

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790195  
 研究課題名（和文）時計遺伝子および摂食ペプチドによる時間特異的体温調節システムの解明

研究課題名（英文） Role of clock genes and feeding peptides on circadian thermoregulation

研究代表者  
 時澤 健（TOKIZAWA Ken）  
 早稲田大学・人間科学学術院・助手  
 研究者番号：00454083

研究成果の概要（和文）：生物時計によるリズム形成機構は、分子レベルで明らかにされつつある。しかし、この生物時計の分子メカニズムが実際の生理学的、行動のリズムをいかに調節しているのかは明らかではなかった。本研究では体温とエネルギー代謝の概日リズム調節に注目し、時計遺伝子の *Clock* と摂食ペプチドのグレリンが昼と夜の調節を行うために必要であり、視床下部の神経活動を調節しながらリズムを生み出していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The circadian rhythm of body temperature is a well-known phenomenon. However, it is unknown how the circadian system including the suprachiasmatic nucleus and clock genes affects thermoregulation. This study demonstrated that the circadian system per se is influenced by both the feeding condition and environmental temperature and that it modulates thermoregulation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：温熱生理学、生体リズム、生物時計、摂食調節、自律神経調節

## 1. 研究開始当初の背景

生物時計によるリズム形成機構は、分子レベルで明らかにされつつある。しかし、この生物時計の分子メカニズムが実際の生理学的、行動のリズムをいかに調節しているのかは明らかではない。特に概日リズムの代表的なパラメーターである体温リズムは、熱産生（代謝）と熱放散のバランスにより成立する

複雑なものであり、かつリズムそのものの生理学的意義は明らかではない。

## 2. 研究の目的

(1) 体温概日リズムにおける、活動期と非活動期で変化すると予想される調節メカニズムへの時計遺伝子の 1 つ *Clock* の関与を明らかにすること。

(2)摂食ペプチド(レプチン、グレリン)は時間特異的体温調節システムを修飾する因子であるか否かを明らかにすること。

### 3. 研究の方法

(1) 2~4 ヶ月令の ICR 系統の野生型雄マウスを、27°C の環境温において 12 時間の明暗サイクル(午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯)で飼育した。体温と活動の概日リズムが確認されたのちに、2 日間の絶食を行った。絶食開始時刻は午前 9 時もしくは午後 9 時とし、各この時間の 47 時間後、午前 8 時(明期)と午後 8 時(暗期)に、20°C、180 分間の中程度寒冷暴露を行った。この間の体温および酸素摂取量をテレメトリーおよび間接的カロリーメトリーにてそれぞれ測定した。

寒冷暴露終了直後に灌流固定した脳を採取し、神経活動マーカーである cFos の免疫組織化学染色を行った。また、時計遺伝子 Clock 変異マウスを用いて、野生型と同様の絶食および寒冷暴露プロトコルを行った。cFos の免疫組織化学染色により、関連する視床下部内の神経核を特定したのちに、時計中枢である視交叉上核からの出力経路について検証した。逆行性の神経トレーサーであるコレラトキシン B を投与し、視交叉上核での発現を観察し、さらに cFos および GABA の合成酵素である GAD 65 の免疫組織化学染色を行った。

(2) 野生型およびレプチンを欠損する ob/ob マウスを、27 °C の環境温で 12h-12h の明暗サイクル(午前 7 時(ZT0)点灯, 午後 7 時(ZT12)消灯)で飼育した。体温および活動量の概日リズムが確認された後、20 °C の寒冷暴露を明期(ZT1~4)または暗期(ZT13~16)に行った。

また野生型マウスにおいて、腹腔内にグレリン(8 nmol)を ZT1 または ZT13 に投与し、10 の寒冷暴露を明期(ZT2~4)または暗期(ZT14~16)に行った。対照として、生理食塩水を投与する試行も行った。

両実験において、寒冷暴露時の深部体温と活動量をテレメトリー、酸素摂取量を間接的カロリーメトリーにてそれぞれ測定した。また寒冷暴露直後に脳を採取し、神経活動のマーカーである c-Fos 蛋白の免疫組織化学染色を行った。

