

食事による中枢時計制御とその神経経路の解明

前 島 裕 子

福島県立医科大学医学部 特任講師

緒 言

近年の報告で世界人口72億人に対し15億人が肥満または過体重であることが明らかになっている¹⁾。肥満に伴う生活習慣病の増加は日本においても深刻な社会問題となりつつある。肥満は糖尿病、脂質代謝異常症、高血圧の成因となり、動脈硬化疾患のリスクを高め様々な疾患(メタボリックシンドローム)を引き起こすため、医学的対策は急務である。

従来、肥満は過食によるものと考えられていた。しかし近年、肥満の発症には、摂食のサーカディアン(概日)リズム障害が大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった²⁾。したがって、増大の一途をたどる肥満/生活習慣病、メタボリックシンドロームの対策として摂食概日リズムとその形成機構の解明は極めて重要である。

体内のサーカディアンリズムを創出する「中枢時計」は脳の視交叉上核(SCN)であることが知られている。SCNの破壊は生体のサーカディアンリズムを消失させることが古典的な破壊実験で明らかにされており³⁾、SCNにおける各時計遺伝子のノックアウト動物においてもサーカディアンリズムの減弱が報告されている^{4,5)}。このように今日にいたるまで、SCNのニューロンおよびその影響下にある因子がサーカディアンリズムと摂食リズムに及ぼす影響について数多くの研究が行われてきた。

ところで、時差症候群(時差ぼけ)は、体内時計と外的環境の不一致により、心身の不調を引き起こすといわれており、時差症候群の解消方法としては現地の光を浴びることや、現地の時間に合わせた食事をとることが有効であるといわれている⁶⁾。このことは、光や食事に伴って発生する何らかのシグナルが、SCNのニューロン活動に影響を与えていることを示唆している。そこで本研究は食事に注目し、食事が中枢時計に及ぼす影響およびその神経経路を明らかにすることを目的とした。

実験方法および結果

動物: Wistar rat 9週齢を、暗期12時間明期日12時間の光条件で飼育し、餌、水は自由摂取とした。実験はすべて福島県立医大実験動物委員会の承認のもと行った。

1. 食事がSCNにおける時計遺伝子に与える影響

9週齢のWistarラット(雄)を使用し、一晩(14時間)の絶食後、明期開始2時間後に餌を与え、摂食開始2時間後に4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行った。

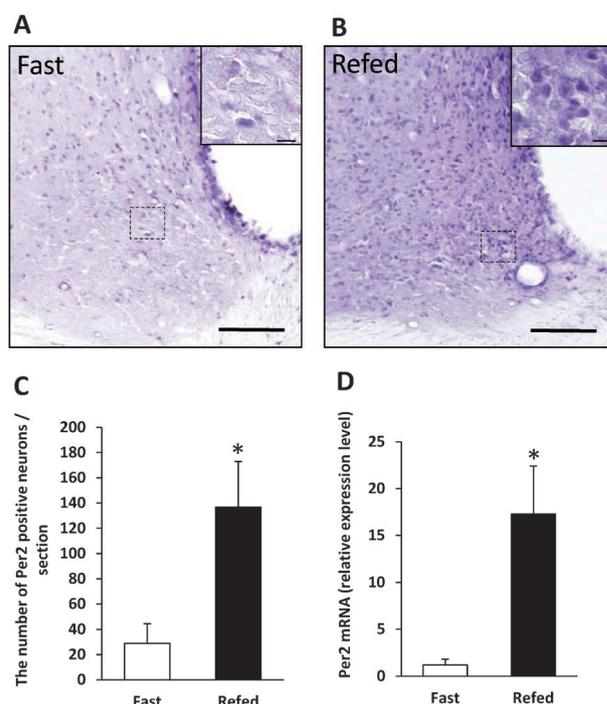


図1 絶食および再摂食後の視交叉上核(SCN)におけるPer2タンパクおよびmRNA発現

絶食をかけたラット(Fast群:A)および再摂食をかけたラット(Refed群:B)のSCNにおけるPer2陽性細胞の分布。(スケールバー=100 μ m)。図中の点線で囲んだ部分の拡大写真を右上に示した。(スケールバー=10 μ m)。C: Fast群およびRefed群のSCNにおけるPer2タンパク陽性細胞数。D: Fast群およびRefed群のSCNにおけるPer2mRNA発現量。* $p < 0.05$ 。(t-test)

