

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590222

研究課題名（和文） 空腹シグナルと行動および視交叉上核サーカディアンリズム制限給餌同調との関連性

研究課題名（英文） Ghrelin, a feeding related peptide, and circadian entrainment to the restricted feeding schedule in CS mice

研究代表者

安倍 博 (HIROSHI ABE)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：80201896

研究成果の概要（和文）：CS系マウス体内時計の制限給餌（RF）同調のリセットメカニズムを明らかにするため、行動リズムのRF同調と空腹関連ペプチドであるグレリンとの関連性について検討した。行動リズムがRFに同調しているときの血中グレリン濃度のリズムは、給餌時刻にピークとなるパターンを示した。しかし、恒常暗条件下でグレリン周期的投与への行動リズムの同調は見られなかった。このことからグレリンはCS系RF同調のcueではなく、給餌予知活動と関連することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The circadian clock in CS mice entrains to restricted feeding schedule (RF). Behavioral rhythm and clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus (SCN, a central oscillator in the circadian clock system) of CS mice show clear entrainment to RF (food entrainment). To investigate the mechanisms of RF entrainment in CS mice, present study was designed to clarify the role of ghrelin, which is a peptide closely related to feeding behavior, in the food entrainment in CS mice. Plasma ghrelin concentration levels in RF mice were increased prior to feeding time, while there were no rhythmic changes in ad lib feeding mice. Periodic ghrelin administration induced no changes in behavioral freerunning rhythms under DD. These results indicate that ghrelin is not a major cue for food entrainment of circadian clock in the CS mice. The present results suggest that ghrelin might have a role in the food-entrainable oscillator which regulates food anticipatory activity under RF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：生物時計、グレリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 摂食は、光のように体内時計をリセットできるのか？ 最近、サーカディアンリズム調節

における朝食の重要性が言われているが、C57BL/6J系マウスなどで報告されているように、周期的制限給餌（restricted feeding,

RF) は、抹消時計 (food-entrainable oscillator, FEO) を同調 (時計のリセット) させるが、中枢時計である視床下部視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) を同調させることはできない。これでは、SCN によるリズム (行動や睡眠) と FEO によるリズム (給餌時刻直前の予知的な活動リズム) が乖離した状態になり、生体内で脱同調を起こすことになる。食事時間がサーカディアンシステム全体を真にコントロールするためには、SCN 中枢時計が RF に同調することが必要である。

(2) 我々はこれまで、近交系マウスの CS 系では SCN 中枢時計が RF に同調することを、①行動リズムの RF 同調 (Abe et al. 1989)、②SCN 時計遺伝子発現リズムの RF 同調 (Abe et al. 2007)、③CS 系 *mPer1-luc* マウスの SCN *mPer1* リズムの RF による変容により確かめてきた。しかし、RF の何が給餌時間情報の真の同調因子となり、それが脳でどのように SCN をリセットしているのかは未だ明らかにしていない。

(3) CS 系リズム RF 同調因子として「空腹シグナル」が考えられる。これは、①C57BL/6J 系で、66%カロリー制限による RF 下で、行動および SCN 時計遺伝子リズムの位相が前進する (Mendoza et al. 2005)、②空腹ホルモンのグレリン (octanoylated ghrelin) がラットの SCN ニューロン活動および行動のリズムを位相変位させる (Yannielli et al. 2007)、③マウス SCN にグレリン受容体 (GHSR1a) mRNA が多く分布する (Zigman et al. 2006) ことなどから考えられる。さらに最近では、グレリン受容体欠損マウス (*GHSR*^{-/-}) の RF での予知活動リズムが減弱すること (LaSauter et al. 2009) も示された。これらから、CS 系では給餌直前のグレリンが、直接または間接的に SCN に作用することで、SCN 中枢時計をリセットさせていることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、空腹シグナルが CS 系のリズム RF 同調の真の同調因子である可能性を確かめるために、CS 系の行動リズムの RF 同調とグレリンとの関連性を、C57BL/6J 系と比較することから明らかにすることを目的とする。それにより、ヒトにおいて、食事による体内時計リセットが可能となる物質の開発のための新たな知見を得ることを目指す。

