

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11492

研究課題名(和文) カルニチンの持続的投与作用：全身の代謝と中枢神経系におよぼす分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of prolonged effect of carnitine administration on whole-body metabolism and the 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：カルニチンの持続的投与作用について、全身の代謝と中枢神経系におよぼす分子機構より検討を行った。カルニチン欠損JVSマウスの自発行動量は、絶食により低下した。低下した自発行動量は、カルニチンの1回投与により増加し、少なくとも2日間継続した。この時、全身の代謝について、カルニチンは律速になっていなかった。中枢神経系においては、絶食により低下した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、カルニチン投与によって増加した。しかしながら、脳におけるグルタミン酸レベルの変化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルニチンの自発行動量におよぼす持続的投与作用について、カルニチン自体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影響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られる。

研究成果の概要(英文)：We examined the molecular mechanisms of prolonged effect of carnitine administration on whole-body metabolism and the central nervous system. Fasting reduced locomotor activity (LA) of carnitine-deficient JVS mice. The reduced LA was increased by a single carnitine administration and prolonged for at least 2 days. At this time, carnitine was not rate-limiting for whole-body metabolism. In the central nervous system, the percentage of c-Fos positive orexin neurons in the lateral hypothalamus, which was reduced by fasting, was increased by carnitine administration. However, no change was observed in glutamate levels in the brain.

研究分野：総合領域

キーワード：カルニチン 脂肪酸代謝 JVSマウス 絶食 中枢神経系

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸代謝によるエネルギー産生においては、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要となる。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須となる。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が必要である。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、呼気中に排出される ¹⁴C-CO₂ 発生量を測定したところ、絶食を施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体内から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、脂肪酸酸化ターゲットとして、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、対照として野生型マウスを用いる。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、オレキシン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

マウスの体重あたりの酸素摂取量について、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かった。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した。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)にわたって続いた。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した。他の臓器では、カルニチンの顕著な取り込みは認めなかった。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した。すなわち、これらのパラメーターの変動からでは、カルニチンの酸素摂取量および自発行動量におよぼす持続的投与効果の説明は難しい。

JVS マウスの酸素摂取量、および自発行動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。そこで、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、糖質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。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済みである。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たことを裏付けるものである。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こっているの

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す。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、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。血液、脳、肝臓ともに、絶食により野生型マウスでは数種、JVS マウスでは多種のアミノ酸が低下を示した。絶食の条件下、カルニチン投与により増加を示したアミノ酸は、野生型マウスでは脳の 2 種 (シトルリン、アスパラギン)、JVS マウスでは血液の 4 種 (ロイシン、イソロイシン、スレオニン、オルニチン)、脳の 3 種 (グルタミン、アルギニン、リシン)、肝臓の 2 種 (グルタミン酸、システイン) であった。オレキシンの分泌を促進して中枢神経系を賦活化するグルタミン酸について、カルニチン投与による JVS マウスの脳における変化は認めなかった。一方、肝臓におけるグルタミン酸は、カルニチン投与により有意な増加を示したことから、糖新生経路を介してエネルギー産生に寄与した可能性はある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 YOSHIDA Goichiro, TOKUMARU Akira, MAESAKA Shigeaki, TAKENAKA Kentaro, SHIMOKAWA Mika, HIGASHIONNA Akiyo, MATSUMOTO Takahide, YOSHITAKE Yutaka	4. 巻 63
2. 論文標題 Water balance in Japanese male kendo college athletes during training: a pilot study assessing seasonal differences with adjusted energy expenditure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness	6. 最初と最後の頁 609-616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.23736/S0022-4707.22.14235-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 YOSHIDA Goichiro, NAGAO Naruhiko	4. 巻 183
2. 論文標題 Changes in urinary serotonin levels during a kendo competition involving mental stress: a study on top-level male Japanese university kendo athletes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牛飼美晴、小牧祐雅、吉田剛一郎、堀内正久
2. 発表標題 脂肪酸代謝障害におけるストレス脆弱性の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀内 正久 (Horiuchi Masahisa) (50264403)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐伯 武頼 (Saheki Takeyori) (10056070)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	牛飼 美晴 (Ushikai Miharuru) (70232816)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関