

令和元年6月21日現在

機関番号：17702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01623

研究課題名(和文) カルニチン投与は何を起しているのか？全身の代謝と中枢神経系におよぼす持続的効果

研究課題名(英文) What is the cause of carnitine administration? Prolonged effects on general metabolism and central nervous system

研究代表者

吉田 剛一郎 (YOSHIDA, Goichiro)

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・准教授

研究者番号：10274870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：カルニチン投与が全身の代謝および中枢神経系におよぼす持続的効果について検討した。カルニチン欠損JVSマウスにおいては、絶食によって自発行動量は低下した。カルニチンの1回投与により、低下した自発行動量と脂肪の消費は増加し、その投与効果は、カルニチンレベルが投与前の低いレベルに復した後も、少なくとも2日間は継続した。JVSマウスでは、絶食により視床下部外側野におけるc-Fos陽性のオレキシン神経細胞の割合は低下した(カルニチン投与によって改善した)。加えて、JVSマウスでは、絶食により数種の血中アミノ酸レベルは低下を示したが、カルニチン投与により分岐鎖アミノ酸レベルは有意に増加することを認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルニチンが脂肪酸代謝によるエネルギー産生におよぼす影響について、カルニチンそのものを欠損しているモデル動物を用いて検討することは、運動が生体内代謝におよぼす種々の効果を明らかにする中で、カルニチンのおよぼす特徴を極めて明確に示すことができると考える。運動エネルギーの獲得そのものの理解に役立つものであり、栄養学的に一流の持久性スポーツ選手の育成に必要な基礎知識を与えると考える。一方、近年、カルニチンの栄養学的必要性が認められ、疲労回復やダイエットにおける効果も強調されている。しかしながら、その機構については不明な点も多い。これらを追究することは、健康の維持・増進に必要な情報を与えると考える。

研究成果の概要(英文)：We examined the roles of carnitine in the general metabolism and the central nervous system, and the prolonged effects of carnitine administration to the fasted carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice. Fasting reduced locomotor activity (LA) of JVS mice. Single carnitine administration caused an increase of the reduced LA and the fat expenditure, and the effects were prolonged for at least two days after the administration (as low as at the original carnitine-deficient state). In JVS mice, fasting also caused a decreased percentage of c-Fos positive orexin neurons in the lateral hypothalamus (ameliorated by carnitine administration). In addition, fasting reduced several kinds of blood amino acid levels of JVS mice, but carnitine administration significantly increased branched chain amino acid levels of JVS mice.

研究分野：スポーツ生化学

キーワード：カルニチン 脂肪酸酸化 JVSマウス 絶食 オレキシン 中枢神経系 アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

持続的な運動を遂行するには、脂肪からのエネルギー産生は必要となる。脂肪酸酸化によるエネルギー産生では、その律速因子として機能するカルニチンを介して、長鎖脂肪酸アシル CoA をミトコンドリアマトリックスに取り込むことが必須となる。すなわち、カルニチンは脂肪からのエネルギー産生において必要不可欠である。しかしながら、持続的な運動を行う際、カルニチンがそのエネルギー産生におよぼす影響については、カルニチン投与を行って効果があるとするもの、効果はないとするものに分かれ、明確に出来ないというのが現状である。その詳細を明らかにするため、カルニチンを先天的に欠損し、脂肪からのエネルギー産生に支障をきたすと考えられるモデル動物、juvenile visceral steatosis (JVS) マウスを入手した。JVS マウスは、細胞膜カルニチン輸送体、organic cation/carnitine transporter novel type 2 (OCTN2)の遺伝子異常 (*slc22a5* 遺伝子産物の L352R 変異) に基づく、全身性のカルニチン欠損を呈するモデル動物である。JVS マウスは、餌を除くこと (絶食) によって、暗期活動期における自発行動量および酸素摂取量は低下する。絶食により低下した JVS マウスの自発行動量と酸素摂取量は、カルニチンの腹腔内 1 回投与により、対照マウスと差のないレベルにまで回復し、その投与効果は長期 (少なくとも 2 日間) にわたり続く。JVS マウスに投与されたカルニチンは、血中と肝臓で対照マウスのレベルにまで達する顕著な取り込みを認めるが、投与 12 時間後には元の低いレベルに復する。一方、心臓、骨格筋、精巣におけるカルニチンの取り込みは極わずかであり、脳への取り込みは認められない。脂肪酸代謝パラメーターである血中の遊離脂肪酸とケトン体、および肝臓総脂質量は、肝臓のカルニチンレベルに相応するように投与 12 時間後には全て元のレベルに復する。すなわち、血中や臓器のカルニチンレベル、および脂肪酸代謝パラメーターの変動からでは、カルニチンの自発行動量と酸素摂取量におよぼす持続的投与効果の説明は難しい。呼吸ガス分析値および尿中窒素排出量から三大栄養素 (糖質、脂肪、タンパク質) 別に消費カロリーを求めたところ、JVS マウスではカルニチン投与 2 日後においても、生理食塩水投与 JVS マウスと比較して、脂肪からのエネルギー産生は亢進を示す。さらに、カルニチン投与 36 時間後に、JVS マウスの尾静脈より ¹⁴C-palmitate を投与して、呼吸中に排出される ¹⁴C-CO₂ 発生量を測定したところ、絶食した対照マウスのレベルに匹敵する脂肪酸代謝初速度を示す。エネルギー産生面からみると、カルニチン投与を行った JVS マウスでは、血中や臓器におけるカルニチンレベルが低下した後も、長鎖脂肪酸酸化レベルは維持されている。これは、カルニチン以外にも長鎖脂肪酸の利用を律速する因子が存在することを示す。一方、JVS マウスの自発行動量低下の機構を明らかにする過程で、覚醒と関連のあるオレキシン神経活動との関係を見出した。絶食下において、JVS マウスの暗期活動期における自発行動量が低下した際、視床下部外側野における c-Fos 陽性のオレキシン神経細胞の割合は激減する。