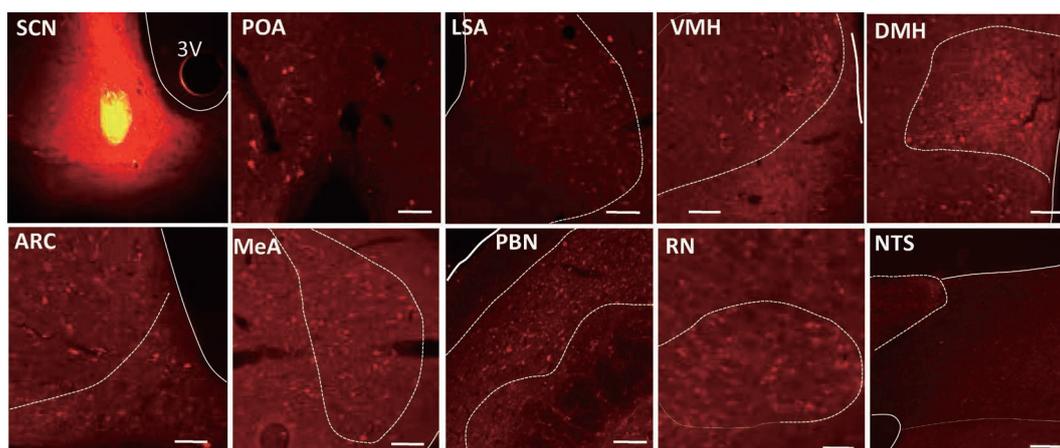


図2 SCNに逆行性トレーサー (CTB) 注入後のCTB陽性細胞発現部位

POA: 視索前野、LSA: 外側中隔核、VMH: 腹内側核、DMH: 背内側核、ARC: 弓状核、MeA: 扁桃体内側核、PBN: 傍腕核、RN: 赤核、NTS: 孤束核スケールバー=100 μ m。DMH, VMHの著しい発現が見られるが、NTSには、ほとんど発現していない。

た。その後脳を摘出し、凍結切片を作成し、対照群 (Fast群) および再摂食群 (Refed群) のSCNにおけるc-Fos、per2 mRNAおよびそのタンパク発現を調べた。14時間の絶食後、2時間の再摂食量は 3.46 ± 0.17 gであった。そのときのc-FosタンパクはSCN、弓状核 (ARC)、室傍核 (PVN)、腹内側核 (VMH)、背内側核 (DMH)、延髄の孤束核 (NTS) など摂食制御に関わる神経核を含む多くの神経核で発現が見られた。また、再摂食をさせたときのSCNにおけるPer2タンパク陽性細胞は再摂食させなかった群 (Fast群) の約4.6倍、Per2 mRNA発現は約8倍に増加していた (図1)。

2. 食事→SCN時計遺伝子変化を起こす神経経路の同定

SCNに逆行性トレーサー (cholera toxin B) を局所投与し、7日後に4%PFAにて灌流固定を行い、SCNに投射する神経核を網羅的に調べた。8匹のラットにおける扁桃皮質、脳幹部位を調べたところ、8つの神経核でそのCTB陽性細胞が見られた。特にその発現が強かったのはVMHおよびDMHの二つの神経核であった (図2)。そこでSCNにCTBを投与したラットに絶食後の再摂食を行い、c-Fos発現を調べてみると、ARCおよびDMHにおけるCTB陽性細胞にc-Fos発現が有意に増加していた (図3)。