(1) 行動リズムの RF 同調と血中グレリン濃度リズム

CS 系のリズム RF 同調が、空腹ホルモンであるグレリンと関連があるかどうかを確かめる目的から、CS 系マウスの行動リズムが RF に同調しているときの、血中グレリン濃度を測定し、その変化 (リズム) を観察するこ

とにより検証する。行動リズムが RF に同調しない C57BL/6J 系でも測定を行い、CS 系と比較することにより、CS 系のリズム RF 同調におけるグレリンの役割を特定する。

(2) グレリンの周期的投与による行動リズムへの影響

CS 系の行動リズムの RF 同調とグレリンリズムとの関連性が(1)により明らかにできれば、グレリンが実際にリズム同調因子として作用するかどうかを確かめる。恒常暗条件 (DD) 下で行動リズムがフリーランしているときに、グレリンを一定時刻に投与し、それに行動リズムが同調するかどうかを観察することにより検証する。C57BL/6J 系でも同様の測定を行い、グレリン投与が CS 系以外のマウス系統でも同調因子として作用するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) RF 下での血中グレリン濃度リズム測定

ベースラインとして 12 時間交代 (5:00 ON, 17:00 OFF) の明暗サイクル (LD) 下で、自由摂食 (ad lib) での行動リズムを計測した。行動リズムは、マウスの回転輪走行動を 24 時間連続行動記録コンピューターシステム (クロノバイオロジーキット) により計測した。

RF 群: LD でのベースライン測定後、恒常暗条件 (DD) に移行し、給餌量を ad lib 時の 1 日摂食量の 80% (2.5~2.9g) に制限して一定時刻 (CT13, CT=サーカディアン時刻、LD 下での暗期開始を 12 時とした体内時計の時刻、今回の場合 CT13=18:00) に与える周期的カロリー制限給餌 (RF) を行い、行動リズムの RF 同調を確認した (CS 系)。

CS 系では、RF 同調下で、1 日 6 時点 (CT1, 5, 9, 13, 17, 21, それぞれ 6:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00, 2:00 に相当) にグレリン・レベル測定のための採血を行った (各時点 n=5)。CT13 (18:00) での採血は給餌前に行い、採血終了後に給餌を行った。採血は、エーテル麻酔下で、眼窩静脈叢より毛細管を用いて赤色光下で行った (図 1)。採血は 1 日に 1 回で、採血日は最低 3 日以上の間隔をあけた。

C57BL/6J 系では、RF に同調しないので、行動リズムがフリーランしているときに、CS 系 RF 群と同じ時刻に採血を行った (各時点 n=5)。

Ad lib 群: CS 系と C57BL/6J 系ともに、LD でのベースライン後、LD での自由摂食下で RF 群と同じ時刻に採血を行った (各時点 n=5)。採血は、明期 (CT1, 5, 9) は明条件下、暗期 (CT13, 17, 21) は赤色光下で行った。

血中グレリン濃度は、Active-Ghrelin ELISA キット (SCETI MKI97751) を用いた

ELISA 法により分析・検出した。分析手順はキット附属の説明書に従って行った。

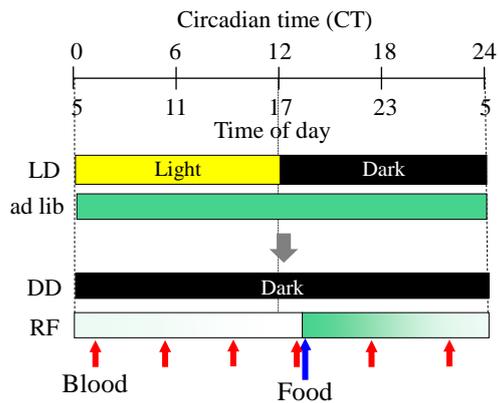


図1.RF条件下でのグレリン測定のための実験手続き。

(2) グレリン周期的投与による行動リズムへの影響

CS系とC57BL/6J系ともに、投与前ベースラインとして12時間交代のLD(5:00 ON, 17:00 OFF)下で行動リズムを測定したのち、DDに移行した。DD移行1日目から、CT11(16:00)にグレリン[Ghrelin(Rat)ペプチド研究所](5 μ gまたは10 μ g/100 μ l生理的食塩水)の腹腔投与を行った(グレリン群、CS系5 μ g:1回目n=5、2回目n=5、10 μ g:n=5、C57BL/6J系5 μ g:1回目n=5、2回目n=5、10 μ g:n=5)(図2)。コントロール群として、CS系およびC57BL/6J系にグレリン群と同時に生理的食塩水(100 μ l)の腹腔投与を行った(各実験で、CS系n=5、C57BL/6J系n=5)。投与期間中、行動リズムを測定し、グレリン投与による変化を観察した。投与は赤色光下で行った。