2. 研究の目的

JVS マウスでは、投与したカルニチンが血中や肝臓において消失した後も長鎖脂肪酸酸化レベルは維持されており、エネルギー産生量の増加が自発行動量を増やす要因の一つになっていると考えられる。しかしながら、その機構については不明であるので、カルニチン投与が全身の代謝へおよぼす作用、および中枢神経系におよぼす作用について検討を行う。全身の代謝については、長鎖脂肪酸の酸化を調節する因子について検討を行う。長鎖脂肪酸酸化には、その律速因子である carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1、CPT1 の活性を阻害する malonyl-CoA が関与する。また、malonyl-CoA の調節に関与する acetyl-CoA carboxylase (ACC)、その調節には AMP-activated protein kinase (AMPK) が関与しており、AMPK 自身はレプチンと交感神経により活性化される。この一連の系について、カルニチンの持続的投与効果の認められる期間において、それぞれの変化を検討する。中枢神経系への作用については、オレキシン神経系を介した神経伝達機構について検討を行う。脳室内へのオレキシン投与によって脂肪酸酸化は持続的に活性化されることから、中枢神経系の活動には、末梢における脂肪酸酸化を調節する機能があると考えられる。したがって、JVS マウスの絶食時における自発行動量低下においては、中枢神経系、とくにオレキシン神経活動の関与を検討する必要がある。JVS マウスの自発行動量低下時において、視床下部外側野における c-Fos 陽性のオレキシン神経細胞の割合を検討する。また、オレキシン欠損症に特徴的な睡眠覚醒サイクルについて検討を行うことにより、オレキシン神経系を介した神経伝達機構の関与を明らかにする。一方、視床下部外側野におけるオレキシン産生細胞は、グルタミン酸作動性神経活動により刺激を受ける。脳における遊離およびアシルカルニチンの役割は未知であるが、アシルカルニチンの一つであるアセチルカルニチンの投与は、脳におけるグルタミン酸放出を促進することが報告されている。絶食にした JVS マウスの脳におけるカルニチンレベルは、野生型マウスに比し低いことは明らかになっており、さらに詳細な解析を進める必要があるが、絶食 JVS マウスの血中では、摂食 JVS マウスに比しグルタミン酸レベルは低いことを認めている。グルタミン酸 - オレキシン神経系を介した神経伝達機構が、長鎖脂肪酸酸化に障害のある JVS マウスにおいて変化しているのか検討を行う。

3. 研究の方法

カルニチン投与が JVS マウスの自発行動量と酸素摂取量におよぼす持続的効果について、全身の代謝および中枢神経系の両側面より検討を行う。全身の代謝については、脂肪酸酸化をターゲットにして、カルニチンの律速酵素である CPT1 のレベル、その調節に関与する AMPK の