そこでc-Fosが発現していた神経核であり、かつ顕著に発現していた神経核であるDMHにCTBを投与し、DMHに投射する神経核を調べたところ、摂食中枢の一次中枢と呼ばれるARCおよびNTSを含む12の神経核にCTB陽性細胞が見られた。さらにDMHにCTBを投

与したラットに同様に絶食後の再摂食を行い、c-Fos発現を調べてみるとARCおよびNTSのCTB陽性細胞におけるc-Fosが有意に増加していた (図4)。

3. 食事→SCN時計遺伝子変化を起こす神経経路の機能的解析

上記の実験で食事→NTS→DMH→SCN per2発現変化という神経経路が推測された。NTSには神経伝達ペプチドとして多くのニューロンが存在するがその中でも近年特にGLP-1とサーカディアンリズムの関係が示唆されている⁷⁾。さらにNTS GLP-1は満腹情報を中枢に入力する重要な因子であることが報告されている⁸⁾。そこで、DMHにGLP-1アゴニストであるExenatide-4に神経毒であるサポリンを結合させたExenatide-4-saporin (Ex4-SAP) をDMHに投与し、その後、体重、24時間の摂食リズム、自発行動量、再摂食後のc-Fos発現を調べた。DMHにEx4-SAPを投与2週間後に摂食量、行動量を調べると、DMHにEx4-SAPを投与した群では著しい過食、明期、暗期の摂食量および行動量のサーカディアンリズムが減弱/消失しており、著しい体重増加が見られた。またDMHにEx4-SAPを投与した動物に絶食および再摂食させると、control-SAPを投与した対照群と比較してSCNのc-Fos陽性細胞が減少傾向にあった。

考 察

本研究により絶食後の再摂食により、SCNのPer2遺伝子発現が誘発されることが明らかになった。これは24時間明期の条件下で、決まった時間に食事を与える

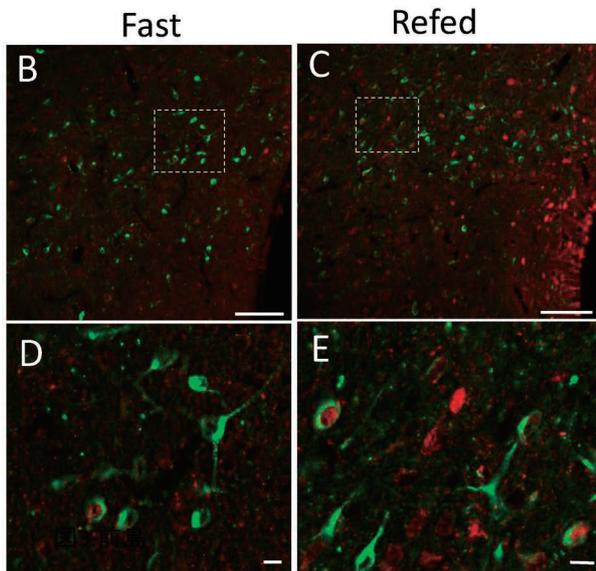
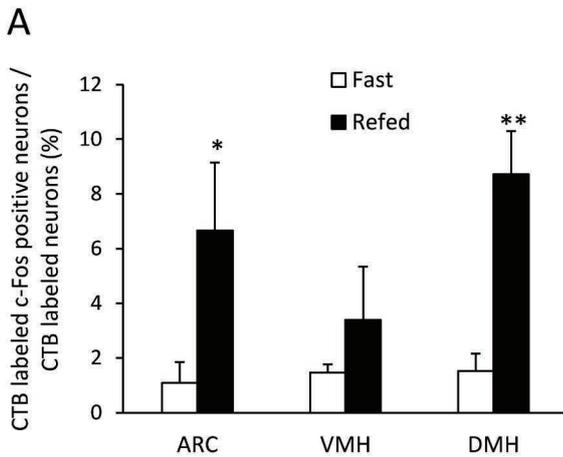