投与期間(7~11日間)終了後、DD下で継続して行動リズムを測定し、投与後のフリーランリズムの変化を観察した。

摂食は、実験期間全体を通じて自由摂食とした。

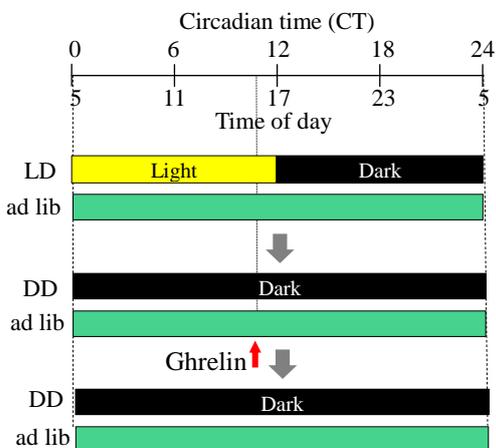


図2.グレリン周期的投与実験の手続き。

4. 研究成果

(1) RF下での行動リズム

CS系マウス

LDのad lib条件下では、活動相が暗期に一致し、行動リズムがLDサイクルに同調した。その後DDに移行し、給餌をCT13に行うRFを導入すると、行動リズムはフリーランすることなく、活動相が給餌時刻周辺に集中した。また、給餌時刻の数時間前から活動量が増加する給餌予知活動が見られた。RF終了後DDでのad libに移行すると、行動リズムはRF下での活動相の位相からフリーランが開始した。このことからCS系では行動リズムがRFに同調したと言える(図3)。

C57BL/6J系マウス

LDのad lib条件下では、行動リズムがLDサイクルに同調した。その後DDでのRF条件下では、行動リズムはRFに同調することなくフリーランした。RF終了後のDDでのad lib条件下では、RF下でのフリーランが継続した。このことからC57BL/6J系では、行動リズムはRFに同調しなかった(図4)。

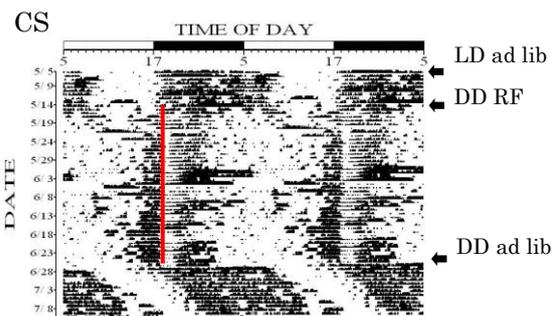


図3.CS系マウスのRF下での行動リズム。赤線がRFでの給餌時刻を示す。

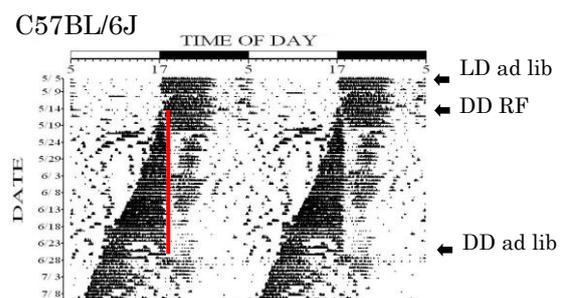


図4.C57BL/6J系マウスのRF下での行動リズム。

(2) RF下での血中グレリンリズム

Ad lib群

CS系のad lib群では採血した6時点での血中グレリン濃度によるリズム変化は見られなかった(図5)。C57BL/6J系のad lib群でもCS系と同様に血中グレリン濃度にリズム変化は見られなかった(図6)。