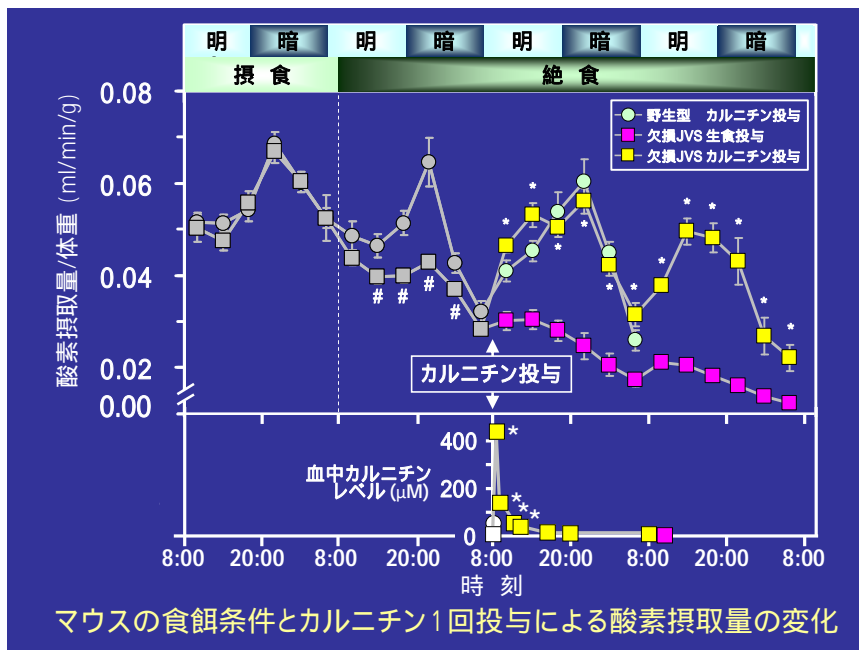
活性変化など、脂肪酸酸化の調節に関わる因子について測定を行う。中枢神経系については、オレキシン神経活動と神経伝達に関わるアミノ酸を中心に検討を行う。本研究には、細胞膜カルニチン輸送体 OCTN2 を欠損する JVS マウスと、野生型マウスを対照として用いる。本動物実験は、鹿屋体育大学動物実験指針、および鹿児島大学動物実験指針に基づき実施する。

カルニチン投与が JVS マウスの自発行動量と酸素摂取量におよぼす持続的効果について、その詳細なメカニズムの検討を進める。カルニチンの JVS マウスに対する持続的投与効果の認められる期間において、カルニチンの律速酵素 CPT1 の変化について検討を行う。肝臓における CPT1 レベルについて、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により分析を行う。上流に位置する AMPK の変化については、そのリン酸化を免疫抗体法により分析する。カルニチンの自発行動量・酸素摂取量におよぼす持続的投与効果と中枢神経系については、その指標となるオレキシン神経活動について検討を行う。脳内神経活動の指標となる c-Fos を発現した視床下部外側野のオレキシン神経細胞について、灌流固定後、切片を作成し、それぞれの抗体を用いた二重免疫染色法により検討を行う。一方、オレキシシグナルの低下については、その裏付けとなる睡眠覚醒サイクルについて検討を行う。マウスの睡眠覚醒サイクルについて、EEG/EMG を測定することにより覚醒、REM 睡眠および non-REM 睡眠に分類し分析を行う。JVS マウスにおけるカルニチンの持続的投与効果について、オレキシン神経系を介した神経伝達機構の関与を明らかにする。また、カルニチンの持続的投与効果と、グルタミン酸 - オレキシン神経系を介した神経伝達機構の関係について検討するため、グルタミン酸を含む一連のアミノ酸分析を行う。JVS マウスと対照マウスについて、摂食下、および絶食下におけるカルニチン投与の条件下、それぞれのマウスの血液と臓器を採取する。採取したサンプルは、直ちにフリーズクランプを行う。そのサンプルについて、除タンパク処理後、前処理を行い、高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS) を用いてアミノ酸の測定を行う。

4. 研究成果

マウスの食餌条件と、カルニチンの腹腔内1回投与による体重あたりの酸素摂取量の変化は、図に示すとおりである。摂食下では、JVSマウスと対照マウスとの間に変化は認めない。一方、JVSマウスは、絶食によって、暗期活動期における酸素摂取量は低下する。絶食により低下したJVSマウスの酸素摂取量は、カルニチンの腹腔内1回投与により、対照マウスと差のないレベルにまで回復し、その投与効果は長期（少なくとも2日間）にわたり続く。この時、JVSマウスに投与されたカルニチンは、血中と肝臓で対照マウスのレベルにまで達する顕著な取り込みを認め

