

研究報告書

「中枢・末梢・時間を統合する代謝生理学的ネットワーク機能の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 志内 哲也

1. 研究のねらい

本研究では、神経経路と液性経路を介した末梢と中枢の代謝連関作用、代謝変化と脳機能変化の生理学的連関作用、およびサーカディアンリズムや世代継承など時間軸を加えた、3つの視点からアプローチする研究を行うことで、個体内の代謝生理学的ネットワークを解明することがねらいである。栄養の摂取と運動の実施は、生体の動的恒常性を大きく刺激する。そこで本研究では、夜食症型摂食スケジュールで飼育することによりインスリン抵抗性を発症するモデルマウスを用いて、視床下部 AgRP 発現、骨格筋における異所性脂肪蓄積、肝臓の時計遺伝子発現に着目し、中枢・末梢・時間を統合した代謝生理学的連関メカニズムについて個体レベルだけでなく分子レベルで明らかにするとともに、このようなネットワーク機能を利用する生体内の生理的意義について解明する。さらに、生体リズムの乱れにより変化した動的恒常性が世代を超えて受け継がれるかを調べることで、動的恒常性の重要性を鑑みる。また、運動による脳を介した代謝亢進作用機構の解明や、臓器間ネットワークを用いて運動モチベーションを増強させる可能性を探る。これにより、夜型生活による「痩体型」糖尿病という現代病の発症機序を解明するとともに、動的恒常性を生かした処方法を創出する。

2. 研究成果

(1) 概要

活動期後半を中心とした夜食症型の摂食リズムで生活すると、睡眠深度が浅くなること、肝臓から脳を介して骨格筋における糖代謝能力が低下すること、および恐怖への記憶が強くなることを突き止めた。これらの一部には、副腎から分泌されるグルココルチコイドと、それによって視床下部で発現が刺激される AgRP という神経ペプチドが関与することを見出した。また、妊娠期に同様の摂食リズムで生活すると、そのマウスから生まれた子供は、恐怖に対する記憶が強くなる「性格」を継承する可能性を示した。

一方、肥満症患者は脂肪組織から分泌されるレプチンというホルモンの効きが悪いことで知られているが、運動によりオレキシンニューロンが活性化することで、レプチンが脳の視床下部へ効きやすくなることを解明した。また、特定分子に対する刺激により、神経性に脳内ドーパミンが活性化し、それにより運動へのモチベーションが亢進する可能性を見出した。

これらの結果はすべて、末梢と中枢が神経や血液などを介して有機的につながることで、栄養や運動の作用が営まれることを示唆する。さらに時間の影響が大きく関与する。このようなメカニズムを応用することで、生活習慣病を予防・治療する新たなプログラムの開発が期待できる。

(2) 詳細

研究テーマA「摂食リズム誘導性視床下部 AgRP による代謝制御機構とその意義」

本研究では、雄性 C57BL/6J マウスの摂食時間を暗期後半 4 時間のみ (Evening 群) に制限した群と、摂食時間を暗期前半 4 時間に制限した群 (Morning 群)、および暗期のみ自由摂食 (Ad-lib 群) の 3 群を作成し、8 週間飼育した後のインスリン感受性を評価した。その結果、Evening 群の骨格筋においてインスリン感受性の低下を示すとともに、視床下部 AgRP の発現が増強することを見出した。Evening 群のマウスにグルココルチコイド受容体 (GR) 阻害剤を経口投与すると、増強していた AgRP 発現が有意に低下した。そこで、Cre-loxP システムを用いて AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスを作成し、摂食リズムを上記の 3 群に分けて飼育した。その結果、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスでは、Evening 群で飼育しても AgRP 発現増強は見られず、骨格筋におけるインスリン感受性の低下も見られなくなった。以上より、活動期後半中心の食餌リズムにおける骨格筋インスリン感受性低下の原因として、視床下部のグルココルチコイド感受性亢進による AgRP 発現増強が、その一端を担っていることが示唆された。