### 4. 研究成果

(1) 野生型マウスにおいて、明期寒冷暴露時には、体温は 30 分目以降に有意に低下し(5.5 ± 2.0 °C)、酸素摂取量に変化はみられなかった。一方、暗期寒冷暴露時には、130 分目以降に有意に低下し(2.0 ± 0.5 °C)、酸素摂取量は有意に増加した(9.4 ± 2.4 mL/min/kg)。体温の低下は明期が暗期と比較

して有意に大きく( $p < 0.05$ )、酸素摂取量の増加は暗期が明期と比較して有意に大きかった( $p < 0.05$ )。

視床下部の cFos 蛋白免疫陽性細胞数(cFos-IR)において、内側視索前野および室傍核では、暗期寒冷暴露後に有意に増加したのに対して、明期寒冷暴露後には有意な変化はみられなかった。視床下部背内側核および弓状核においては、暗期寒冷暴露後および暗期寒冷暴露後ともに増加したものの、暗期が明期と比較して有意に大きかった。明期にのみ活動する視交叉上核においては、絶食によって有意に増加し、さらに絶食中寒冷暴露後に有意に増加した。

Clock 変異マウスにおいては、明期寒冷暴露時と暗期寒冷暴露時ともに体温は有意に低下したものの(明期: 1.8 ± 0.6 °C、暗期: 2.4 ± 0.9 °C)、明期と暗期の間に有意な差はみられなかった。また酸素摂取量は明期寒冷暴露時と暗期寒冷暴露時ともに有意に増加し(明期 10.4 ± 2.8 mL/min/kg、暗期: 17.7 ± 2.9 mL/min/kg) その増加は暗期が明期と比較して有意に大きかった( $p < 0.05$ )。野生型と Clock 変異マウスの寒冷暴露時の体温および酸素摂取量の応答を比較すると、暗期では差は見られなかったが、明期では体温の低下は野生型の方で有意に大きく( $p < 0.05$ )、酸素摂取量の増加は Clock 変異マウスの方で有意に大きかった( $p < 0.05$ )。

視交叉上核以外の神経核において、cFos-IR は明期と暗期で差は認められなかった。野生型と比較すると、内側視索前野および室傍核において、野生型明期と比較して Clock 変異型の方で有意に cFos-IR は多かった。

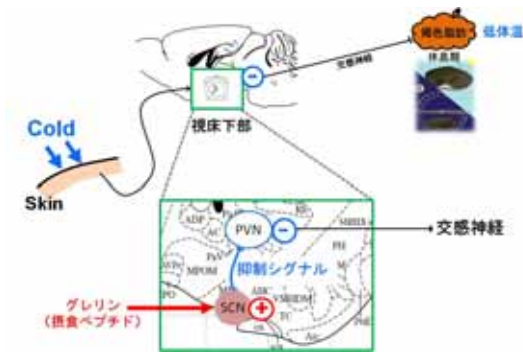
コレラトキシン B を室傍核に投与し、視交叉上核での発現を cFos と同時に観察したところ、二重に発現していた神経細胞は、野生型の絶食状態において、自由摂食および Clock 変異型と比較して多かった。また二重に発現していた神経細胞のまわりに GAD 65 の発現も観察された。

(2) 野生型マウスにおいては明期と暗期ともに、寒冷暴露によって深部体温は変化しなかった。また酸素摂取量は有意に増加した。ob/ob マウスにおいて、寒冷暴露により深部体温は有意に低下した。明期と暗期の間で有意な差は認められなかった(明期、3.8 ± 0.8 ; 暗期 2.1 ± 0.3 )。寒冷暴露によって酸素摂取量は増加したものの、野生型と比較して有意に低かった。c-Fos 蛋白の免疫陽性細胞数は、視床下部のいずれの神経核においても野生型と ob/ob マウスの間で有意な差は認められなかった。グレリンを投与した野生型マウスにおいて、明期の寒冷暴露によ

