は、ピアソンの積率相関係数にて評価した。統計学的な有意水準は、 $P<0.05$  とした。

### 3. 結果

若齢者と高齢者の基本特性の比較において、年齢、身長、就寝時刻、起床時刻、

昼食時刻、夕食時刻、MEQ スコアならびにMEQ スコアによる朝型・中間型・夜型の割合に統計学的な有意差が認められた ( $P<0.01$ ) (右表)。

*NR1D1*、*NR1D2*、*PER3* の時計遺伝子発現にて経時変化に伴う有意な主効果 ( $P<0.01$ ) が認められ、*NR1D1* と *NR1D2* には有意な交互作用 ( $P<0.01$ ) が認められた (図 1 a-c)。

なお、多重比較検定より午前 6 時の時刻において、高齢者の *NR1D1* と *NR1D2* 発現量は若年者と比較して有意な高値が認められた ( $P<0.01$ )。

	若齢者	高齢者	P値
年齢 (歳)	24±1	70±1	0.001
身長 (cm)	172±1	168±1	0.001
体重 (kg)	65±1	64±1	0.850
BMI	21.4±0.5	22.8±0.4	0.051
就寝時刻(時)	25.0±0.2	22.6±0.2	0.001
起床時刻 (時)	7.8±0.2	6.1±0.2	0.001
睡眠時刻 (時)	6.8±0.2	7.0±0.1	0.352
PSQI	5.2±0.3	4.7±0.4	0.293
睡眠の質：良/不良 (人数)	28/23	25/10	0.092
朝食時刻 (時)	8.1±0.2	7.5±0.2	0.051
昼食時刻 (時)	12.9±0.2	12.3±0.1	0.003
夕食時刻 (時)	20.2±0.3	18.8±0.1	0.002
MEQスコア	47±1	61±1	0.001
朝型/中間型/夜型 (人数)	9/27/15	20/15/0	0.001