たが、投与12時間後には元の低いレベルに復する(図)。他の臓器では、カルニチンの顕著な取り込みは認めない。脂肪酸代謝パラメーターである血中の遊離脂肪酸とケトン体、および肝臓総脂質量は肝臓のカルニチンレベルに相応するように投与12時間後には全て元のレベルに復する。すなわち、これらのパラメーターの変動からでは、カルニチンの自発行動量と酸素摂取量におよぼす持続的投与効果の説明は難しい。



JVSマウスの自発行動量、および酸素摂取量の持続的な増加の要因として考えられるエネルギー産生の亢進について、エネルギー・センサーであるAMPKについて測定を試みたところ、その下流に位置するACCとともに、リン酸化レベルは特定できなかった。AMPKの上流にあり、交感神経系を刺激して脂肪酸代謝系を賦活化する、5-Aminoimidazole-4-carboxamide-beta-D-ribofuranoside (AICAR) の投与を行い、自発行動量、酸素摂取量におよぼす影響を検討した。しかしながら、AICAR投与は、糖代謝におよぼす影響が大きく、低血糖状態にある絶食JVSマウスに適用することは困難であった。交感神経系において、AMPKの上流に位置するレプチンについて検討したところ、JVSマウスへのカルニチン投与後に、血中レプチンレベルは増加を示した。その意義としては、AMPKを活性化し、その下流にあるACC、およびmalonyl-CoAが調節を受けて、カルニチンの律速酵素であるCPT1を活性化し、持続的なβ酸化を生じることにあると考える。レプチンに加えて、血中アシルグレリンのレベルも変化したが、食欲に関すること以外にその意義は不明である。

エネルギー不足がJVSマウスの自発行動量に影響をおよぼすのかを検討するため、変動の大きい暗期20時から23時の3時間における自発行動について、ショ糖および中鎖脂肪酸(MCT)の投与効果を検討した。MCTは、JVSマウスでは代謝可能であることを肝臓の還流実験でケトン体が生成されることにより確認している。カルニチンを投与したJVSマウスの自発行動量は、対照マウスのレベルにまで上昇を示した。ショ糖の経口投与を12時、16時、20時の3回行うと、自発行動量は生食投与を行ったJVSマウスと比較して有意に上昇を示した。しかしながら、同様に絶食JVSマウスにMCTを経口投与した結果、低下した自発行動量を増やすには至らなかった。一方、同様の実験条件において、12時から20時までの酸素摂取量を測定した結果、絶食JVSマウスの生食投与群と比較し、ショ糖およびMCT投与群ともに酸素摂取量は有意に増加した。このことは、投与されたショ糖に加えて、自発行動量を増やすまでには至らなかったMCTも、エネルギー産生には利用されていることを示す。また、血中パラメーターが自発行動量の規定要因になっているのかということについて、血糖や血中遊離脂肪酸レベルと、暗期3時間の自発行動量との関係を検討したところ、高い相関は認められなかった。すなわち、JVSマウスについては、エネルギー不足のみにより自発行動の低下が起きているのではない。そこで、中枢神経刺激作用のあるモダフィニルを、絶食JVSマウスに対して18時に腹腔内投与し、自発行動量におよぼす効果を検討した。低下したJVSマウスの暗期の自発行動量は、モダフィニルの投与によって回復を示した。すなわち、エネルギー不足の状況下でも、JVSマウスの自発行動量は上昇することを示したものである。それ故、中枢神経系において覚醒を司るオレキシンについて、JVSマウスの視床下部外側野におけるc-Fosポジティブなオレキシン神経細胞の割合を検討した。摂食21時の条件下と比較して、絶食21時におけるJVSマウスのc-Fosポジティブなオレキシン神経細胞の割合は激減した。そこでc-Fosポジティブなオレキシン神経細胞の割合と、暗期3時間の自発行動量との関係を検討した。絶食JVSマウスでは、暗期3時間の自発行動量が低下しており、かつc-Fosポジティブなオレキシン神経細胞の割合も5%と低下を示した。しかしながら、カルニチン投与を行ったJVSマウスでは、摂食JVSマウスのレベルにまで回復を示した。暗期3時間の自発行動量とc-Fosポジティブなオレキシン神経細胞の割合の関係は高い相関($r=0.90$)を示しており、JVSマウスの自発行動には、オレキシン神経活動が関与していることを示す。絶食JVSマウスでは、オレキシンシグナルが低下していたことから、その裏付けとして、脳波および筋電図を用いて、睡眠覚醒サイクルについて検討を行った。絶食JVSマウスでは、暗期の覚醒期に覚醒レベルが低下し、ノンレム波の出現が認められた。ヒプノグラムでは、摂食条件下ではほとんど認められない消灯後のレムおよびノンレム波が、絶食したJVSマウスの暗期覚醒期において頻発しており、覚醒のフラグメンテーション化が認められた。これらは、オレキシン欠損マウスと同様の睡眠パターンを示しており、絶食JVSマウスでは、オレキシンシグナルが低下していることの裏付けとなるものである。以上の結果は、絶食JVSマウスで低下する自発行動量には、オレキシン神経活動の低下が関与することを示す。

