

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21730595

研究課題名 (和文) 脳内脂質代謝の中樞作用とその機構

研究課題名 (英文) Central action of lipid metabolism in the brain

研究代表者

近久 幸子 (CHIKAHISA SACHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00452649

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、脳内エネルギー代謝と睡眠などの高次脳機能との関連メカニズムについて明らかにすることを目的とした。脂質代謝と密接な関連のある PPARs や AMPK のアゴニストや活性薬はマウスの睡眠を深くするとともに、情動行動にも影響を及ぼした。また絶食後の再摂餌の時間を調節することで、その後の睡眠の深さに変化が認められた。本研究の結果から、脳内脂質代謝は中枢の PPARs や AMPK を介して、睡眠や情動系などの脳機能の調節に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated the contribution of central energy metabolism to higher brain functions, focusing in particular on AMPK and PPARs. PPARs and AMPK are involved in the stimulation of lipid metabolism. We used several drugs that activate PPARs and AMPK. After injection of these drugs, sleep depth and anxiety level were changed. In addition, feeding schedule can alter sleep quality by affecting metabolic function. PPARs and AMPK may play a significant role in the interaction of lipid metabolism and brain function including sleep homeostasis and common neurobehavior.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：社会科学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：生理・脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠障害・情動障害などの中枢性疾患と生活習慣病は近年増加の一途をたどっている疾患である。これら現代特有の病ともいえる疾患について関連メカニズムを明らかにす

ることは、治療法や新薬の開発という点からみても極めて重要な課題といえる。睡眠・概日リズムと摂食・エネルギー代謝との関連性については、これまでも様々な報告がなされてきた。

脂肪酸をリガンドとする核内受容体

peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) は、脂質や糖代謝に関わる各種酵素などの転写因子であり、その人工リガンドは高脂血症薬として汎用されている。最近になって申請者らは、高脂血症治療薬として広く用いられており、PPARs のリガンドであるベザフィブラートが、体温低下や睡眠の位相前進を引き起こし、さらには睡眠の深さを示すノンレム睡眠期の脳波に含まれるデルタ波を増大させるとともに、断眠後のリバウンドを消失させることを発見した (Chikahisa S et al., *Endocrinology*, 2008)。この発見は、不眠症やエネルギー代謝に関わる様々な疾患の新規治療法開発に繋がるものと期待される。しかしながら、PPARs が睡眠制御に関わるメカニズムや、情動行動や記憶・学習などの高次脳機能における役割については全く解っていない。

一方、近年、エネルギー代謝を制御する因子として、視床下部の AMP-activated protein kinase (AMPK) が注目されている。AMPK は細胞内 AMP 濃度の上昇 (あるいは ATP の減少) によって活性化し、脂肪合成を抑制するとともにミトコンドリアにおける脂肪酸酸化を促進するなど、エネルギー要求度に応じて代謝を制御するためメタボリックセンサーとよばれている。薬理的に脳内の AMP を低下させることで、断眠後と同様、ノンレム睡眠期のデルタパワーが増大することが報告されている (Kalinchuk et al., *Eur J Neurosci*, 2003)。AMP の低下は AMPK の抑制につながるため、脳内のエネルギー代謝の変化が睡眠のホメオスタシスに關与している可能性が考えられる。また、AMPK が PPAR を活性化するという報告もあることから (Lee et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2006)、睡眠制御と中枢エネルギー代謝は AMPK を介して相互に関連しあっているものと推察される。

## 2. 研究の目的

本研究は、PPARs や AMPK の働きを中心に、脳内脂質代謝の、情動系、記憶・学習、睡眠制御など中枢神経系における役割を解明することを目的とする。特に、PPARs の各サブタイプ ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) ごとの睡眠制御への関与、中枢脂質代謝に関わる物質のアゴニストおよびアンタゴニストの投与や PPARs のサブタイプのひとつである PPAR $\alpha$  と AMPK の両方を活性化する絶食に対する中枢機能変化などを検討することにより、これまで知られていなかった脂質代謝の脳機能における役割とメカニズムを解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 睡眠制御における PPARs リガンド投与の影響とサブタイプの同定

