

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791030

研究課題名（和文） 概日リズム発達における母獣と光の役割

～幼若型から成熟型への移行スイッチは何か～

研究課題名（英文） Role of dams and light as a zeitgeber during brain development

研究代表者 坂田 ひろみ（SAKATA HIROMI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：50294666

研究成果の概要（和文）：

概日リズムが幼若型から成熟型に移行するメカニズムを考察するため、乳仔期ラットの概日リズムの特性を検討した。その結果、乳仔期は母獣による授乳・育仔リズムは仔の深部体温変化に大きく影響し、乳仔期は SCN リズムが光環境よりも母獣による哺乳・育仔に同調する可能性が示された。また、発達期に摂食時間制限により SCN リズムを反転させたラットでは、有意な体重増加や多動が認められ、明暗周期への同調反応が低下していた。よって、脳発達期の乱れた食生活は成熟後の脳機能障害を誘発する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To discuss the mechanism of the transition of circadian rhythm from immature to mature shape, we assessed the circadian rhythm of deep body temperature and Per1 expression in rat pups. The timing of suckling acutely affected pup's body temperature, and the daily rhythm of Per1 expression in the SCN of pups entrained the timing of suckling (or food intake), as well as that in the liver, but not like that in the adult SCN. Thus, we concluded that the timing of suckling (or food intake) is a more important zeitgeber for the pup's SCN than light/dark condition. Rats, which inverted SCN rhythm by restriction of feeding time during the postnatal period, showed a significant increase in body weight, hyperactivity, and delayed entrainment with the light/dark cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 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：内科系臨床医学・

胎児・新生児医学

キーワード：概日リズム、深部体温、脳発達、同調因子

1. 研究開始当初の背景

うつ病、不登校、学習障害、睡眠障害、新生児突然死など、最近、取り上げられることの多い乳幼児や小児の問題に、生体リズムの異常が深く関わっている可能性が示唆されている。概日リズムは、中枢神経系の発達や周囲の環境変化に伴ってその波形を変化させながら、成熟型のリズムを獲得していくと考えられている。この概日リズムの獲得過程に不具合が生じると、体温、ホルモン、血圧などの概日リズムや、睡眠-覚醒リズムなどに異常が生じ、睡眠障害や行動障害などを引き起こす可能性がある。これまでに我々は、脳発達期のエタノール曝露によって、概日リズムの同調障害が惹起されることを報告している。また、テレメトリーシステムを用いた哺乳期～成熟期までのラット深部体温概日リズムの長期的観察により、離乳（母乳との隔離）の前と後では深部体温概日リズムのパターンが著しく異なることを明らかにした。この段階では母獣との隔離による影響なのか、母獣を含む同居動物から隔離して単独飼育しによるものなのかが不明であったが、その後、離乳時期を前後させたり、同居仔の有無の影響を観察したところ、この変化には同居仔の有無ではなく、母獣の有無が影響していることが確認された。これらの結果から、母獣と同居中は母獣からの哺乳が光環境などよりも優先される同調因子であり、母獣と隔離すると速やかに環境のリズム（この場合は光）に同調した概日リズムを発振するようになるのではないかと推察した。

2. 研究の目的

概日リズムは胎生期からすでに駆動しているが、その波形は発達ステージによって異なる。この概日リズムの変化は、中枢神経系の発達段階の違いからだけではなく、発達段階により優先する同調因子（母獣、光環境、摂食など）を“乗り換え”していることから生じると予想される。本研究では、概日リズムが幼若型から成熟型に切り替えが起こるメカニズムについて考察することを目的とし、幼若型概日リズムの特性を検討することで成熟型との相違点を検討する。また、発達過程で概日リズム中枢である SCN のリズムを攪乱した場合に、仔の発育や、その後の行動および概日リズム調節機能がどのような影響を受けるのかを調べ、脳発達期の同調因子（光、母獣、摂食など）の乱れがもたらす不可逆的な脳の機能障害について考察する。

3. 研究の方法

(1) 実験 1

ラットを生後 10 日の深麻酔下で開腹し、テレメトリー送信器 (TA-F20) を腹腔内に留置する。麻酔から回復するのを待ち、ホームケージに戻し母獣と共に飼育した。ケージは受信ボード (RPC-1) 上に置き、12 時間/12 時間の明暗周期下で、5 分毎に体温と活動量を記録した。仔は生後 21 日で離乳した。離乳後も引き続き深部体温を測定した。離乳（母獣との隔離）による体温パターンの変化が、授乳を受けているかいないかによるものなのか、それとも成獣動物と同居しているかいないかによってもたらされるものなのかを調べるため、離乳時に母獣の代わりに授乳能力のある他の母獣を同居させた群と、授乳能力のない（未産の）若い雌ラットを入れた群を作製し、体温パターンを比較した。また、母獣による授乳・育仔が仔の体温に与える短期的影響を調べるため、短時間 (ZT6-11) 母獣と仔の隔離を行って仔の体温変化を調べた。また、仔ラットにとって成獣ラットとの同居そのものが体温を保つ要因になることも考えられたため、母獣と仔と隔離している間、仔ラットのケージに授乳能力のない若い♀ラットを入れた群も作製し、仔の体温変化を観察した。

(2) 実験 2

実験 1 の結果より、哺乳期ラットでは哺乳（摂食）リズムが概日リズムに大きな影響を与えているのではないかと考えた。そこで、母獣との同居時間（授乳・育仔を受ける時間）を明期の 12 時間のみ制限した群 (0-12 mom 群) と暗期の 12 時間のみ制限した群 (12-24 mom 群) を作製し、深部体温リズムを比較した。また、本研究で使用しているテレメトリーシステムでは活動量も計測できることから、活動パターンについても比較した。母獣との同居時間制限は PD13 の ZT12（暗期の始まり）から PD18 まで行った。送信器の留置および深部体温の測定は、実験 1 と同様に行った。