図3 SCNに投射するニューロンにおける再摂食後のc-Fos発現

A: ARC、VMH、DMHのSCN投射ニューロンにおける再摂食後のc-Fos陽性細胞数の割合。ARC、DMHのSCN投射ニューロンにおいて再摂食後のc-Fos発現率が有意に増加している(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, t -test)。B-E: DMHにおけるSCN投射ニューロンの絶食(B, D)および再摂食(C, E)時のc-Fosタンパク発現の様子。D, EはそれぞれB, Cの点線中の拡大写真。B, C:スケールバー=100 μm 。D, E:スケールバー=10 μm 。

とSCN *per2*発現リズムが回復するというLamontらの報告⁹⁾と類似している。そもそもPer2遺伝子は明期に発現が高くなることが知られており^{4,9)}、SCNのPer2遺伝子KOマウスではBMAL1等、他の重要な時計遺伝子の発現も失われることから、他の遺伝子の振動も制御する重要な因子と考えられている¹⁰⁾。またPer2 KOマウスは明期、暗期の摂食リズムが減弱している^{4,11)}。

時差症候群は体内時計と、外部環境が同調できないた

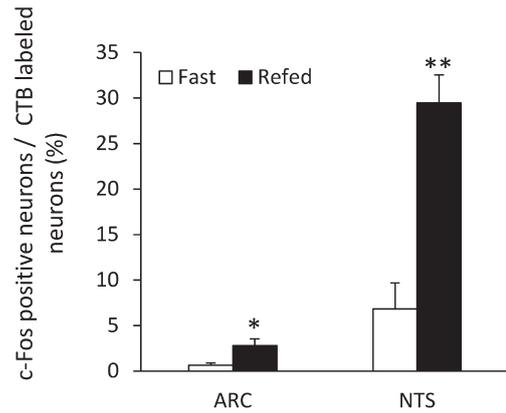


図4 DMHに投射するニューロンにおける再摂食後のc-Fos発現

ARC、NTS両方においてDMHに投射するニューロンで再摂食後に有意にc-Fos発現率の増加が見られた。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, t -test)

めにおこる心身の不調である。食事によりSCNのPer2 mRNAおよびそのタンパクの発現が誘発されることは、Per2およびその制御下の時計遺伝子発現のリセットとも解釈でき、時差症候群の解消方法として現地の時間に合わせた食事をとることが有効である⁶⁾という理由の一つを説明するものかもしれない。

さらに本研究では、食事から、このSCN Per2遺伝子変化を起こす経路の解明を目指した。SCNは結果に示したようにARC、DMH、VMHなど摂食調節に重要な神経核から強い投射を受けている。そこで本研究はSCNに投射する神経核で、かつ食事によりc-Fos発現が見られる神経核を追って、食事の刺激がSCNの遺伝子に変化を起こすと考えられる神経経路を検討した。ARCはSCNに投射しているうえに、食事による末梢情報を中枢に伝達する重要な神経核である。実際にARCのレプチン受容体を持つニューロンの欠損は、明期、暗期日の食事のリズムが消失するという報告がある¹²⁾。本研究でも、絶食後の再摂食によりSCNに投射するARCニューロンのc-Fos発現に有意な増加がみられたこと(図3)は上記の報告と一致すると考えられる。

また、本研究においてDMHにEx4-SAPを投与した動物において再摂食させると、SCNのc-Fos発現が減弱傾向にあった。このことは食事情報のSCNへの入力には上記のARC→SCNに加えてNTS GLP-1→DMHを介した入力が必要な役割を果たしていることを示唆している。すでにDMHからのSCNの抑制性入力があるSCNの遺伝子発現変化に重要であるという報告がある¹³⁾。DMHはGLP-1受容体が豊富に分布する神経核であり¹⁴⁾その投