一方、AgRP 増強は摂食リズム形成 2 週間後には見られるにもかかわらず、全身のインスリン抵抗性は 8 週間後まで見られない。このタイムラグから、AgRP 発現増強はインスリン抵抗性発症が真の目的ではなく、他の生理学的意味を持つと予想された。様々な検討の結果、恐怖に対する記憶や応答が、Evening 群では強くなり、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスでは Evening 群として飼育しても、恐怖への対応は変化しなかった。これらのことより、摂食リズム誘導性 AgRP は、代謝異常を発症する前に、情動行動を制御するための発現である可能性が示唆された。

研究テーマB「破綻した生体リズムの影響は次世代へ継承されるか？」

研究テーマAにおいて見出された摂食リズムによる代謝生理学的影響は、次世代へ引き継がれるのかを検討した。妊娠期後半の 2 週間において、研究テーマAと同様の 3 群を作成して飼育し、出産後は自由摂食に切り替えた。その結果、Evening 群の飼育条件から産まれた仔は、成獣後に恐怖記憶の増強による過敏な行動を示した。研究テーマAで見られたような代謝異常は見られなかった。また、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスの雌を用いた実験では、妊娠期後半の 2 週間において Evening 群で飼育された母マウスから産まれた仔は、成獣後に恐怖記憶の増強による過敏な行動を示さなかった。これらの結果より、妊娠期における摂食リズムは、仔における情動系の発達に大きな影響を与えることが示唆された。また、この作用には、グルココルチコイドで発現増強された AgRP が、妊娠中に何らかの作用を発揮している可能性が考えられる。

研究テーマC「運動が中枢性代謝調節機構に与える影響」

本研究は、持久的運動後の視床下部におけるレプチン感受性の変化と、そのメカニズムについて検討した。雄性 C57BL/6J マウスに対して 45 分間のトレッドミル走運動 (15m/min) を実施し、走運動終了直後にレプチン (2 mg/kg) を腹腔内に投与した。レプチン投与 45 分後にマウ

ス視床下部を採取し、ウエスタンブロット法および免疫組織化学染色法を用いて STAT3 のリン酸化を測定した。トレッドミル走運動後にレプチンを投与した場合、腹内側視床下部 (MBH) における STAT3 のリン酸化が、走運動しない場合よりもさらに増強した。また、オレキシンニューロンにおける c-Fos 発現が、トレッドミル走運動により増加することを認めた。オレキシン受容体阻害薬をトレッドミル走運動前にマウス脳室内に投与しておくこと、MBH における STAT3 リン酸化の増強が見られなくなったことから、運動後のレプチン感受性増強にはオレキシンニューロンの活性化が関与すると考えられる。しかしながら、直接 MBH へオレキシンを投与しても、レプチン感受性は上昇せず、むしろ低下したことから、運動によりオレキシンは間接的に作用し、MBH におけるレプチンの STAT3 リン酸化を亢進すると考えられる。また、脳室内へレプチンを投与した場合、STAT3 のリン酸化に運動の有無による違いは見られなかったことから、運動後、MBH において直接的にレプチン感受性が亢進するのではなく、別のメカニズムが関与することを示唆する。

3. 今後の展開

活動期後半を中心とした摂食リズムで生活すると、睡眠深度が浅くなることを報告したが、この現象に AgRP が関与するかどうかは不明である。睡眠障害が代謝異常を引き起こすことも考えられるため、これらの連関についても明らかにする。

研究テーマBにおいて、行動異常を示した仔マウスのどの脳部位にどんな分子レベルの異常があるかを探索し、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスから産まれた仔と比較することで、責任部位と分子を同定する。

研究テーマCにおいて、運動によるオレキシンニューロンの活性化経路の探索を行う。また、運動後のレプチン感受性亢進作用に必要なオレキシンが作用する脳部位を、光遺伝学的手法を用いて同定する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的はほぼ達成できたが、メインテーマの研究内容をさきあげ任期が終わるまでに論文としてまとめ、世に出すことができなかったことが悔やまれる。遺伝子改変マウスの搬入や、仮説の棄却など、当初計画していた通りに進まなかったことや、途中で他の研究内容にも拡大・融合したことが原因として考えられる。