て深部体温は生理食塩水投与と比較して有意に低下した。また酸素摂取量は増加したものの、生理食塩水投与と比較して有意に低かった。

一方暗期においては、グレリン投与と試行の寒冷暴露によって深部体温は低下せず酸素摂取量は有意に増加し、生理食塩水投与との間に有意な差は認められなかった。c-Fos 蛋白の免疫陽性細胞数は、視交叉上核において明期にグレリン投与によって有意に増加した。また弓状核においては、明期と暗期ともにグレリン投与によって c-Fos 蛋白の免疫陽性細胞数は増加したものの、暗期の方で増加は大きかった。室傍核において、グレリン投与のみでは c-Fos 発現は見られなかったものの、グレリン投与で寒冷暴露を行った暗期においては、c-Fos 蛋白の免疫陽性細胞数は有意に増加した。

以上のことから、以下のような視床下部内のネットワークにより昼と夜の体温調節が引き起こされていることが明らかとなった。



( 図中、PVN 室傍核、SCN 視交叉上核 )

絶食に伴ういかなる変化が体温のリズム変調をきたすのか、また生物時計 ( 遺伝子 ) の発現に変化をきたすのか、本研究はこの疑問に答え、摂食と体温、そして生物時計との関連性について新たな研究分野を展開するための基礎となる。本研究は、明暗周期によって分けられる活動期と非活動期、それぞれの位相間での体温調節反応の差異を検証した。代謝、内分泌、摂食機能もこの位相間で変化することから、体温概日リズムの生理学的意義を考える上で、リズム形成のみならず位相間の調節システム自体の違いを検証する試みは過去に例がなかった。温度は細胞、分子レベルの生体機能に影響する因子でもあり、さまざまな行動および生理現象の概日リズムと関連すると考えられる。したがって、本研究で用いる絶食による体温低下モデルは、他の生体機能と体温リズムの関連性を知る上で重要な知見となった。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ( 査読有り ) ] ( 計 1 件 )  
Tokizawa K, Uchida Y, Nagashima K.  
 Thermoregulation in the cold changes depending on the time of day and feeding condition: physiological and anatomical analyses of involved circadian mechanisms. *Neuroscience*. Vol.164 No.3, 2009, pp.1377-86.

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )  
 日本時間生物学会 ( 2009 年 10 月、大阪 )  
 レプチンおよびグレリンが絶食時の時間特異的体温調節反応に及ぼす影響  
 時澤健、尾上侑己、内田有希、森久恵、中村真由美、永島計

日本体力医学会 ( 2009 年 9 月、新潟 )  
 レプチンが寒冷時体温調節反応および絶食時日内休眠に及ぼす影響  
 時澤健、永島計

International Union of Physiological Sciences ( 2009 年 8 月、京都 )  
 Time-dependent changes in thermoregulation during cold exposure in fasted mice  
K Tokizawa, Y Uchida, K Nagashima

International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation ( 2009 年 7 月、島根 )  
 CLOCK GENE PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN CIRCADIAN CHANGES IN THERMOREGULATION DURING FASTING IN MICE  
K Tokizawa, Y Uchida, K Nagashima

Experimental Biology 2009 ( 2009 年 4 月、ニューオリンズ、アメリカ )  
 Clock gene plays an important role in time-dependent change in thermoregulation during cold exposure in fasted mice  
K Tokizawa, Y Uchida, K Nagashima

日本時間生物学会 ( 2008 年 11 月、岡山 )  
 絶食時の体温概日リズム調節機構の解明  
 時澤健、内田有希、永島計

日本神経科学会 ( 2008 年 7 月、東京 )  
 Fasting affects thermoregulation and hypothalamic Fos expressions in the cold, depending on time of the day  
K Tokizawa, Y Uchida, K Nagashima

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

時澤 健 (TOKIZAWA KEN)

早稲田大学・人間科学学術院・助手

研究者番号：00454083