実験は ICR 系オスマウスを用いた。PPARs のパンアゴニストであるベザフィブラートおよび PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$  のそれぞれの選択的リガンドについて、脳室内投与を行い、睡眠・覚醒量、ノンレム睡眠期の脳波デルタパワー、体温、血圧を測定した。また、これらの薬物を投与した時の、記憶・学習能や情動系を測定するための行動実験も行った。

### (2) AMPK の睡眠制御における役割

実験は ICR 系オスマウスを用いた。AMPK と睡眠のホメオスタシス機構との関わりを調べるため、6 時間の断眠を行ったマウスの視床下部における、AMPK 活性を測定した。また、AMPK の阻害薬 (Compound C) および、活性化させる薬 (AICAR) をマウスの脳室内に投与し、睡眠 (脳波、筋電図)、体温 (テレメトリーシステムによる腹腔内体温) を記録した。さらに、Compound C や AICAR の中枢投与を行った後に断眠を行い、断眠後のノンレム睡眠のリバウンドや体温変化について比較した。

### (3) 絶食に対する睡眠変化

PPARs のサブタイプの一つである PPAR $\alpha$  は絶食などの飢餓状態で活性化される。また、AMPK も絶食によって活性化され、摂食行動を起こす因子として知られている、そこで、ICR 系オスマウスを用いて、PPAR $\alpha$  と AMPK の両方を活性化する絶食を行ったときに睡眠・覚醒、体温、行動量がどのように変化するかについて、下記の条件で検討を行った。また、PPAR $\alpha$  は概日リズムとの関連性も指摘されているため、絶食 (Fasting) および再摂餌 (Refeeding) の時間を ZT 1、ZT7、ZT12 の 3 パターン設定した。

1 日目: Baseline 記録

2 日目: Fasting 開始 (ZT 1 および ZT12)

3 日目: Refeeding (ZT 1、ZT7 および ZT12)

さらに、それぞれの条件下において、摂食行動と関連のある視床下部の Neuropeptide Y や nitric oxide synthetase (NOS) などの mRNA の発現および、血中のグルコース、遊離脂肪酸、トリグリセリドについて測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 睡眠制御における PPARs リガンド投与の影響とサブタイプの同定

PPARs のパンアゴニストであるベザフィブラートを脳室内に投与したところ、睡眠量に変化は認められなかったが、ノンレム睡眠期

の脳波デルタパワーの増大が認められた。しかし、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ のそれぞれのサブタイプごとの選択的アゴニストの脳室内投与では、睡眠・覚醒量、デルタパワーともに変化が認められなかった。したがって、ベザフィブラートの中枢作用による睡眠変化は、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ のいずれかのサブタイプによる相互作用の可能性が示唆された。

一方、ベザフィブラートを2週間投与した後に記憶・学習能や情動系を測定するための行動実験を行った結果、ベザフィブラートの投与により、不安を軽減させる傾向が認められた。しかし、記憶、学習能への影響は認められなかった。

## (2) AMPKの睡眠制御における役割

6時間の断眠は、マウスの視床下部のAMPKを活性化するとともに、AMPKシグナリングの上流にあるCa<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$  (CaMKK2)や下流にあるCarnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)を増大させた(図1参照)。

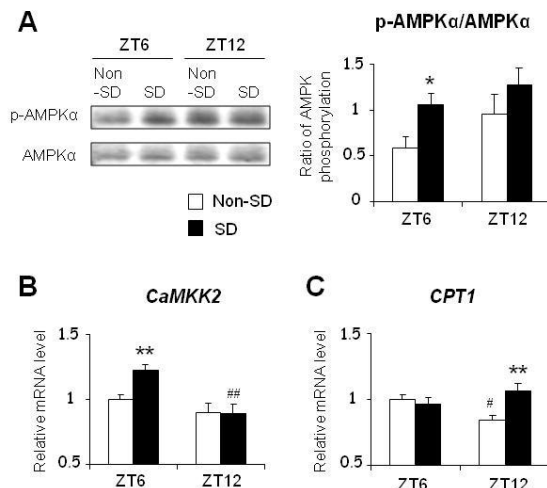


図1. 6時間の断眠(SD)によるマウス視床下部のAMPKシグナリングの変化。A: AMPK活性(Western-blotting)、B: CaMKK2 mRNA、C: CPT1 mRNA (real-time RT-PCR) (Chikahisa et al, *Neuropharmacology*, 2009)