視床下部外側野におけるオレキシン産生細胞は、グルタミン酸作動性神経活動により刺激を受ける。それ故、JVSマウスの自発行動量と酸素摂取量に対するカルニチンの持続的投与効果の認められる期間について、神経系を賦活化するグルタミン酸を含む各種アミノ酸の変化について検討を行った。血中において、摂食時と比較して、絶食時に有意に低下したアミノ酸は、対照マウスでは、トリプトファン、システインであった。JVSマウスにおいて低下を示したアミノ酸は、グルタミン、アルギニン、グリシン、アラニン、セリン、アスパラギン、スレオニン、プロリン、メチオニン、バリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トリプトファン、リシン、イソロイシン、チロシン、オルニチンであった。一方、絶食時に増加を示したアミノ酸は、対照マウスではフェニルアラニンのみ、JVSマウスではシステインのみであった。また、カルニチン投与によって変化を示したアミノ酸は、対照マウスでは存在せず、JVSマウスでは、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、システイン、オルニチンであった。すなわち、グルタミン酸など多数の血中アミノ酸は、絶食により有意な低下を示した。一方、JVSマウスでは、カルニチン投与により、分岐鎖アミノ酸を中心とする数種の血中アミノ酸が有意に増加することを認めた。カルニチン投与によって変化を示すこれらのアミノ酸が、オレキシン神経活動におよぼす影響についてはさらに検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Monma T, Ando A, Asanuma T, Yoshitake Y, Yoshida G, Miyazawa T, Ebine N, Takeda S, Omi N, Satoh M, Tokuyama K, Takeda F. Sleep disorder risk factors among student athletes. *Sleep Med*, 44: 76-81, 2018, 査読有, doi:10.1016/j.sleep.2017.11.1130

Senpuku H, Miyazaki H, Yoshihara A, Yoneda S, Narisawa N, Kawarai T, Nakagawa N, Miyachi M, Tada A, Yoshida G, Shimada M, Ohashi M, Nishimuta M, Kimura Y, Yoshitake Y. CD56(dim)CD16(high) and CD56(bright)CD16(-) cell percentages associated with maximum knee extensor strength and incidence of death in elderly. *Springerplus*, 5: 244, 2016, 査読有, doi:10.1186/s40064-016-1884-3

Roussel J, Labarthe F, Thireau J, Ferro F, Farah C, Roy J, Horiuchi M, Tardieu M, Lefort B, Francois Benoist J, Lacampagne A, Richard S, Fauconnier J, Babuty D, Le Guennec JY. Carnitine deficiency induces a short QT syndrome. Heart Rhythm, 13: 165-174, 2016, 査読有, doi:10.1016/j.hrthm.2015.07.027

堀内正久, 中熊美和, 有村恵美, 牛飼美晴, 吉田剛一郎. 実験研究による解析, 食と生活習慣関連疾患 (心疾患・脂肪肝・疲労病態). 日本衛生学雑誌, 70: 110-114, 2015, 査読有.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐伯 武頼

ローマ字氏名：SAHEKI, Takeyori

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：客員研究員

研究者番号 (8桁)：10056070

研究分担者氏名：堀内 正久

ローマ字氏名：HORIUCHI, Masahisa

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：50264403

研究分担者氏名：吉武 裕

ローマ字氏名：YOSHITAKE, Yutaka

所属研究機関名：鹿屋体育大学

部局名：スポーツ人文・応用社会科学系

職名：教授

研究者番号 (8桁)：00136334

(2)研究協力者

研究協力者氏名：牛飼 美晴

ローマ字氏名：USHIKAI, Miharuru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。