研究に関しては、それぞれ異なる手技が得意な研究補助員を雇って効率的に進めることができた。また、ウイルスの作成やサンプルの網羅的解析など、所属研究室内のハードやソフトでは不可能な部分を外部委託することで、効率的に研究を実施することができた。

本研究の成果は、予防医学的見地から社会に啓発できる内容であり、医療費の抑制など経済的な部分にも波及効果が見込まれる。また、創薬科学的見地からも末梢・中枢連関の動的恒常性を見据えた新規薬剤の開発に役立つと思われる。

これらは、他臓器間の機能的ネットワークを体系的な視点で解明するとともに、その時間的変化および破綻を捉えており、本領域の戦略目標である「先制医療の実現に向けた動的恒常性の維持・変容機構の統合的解明」に大きく寄与できた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、神経経路と液性経路を介した末梢と中枢の代謝、代謝変化と脳機能変化の生理学的連関作用、サーカディアンリズムや世代継承などの時間軸の3つの視点からの個体内の代謝生理学的ネットワークを解明することを目的とした。その結果、生活習慣として夜食症型の摂食リズムにより、骨格筋における糖代謝能力が低下することならびに恐怖への記憶が強くなることを見出し、その分子機序として、副腎から分泌されるグルココルチコイドと、それによって視床下部で発現が刺激される AgRP という神経ペプチドが関与することを見出している。また、妊娠期に同様の摂食リズムで生活すると、そのマウスから生まれた子供は、恐怖に対する記憶が強くなる「性格」を継承する可能性を見出している。残念ながら、本さきがけ期間中に、研究全体をまとめる論文の発表には至らなかったが、今後の研究成果も含めて論文化されることが期待される。

本研究領域のテーマである多臓器間の連関に正面から取り組んだ研究成果であり、今後の研究者としての成長が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Miyatake Y, Shiuchi T(equal contribution), Mawatari K, Toda S, Taniguchi Y, Futami A, Sato F, Kuroda M, Sebe M, Tsutsumi R, Harada N, Minokoshi Y, Kitamura T, Gotoh K, Ueno M, Nakaya Y, Sakaue H. Intracerebroventricular injection of ghrelin decreases wheel running activity in rats. *Peptides*. 2017 Jan;87:12–19.
2. Oura K, Otsuka A, Shiuchi T(Corresponding author), Chikahisa S, Shimizu N, Séi H. Late feeding in the active period decreases slow-wave activity., *Life Sci*. 2016 Sep 1;160:18–26.
3. Otsuka A, Shiuchi T(Corresponding author), Chikahisa S, Shimizu N, Séi H. Voluntary exercise and increased food intake after mild chronic stress improve social avoidance behavior in mice., *Physiol Behav*. 2015 Nov 1;151:264–71.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<受賞>

「日本体力医学会 大塚スポーツ医科学奨励賞」(責任演者として)(2016)

<主要な学会発表>

「摂食リズムによるエネルギー代謝と高次脳機能の変容」日本薬学会(2017年3月)

「Hypothalamic control of insulin sensitivity in skeletal muscle is modulated by feeding rhythm」

Keystone symposium (2015年10月)

「Feeding rhythm during active phase influences hypothalamic regulation of insulin sensitivity in skeletal muscle」Asian Congress of Nutrition 2015 (2015年5月)

「Hypothalamic AgRP-mediated energy metabolism in skeletal muscle is a critical regulatory system in feeding rhythm-induced insulin resistance」Experimental Biology 2015 (2015年4月)

<著作物>

「運動と食欲」PharmaMedica、Vol34、No.5、p27-31、(2016)

「中枢性エネルギー代謝調節機構と末梢時計に対する摂食リズムの影響」内分泌・糖尿病・代謝内科、Vol41、No.1、p31-35、(2015)

「視床下部とメタボリックシンドロームの改善」体育の科学、Vol4、No.5、p331-338、(2014)