さらに、AMPKの阻害薬(Compound C)はノンレム睡眠時の脳波デルタパワーを減少させたのに対し、AMPKを活性化させる薬(AICAR)はデルタパワーを増大させた。このことから、AMPKの活性化は睡眠を深くする方向に働くことが明らかとなった。また、Compound CやAICARの中枢投与は断眠後のリバウンドを減弱したことから、中枢のAMPKは睡眠のホメオスタシス機構にも関与していることが確認された。

AMPKはエネルギー代謝を制御するセンサーとして注目されているが、多くの報告が肝臓や筋についての研究であり、中枢神経系での機能については摂食行動を除いてほとんど研究されていなかった。また、睡眠不足が、食欲やエネルギー代謝に影響を及ぼし糖尿病をはじめとする生活習慣病のリスク増大につながることは現象としては指摘されてきたが、そのメカニズムは全く不明であった。そのため、AMPKによる睡眠の制御に関しては、我々の報告が世界で初めてであり、独創的な研究テーマである。

## (3) 絶食に対する睡眠変化

FastingをZT1に開始しRefeedingをZT1に行った場合、Refeeding後に脳波デルタパワーの顕著な増大が認められた(図2参照)。

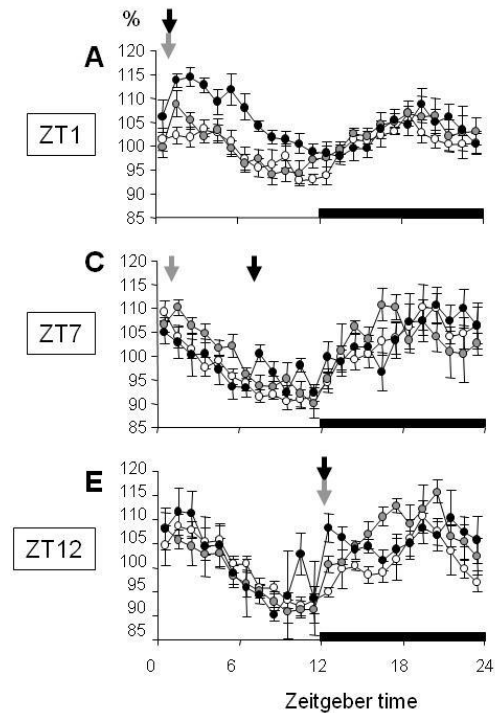


図2. FastingとRefeedingに伴う脳波デルタパワーの変化。白○が1日目(Baseline)、グレイの○が2日目(Fasting)、黒●が3日目(Refeeding)のデータを表す。グレイの矢印がFastingの開始時刻、黒の矢印がRefeedingの開始時刻を示している。(Shimizu et al, *Physiology & Behavior*, 2011)

しかし、RefeedingをZT7やZT12で行った場合、デルタパワーの増大は減弱した。一方、FastingをZT12に開始しRefeedingをZT12に行った場合のみ、FastingおよびRefeedingに伴うノンレム睡眠量の変化に顕著な違いが認められた。

nNOS はノンレム睡眠の制御に関わる事が既に知られている。視床下部の *nNOS* mRNA 発現量は ZT1 での Refeeding 前後では Baseline と比較して有意な増大を示したが、ZT7 での Refeeding 前後では Baseline との差は認められなかった。さらに、視床下部弓状核の *Neuropeptide Y* mRNA 発現量についても、ZT1 での Refeeding 前においてのみ顕著な増大が認められた。