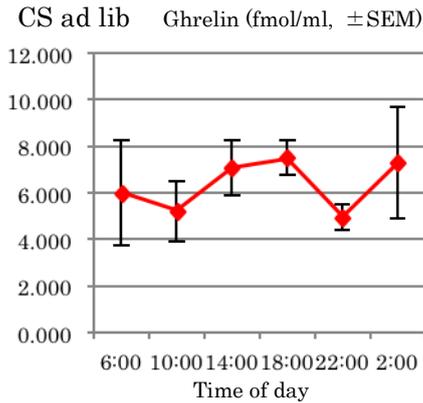


図 5. CS 系マウス ad lib 群の血中グレリン濃度 (fmol/ml, ±SEM)。

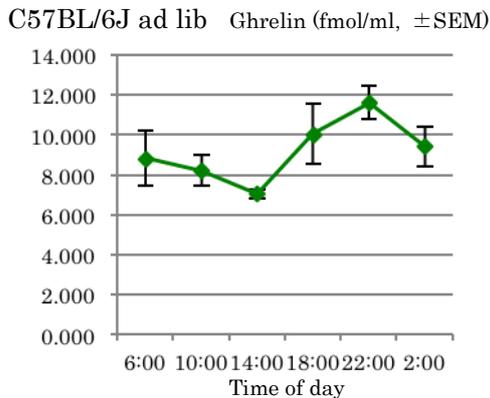


図 6. C57BL/6J 系マウス ad lib 群の血中グレリン濃度 (fmol/ml, ±SEM)。

RF 群

CS 系の RF 群では、給餌時刻直前の CT13 (18:00) に血中グレリン濃度が高く、他の 5 時点では低いという一峰性のパターンが得られた (図 7)。

C57BL/6J 系の RF 群でも、給餌時刻直前の CT13 にグレリン濃度が高くなるパターンが得られた (図 8)。CT1 (6:00) にもレベルが高い傾向が見られた。

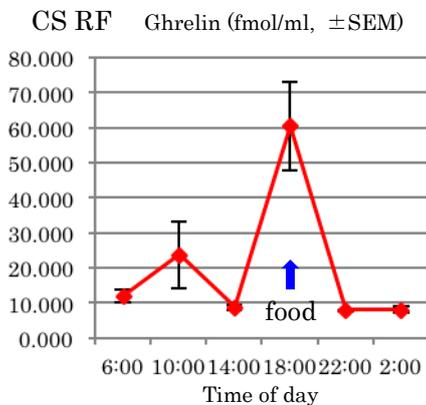


図 7. CS 系マウス RF 群の血中グレリン濃度 (fmol/ml, ±SEM)。

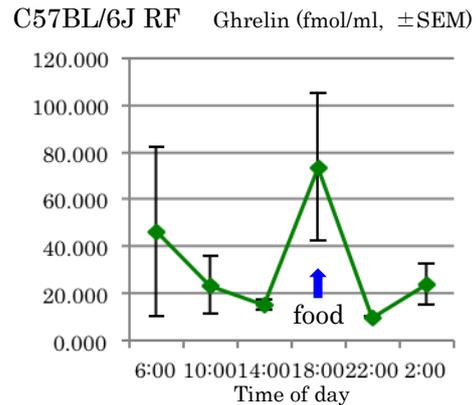


図 8. C57BL/6J 系マウス RF 群の血中グレリン濃度 (fmol/ml, ±SEM)。

CS 系だけでなく C57BL/6J 系においても、RF 群で血中グレリン濃度が給餌直前に高くなったことから、RF におけるグレリンの役割は、CS 系に特異的なものではないと言える。すなわち、CS 系の行動リズムの RF 同調、さらには CS 系の体内時計の RF への同調は、グレリンが関与している可能性は低いと考えられる。

RF 下での給餌直前のグレリンレベルの増大が、CS 系だけでなく C57BL/6J 系でも見られたことから、給餌直前のグレリン分泌の増加は、給餌予知活動と関連がある可能性が考えられる。すなわち、グレリンは、体内時計の中枢振動体 (中枢時計) である SCN とは別に存在すると考えられている RF に同調可能な摂食同調振動体 (food-entrainable oscillator, FEO) の同調因子として作用することが考えられる。

(3) 周期的グレリン投与による行動リズムの変化

① グレリン 5 μ g 投与 (1 回目)