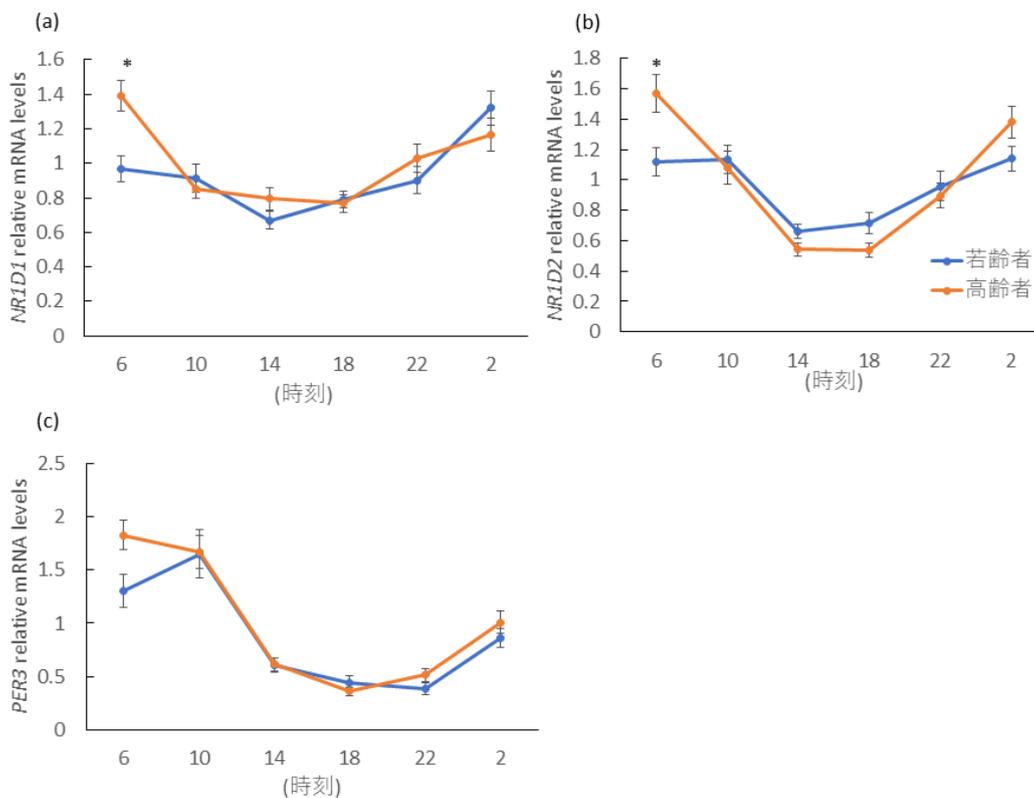


図 1：若齢者と高齢者における時計遺伝子発現

両群の振幅、ピーク時刻および GF を比較した結果、*NR1D2* のピーク時刻が高齢者で有意に前進し ( $P<0.01$ )、*PER3* のピーク時刻においても前進傾向が認められた ( $P=0.051$ ) (下表)。*NR1D2* および *PER3* の GF は高齢者で低い傾向が認められた (*NR1D2*;  $P=0.092$ 、*PER3*;  $P=0.051$ )。

	振幅			ピーク時刻			GF		
	若齢者	高齢者	P値	若齢者	高齢者	P値	若齢者	高齢者	P値
<i>NR1D1</i>	0.68±0.05	0.65±0.06	0.688	8.35±1.03	6.10±0.96	0.133	0.23±0.03	0.17±0.02	0.128
<i>NR1D2</i>	0.74±0.05	0.85±0.06	0.148	8.97±0.90	5.28±0.67	0.003	0.18±0.02	0.13±0.02	0.092
<i>PER3</i>	1.09±0.10	1.05±0.07	0.782	8.86±0.61	7.26±0.40	0.051	0.14±0.02	0.10±0.01	0.057

若齢者と高齢者の各群における生活習慣（睡眠、栄養・食生活）と時計遺伝子発現リズムから算出した振幅、ピーク時刻、GF との間に明らかな関連性は認められなかった。

#### 4. 考察

本研究では、若年者と高齢者における時計遺伝子発現リズムを比較し、生活習慣との関連性を検討した。まず時計遺伝子発現リズムは、若齢者および高齢者ともに日内変動を示しており、毛包細胞を用いた時計遺伝子発現リズムが生体リズムの指標として有用であることが示された。また *NR1D1* および *PER3* のピーク時刻が高齢者で前進しており、先行研究により加齢に伴い朝型になることが示されているが、毛包細胞を用いた時計遺伝子発現リズムの評価より加齢変化を客観的にとらえることができる可能性が示唆された。また、午前 6 時の時点において時計遺伝子 *NR1D1* および *NR1D2* 発現が高齢者で高値を示していた。発現量の高値・低値が、生理学的な機能に及ぼす影響は明らかではないが、少なくとも代謝や各種疾患の発症に関わるこれらの遺伝子発現が、若齢者と高齢者で異なることは今後の生理学的指標との関連を検証することの重要性を示す知見である。

#### 5. 今後の予定

本研究では、各種質問紙から評価した睡眠の質・量や睡眠・食事のタイミングと時計遺伝子発現リズムとの間に明らかな関連は認められなかったが、現在、加速度計による身体活動量の解析や睡眠の質を簡易に評価する Fit-bit などのスマートデバイスを用いた追加的な評価を行っている。またアジア圏を中心とした若齢者ならびに高齢者の体内時計も合わせて実施しているため、加齢変化に加え、人種等の比較研究も今後進めていく予定である。

6. 参考文献

- 1 Bass, J. & Takahashi, J. S. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**, 1349-1354, doi:10.1126/science.1195027 (2010).
- 2 Hida, A. *et al.* Screening of clock gene polymorphisms demonstrates association of a PER3 polymorphism with morningness-eveningness preference and circadian rhythm sleep disorder. *Sci Rep* **4**, 6309, doi:10.1038/srep06309 (2014).
- 3 Buysse, D. J., Reynolds, C. F., 3rd, Monk, T. H., Berman, S. R. & Kupfer, D. J. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* **28**, 193-213 (1989).
- 4 Horne, J. A. & Ostberg, O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* **4**, 97-110 (1976).
- 5 Akashi, M. *et al.* Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15643-15648, doi:10.1073/pnas.1003878107 (2010).
- 6 Refinetti, R., Lissen, G. C. & Halberg, F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res* **38**, 275-325, doi:10.1080/09291010600903692 (2007).