これらの事から、絶食後の再摂餌はノンレム睡眠を深くするが、それは時間的要素に依存する可能性があることが明らかとなった。特に ZT1 はマウスにとって休息開始時に相当し、最も睡眠に入りやすい時間帯である。絶食後、再摂餌のスケジュール次第で、後にくる睡眠の深度を調節できる可能性があり、ヒトにおける食事のとり方への応用が期待される。

本研究は、糖尿病に代表される生活習慣病と睡眠障害を始めとした中枢機能との関連性をターゲットとした研究である。これらの関連メカニズムを明らかにすることは、生活習慣病やメタボリックシンドロームの予防もしくは改善につながるような睡眠のとり方を提案できる可能性を秘めているだけでなく、生活習慣病やメタボリックシンドロームに併発する睡眠障害の病態メカニズムの解明、さらには脂質代謝機構や睡眠制御機構を利用した新しい睡眠障害治療薬および代謝異常治療薬の開発に結びつくことが期待される。

#### 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〕(計3件)

1. Shimizu N, Chikahisa S, Kitaoka K, Seiji N, Sei H. Refeeding after a 24-hour fasting deepens NREM sleep in a time-dependent manner, *Physiology & Behavior*, 2011, in press 【査読あり】
2. Kitaoka K, Sano A, Chikahisa S, Yoshizaki K, Sei H. Disturbance of rapid eye movement sleep in senescence-accelerated mouse prone/8 mice is improved by retinoic acid receptor agonist Am80 (Tamibarotene). *Neuroscience*, 167: 573-582, 2010 【査読あり】
3. Chikahisa S, Fujiki N, Kitaoka K, Shimizu N, Sei H. Central AMPK contributes to sleep homeostasis in mice. *Neuropharmacology*, 57: 369-374, 2009 【査読あり】

〔学会発表〕(計8件)

国内学会シンポジウムおよび国際学会

1. Chikahisa S, Kitaoka K, Shimizu N, Sei H, “Hypothalamic AMPK contributes to homeostatic sleep regulation” 2010, 11, 13-17, *Neuroscience 2010* (San Diego, USA)
  2. Shimizu N, Chikahisa S, Kitaoka K, Sei H, “Sleep regulation in PPAR $\alpha$  knockout mice” 2010, 11, 13-17, *Neuroscience 2010* (San Diego, USA)
  3. 近久幸子, 勢井宏義, 「中枢脂質代謝と睡眠ホメオスタシス」, 2010年7月, 1-2日, 日本睡眠学会第35回定期学術集会(名古屋)
  4. 勢井宏義, 近久幸子, 北岡和義, 「睡眠のホメオスタシスと代謝機構」, 2009年12月, 9-12日, 第32回日本分子生物学会年会(横浜)
  5. Shimizu N, Chikahisa S, Oura M, Sei H, “Refeeding at light-onset after 24h fasting enhances EEG delta-power in NREM sleep in mice.” 2009, 10, 24-27, The 6th Congress of Asian Sleep Research Society • The 34th Annual Meeting of Japanese Society of Sleep Research (Osaka, Japan)
  6. Sei H, Chikahisa S, Shimizu N, “Role of central AMPK in sleep homeostasis” 2009, 10, 24-27, The 6th Congress of Asian Sleep Research Society • The 34th Annual Meeting of Japanese Society of Sleep Research (Osaka, Japan)
  7. Chikahisa S, Shimizu N, Kitaoka K, Fujiki N, Sei H, “Central AMPK contributes to sleep regulation”, 2009, 7, 1-2009, 8, 1, 36th International Union of Physiological Sciences (Kyoto, Japan)
  8. Shimizu N, Oura M, Chikahisa S, Sei H, “EEG delta power in NREM sleep is enhanced by refeeding after 24-hr fasting in time-dependent manner” 2009, 7, 1-2009, 8, 1, 36th International Union of Physiological Sciences (Kyoto, Japan)
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
近久 幸子 (CHIKAHISA SACHIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号: 00452649