射も豊富であることが報告されている。さらに絶食、再摂食で活性化するDMHニューロンの多くにGLP-1ニューロン線維が集中していることが報告されている¹⁵⁾。NTSはARCと同様に摂食調節の一次中枢と考えられる。ここは迷走神経の中枢への入力役割をはたしている神経核である。中枢内のGLP-1発現ニューロンはNTSのみであるといわれていることから、迷走神経を介して入力された食事情報がNTS GLP-1ニューロンを介して中枢に伝達される可能性は十分考えられる。本研究においてDMHにEx4-SAPを投与した動物に再摂食させると、SCNのc-Fos発現が減弱傾向を示したことは以上の結果とも考え合わせると食事によるNTS GLP-1→DMH→SCN Per2遺伝子発現の神経経路の活性化が推測される。本研究において少なくとも、食事がNTS→DMHを介してSCNのPer2発現を変化させていることが示唆された。今後はこの推測された神経経路のさらなる機能解析をする予定である。

要 約

現在肥満者の増加およびそれに付随する糖尿病、脂質代謝異常症、高血圧等のメタボリックシンドロームが世界中で問題になっている。近年肥満の発症には、摂食のサーカディアン（概日）リズム障害が大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった。よってメタボリックシンドロームの対策として摂食概日リズムとその形成機構の解明は極めて重要である。概日リズム創出に視交叉上核（SCN）が非常に重要な働きをすることがわかっている。本研究は食事がSCNの遺伝子発現に与える影響と、食事情報がSCN遺伝子発現変化に至る神経経路を明らかにすることを目的とした。

SCNの遺伝子変化は絶食、再摂食後のSCN遺伝子を調べたところ摂食によりSCNのPer2 mRNAおよびそのタンパク発現が有意に増加した。さらに、SCNに逆

行性トレーサー（chorela toxin-B: CTB）を投与し、再摂食後のc-Fos発現を調べたところ、背内側核（DMH）のCTB陽性細胞において有意にc-Fosの増加が見られた。さらに、DMHにCTBを投与し、同様に再摂食を行うと、延髄の孤束核（NTS）CTB陽性細胞に有意にc-Fosの増加が見られた。以上のことから、食事によるSCN Per2発現変化はNTS→DMHを介している可能性が明らかになった。今後はこの神経経路においてNTS GLP-1ニューロンの関与を中心にさらなる機能解析を行う予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団、ならびに選考に携わっていただいた諸先生方に心より深謝申し上げます。

文 献

- 1) M. Ng, et al.: *Lancet*, **384**, 766–781, 2014.
- 2) N. M. Kettner, et al.: *Cell Metab.*, **22**, 448–459, 2015.
- 3) J. Mouret, et al.: *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **45**, 402–408, 1978.
- 4) K. Bae, et al.: *Neuron*, **30**, 525–536, 2001.
- 5) F. W. Turek, et al.: *Science*, **308**, 1043–1045, 2005.
- 6) E. Challet: *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **119**, 105–135, 2013.
- 7) P. L. Brubaker, M. Gil-Lozano: *J. Diabetes Investig.*, **7**, 70–75, 2016.
- 8) J. W. Maniscalco, L. Rinaman: *Physiol Behav.*, **121**, 35–42, 2013.
- 9) E. W. Lamont, et al.: *Neuroscience*, **132**, 245–248, 2005.
- 10) P. L. Lowrey, J. S. Takahashi: *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.*, **5**, 407–441, 2004.
- 11) S. Yang, et al.: *Endocrinol.*, **150**, 2153–2160, 2009.
- 12) A. Li, et al.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **302**, R1313–R1326, 2012.
- 13) G. Acosta-Galven, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **108**, 5813–5818, 2011.
- 14) S. C. Cork, et al.: *Mol. Metab.*, **4**, 718–731, 2015.
- 15) E. Renner, et al.: *Peptides*, **35**, 14–22, 2012.