LD でのベースライン後、DD に移行し、CT11 (16:00) にグレリン 5 μ g/100 μ l 生理食塩水溶液を 8 日間投与した。コントロール群は 100 μ l 生理食塩水をグレリン群と同時刻に投与した。

摂食量：投与開始 1 日目および 3 日目に、投与 1 時間後から 1 時間ごとに 4 時間後まで、エサ箱の重量を測定することにより摂食量を計測し、グレリン群とコントロール群で比較した。その結果、CS 系と C57BL/6J 系ともに、投与 1 時間後は、グレリン群の摂食量がコントロール群よりも増大した。

行動リズム：CS 系マウスのグレリン群では、DD でのグレリン周期的投与下で、投与時刻に活動相開始時刻が一致した。投与期間終了後の DD では、投与期間での活動相からフリーランリズムが開始した。すなわち、CS 系では行動リズムがグレリン投与周期に同調する傾向が見られた (図 9)。

C57BL/6J 系のグレリン群では、グレリン投与期間の DD では、活動相が投与時間と一定の位相関係を持つことなくフリーランした。このフリーランリズムは投与期間終了後も継続した。このことから C57BL/6J 系では行動リズムはグレリン投与周期に同調しなかった (図 10)。

コントロール群では、CS 系、C57BL/6J 系ともに、行動リズムは生理的食塩水投与周期に同調しなかった。

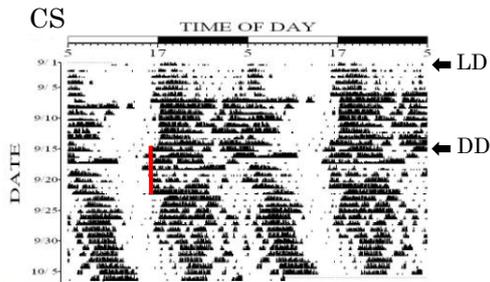


図 9. CS 系マウスのグレリン周期的投与下での行動リズム。赤線がグレリン投与時刻を示す。

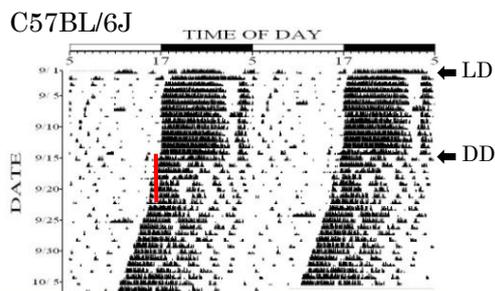


図 10. C57BL/6J 系マウスのグレリン周期的投与下での行動リズム。

② グレリン 5 μ g 投与 (2 回目)

①での結果をさらに検証するために、個体数を増やして、投与期間を 11 日間に延長して実験を行った。

摂食量：投与開始 1 日目と 7 日目に、投与 1 時間後から 1 時間ごとに 3 時間後まで摂食量を測定した。その結果、CS 系で 1 日目の 1 時間後の摂食量に、グレリン群とコントロール群で差がなかった。CS 系 7 日目および C57BL/6J 系の 1 日目と 7 日目では、1 時間後の摂食量はグレリン群の方がコントロール群よりも高かった。

行動リズム：CS 系のグレリン群では、①とは異なり、行動リズムがグレリン投与周期に同調することなく、投与期間開始からフリーランした (図 11)。

C57BL/6J 系のグレリン群は、①と同様にグレリン投与周期に同調することなくフリーランした (図 12)。

コントロール群では、CS 系、C57BL/6J 系ともに、行動リズムはフリーランした。

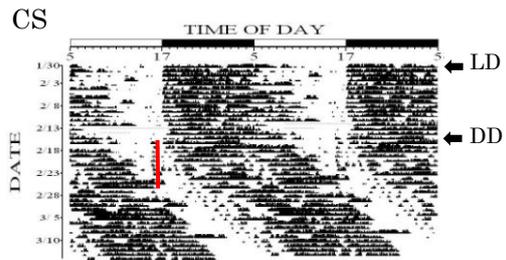


図 11. CS 系マウスのグレリン周期的投与下での行動リズム。赤線がグレリン投与時刻を示す。

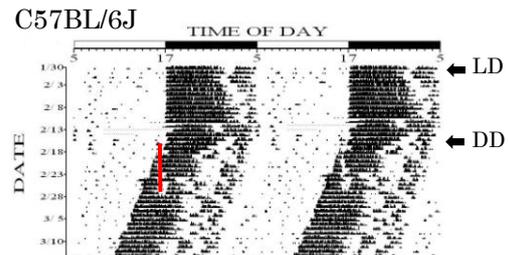


図 12. C57BL/6J 系マウスのグレリン周期的投与下での行動リズム。

①と②の CS 系で結果が異なった原因は不明である。一つの可能性として、CS 系ではグレリンの摂食促進効果が低かった可能性が考えられる。そこで次に、投与量を 10 μ g に増やして実験を行った。

③ グレリン 10 μ g 投与

摂食量：投与開始 2 日目に、投与 1 時間後から 1 時間ごとに 3 時間後まで摂食量を測定した。その結果、CS 系、C57BL/6J 系ともに、投与 1 時間後のグレリン群の摂食量がコントロール群よりも高い傾向が見られた。

行動リズム：CS 系グレリン群では、②と同様に、投与開始後、グレリン投与時刻と活動相との間に一定の位相関係は形成されず、フリーランした (図 13)。投与期間終了後の DD では、投与期間中のフリーランリズムが継続した。

C57BL/6J 系グレリン群では、①②と同様に、行動リズムはグレリン投与周期に同調することなくフリーランした (図 14)。

コントロール群では、CS 系と C57BL/6J 系ともに行動リズムはフリーランした。



図 13. CS 系マウスのグレリン周期的投与下での行動リズム。赤線がグレリン投与時刻を示す。

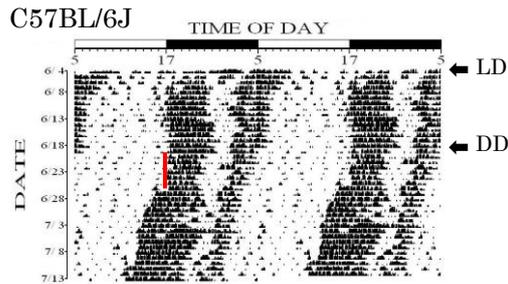


図 14. CS 系マウスのグレリン周期的投与下での行動リズム。

以上の結果から、投与量を 2 倍に増やしても、CS 系と C57BL/6J 系ともにグレリン周期に行動リズムは同調しなかった。このことから、CS 系マウスの RF への同調には、空腹に伴うグレリン分泌が同調因子として作用しない可能性が考えられる。ただし今回は、グレリンの投与時刻を活動開始位相（主観的夜）に固定して、1 点でしか検討していない。そのため、グレリンの最も作用する時間（位相）での効果を見ていなかった可能性が考えられる。今後は、グレリン投与を非活動期（主観的昼）に行うなど、異なる時間（位相）に行って、行動リズムの変化を観察する必要があると思われる。

CS 系の RF 同調は、何が真の cue となるのか、本研究では明らかにできなかったが、グレリンは、SCN による中枢時計には効果はないが、FEO の RF への同調に関連する可能性は考えられる。今後は、CS 系の RF 同調因子の特定とともに、グレリンの FEO における役割を明らかにする研究へと展開する必要があると思われる。

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）

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 仲嶌亜弓、明石行生、安倍 博、光刺激制御が生体リズムに及ぼす影響、平成 24 年度（第 45 回）照明学会全国大会、2012 年 9 月 7 日、山口市
- ② 高橋さえり、明石行生、山田佐知、安倍 博、体内時計の作用分光感度に応じたサーカディアン放射センサーの開発、平成 22 年度（第 43 回）照明学会全国大会、2010 年 9 月 7 日、大阪市
- ③ 山田佐知、明石行生、安倍 博、高橋さえり、福井に住む大学生の睡眠・うつ症状に関する調査、平成 22 年度（第 43 回）照明学会全国大会、2010 年 9 月 7 日、大阪市

〔図書〕（計 1 件）

- ① 安倍 博、化学同人、非光同調-食事同調を中心に、（編）海老原史樹文、吉村 崇、時間生物学、2012、37-52

〔その他〕

ホームページ等

<http://shinri.med.lab.u-fukui.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安倍 博 (ABE HIROSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：80201896