(3) 実験 3

実験 2 の結果より、母獣による授乳・育仔時間を明期のみにした群と、暗期のみにした群では、体温の高温相と低温相が反転していることが明らかとなった。そこで、これらの群のラットを用い、概日リズムの中枢である SCN と肝臓における時計遺伝子 Per1 の発現リズムがどのように変化しているかを調べた。PD13 の ZT12（暗期の始まり）から実験 2 と同様に母獣との同居時間を明期のみ制限した群 (0-12mom)、暗期のみ制限した群 (12-24mom)、常に母獣と同居させた群

(0-24mom)の仔をPD18のZT2、ZT7、またはZT15に断頭し、直ちに脳を取り出し、視床下部組織を採取した後、開腹して肝臓組織も採取した。採取した組織は液体窒素中で凍結し、-30°Cで保存した。また、摂食状況を確認するため、胃を切り出し、重量を測定した。さらに、哺乳期ラットと成熟ラットとを比較する目的で、成獣ラットで餌を明期のみを与えた群、暗期のみを与えた群、または常に自由摂食とした群を作製した。明期のみまたは暗期のみでの給餌で5日間飼育した8週齢雄ラットをZT2、ZT7、またはZT15に断頭し、仔と同様の手順で視床下部および肝臓組織を採取した。採取した視床下部および肝臓組織からtotal RNAを抽出した後、これを鋳型にしたcDNAを合成し、Real Time PCR法によりPer1の発現量を解析した。

(4) 実験4

実験2、および3で作製したラットでは、母獣との同居時間(哺乳可能時間)を明期のみで制限すると、24時間母獣と同居した(24時間哺乳可能な)群および哺乳可能時間を暗期のみで制限した群と比較し、SCNリズムが反転することが明らかとなった。そこで、SCNリズムが反転した状態を継続した状態で生育したラットは、成熟後に行動学的異常を示すか否かについて検討した。ラットは12h/12hの明暗周期下で飼育し、哺乳又は摂食が可能な時間を明期のみで制限した群(明期摂食群)、暗期のみで制限した群(暗期摂食群)、および哺乳・摂食時間の制限をしない群(自由摂食群)の3群に分けた。哺乳・摂食時間の制限は、生後7日から28日まで行い、哺乳・摂食できない環境は、離乳(生後21日)前は母獣をケージから取り除くことにより、離乳した後は固形飼料および給水瓶をケージから取り除くことにより与えた。生後28日以降は全ての群で固形飼料および水を自由に摂取できるようにした。生後55~70日に活動量測定、生後70日に高架式十字迷路試験、生後80日に高架式T字迷路試験、生後90日以降に深部体温リズムの測定を行った。活動量はビームセンサーを用いた自発運動量測定システム(ACTIMO, バイオリサーチセンター)を用いて測定した。まず、新奇環境下での活動量を測定するため、ラットを新しいケージに移した直後から90分間の活動量を計測した(New cage test)。その後は装置内での飼育を続け、ケージに十分慣れた2日後に24時間の活動量を計測し、Home cage内での自発運動量を解析した。高架式十字迷路試験は、薄暗い(70 lux)間接照明下で行った。ラットの鼻先をopen armの方に向けて中央部へ静置し、5分間の行動をビデオで記録した。open arm、closed arm、platformにおける滞在時間及び各armへの進

入回数を計測した。高架式T字迷路試験を行うも70 luxの間接照明下で行った。ラットの鼻先をopen armの方に向けてclosed armの端に静置し、5分間の測定を行い、open armへ移動するまでの時間(潜時)を計測した。同様の測定を30秒のインターバルで3回繰り返し、潜時の推移を評価した。引き続き同じラットを、鼻先をarm外に向けてopen armの最端に置き、closed armに移動するまでの時間を計測した。深部体温概日リズムの測定では、ラット深麻酔下で開腹し、テレメトリー送信器(TA-F40)を腹腔内に留置した。麻酔から回復するのを待ち、ホームケージに戻し母獣と共に飼育した。ケージは受信ボード(RPC-1)上に置き、12時間/12時間の明暗周期下で、5分毎に体温と活動量を記録した。その後、明暗周期を8時間前進させ、深部体温の頂点位相の推移を観察した。新しい明暗周期への同調を確認した後、明暗周期を8時間後退させ、同様の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 実験1

母獣の代わりに授乳能力のある別の母獣を入れた群は、操作後も明期の始まりの一過性体温低下によって特徴づけられる離乳前の体温パターンを継続した。一方、出産経験のない(授乳能力のない)雌ラットを入れた群は、一過性体温低下を示さなくなり、離乳(母獣との隔離)をした場合と同様の体温パターンをとった。よって母獣による授乳・育仔が離乳前体温変化パターンを惹起する要因となっている可能性が示唆された。母獣と隔離している間、仔ラットの体温は低下し、母獣に戻すと回復した。また、母獣と隔離している間に授乳能力のない若い雌ラットと同居した仔ラットにおいても、その間、体温低下が確認された(通常、明期の間、体温は暗期に近づくほど高くなる傾向があるが、若い雌ラットと同居した期間は体温が低下したため、その傾向が認められなかった)。母獣による授乳・育仔が仔の体温に即時性の影響をもたらすことが明らかになったことより、胎仔期同様に、出生後の仔においても、摂食が概日リズムに大きな影響を与えているのではないかと考えた。

(2) 実験2

母獣との同居時間を半日(12時間/day)にすることで2相性の体温変化パターンが出現した。0-12 mom群の体温は母獣と同居している明期に高く、母獣と隔離されると(暗期に入ると)直ちに低下し、明期の体温と比較して平均で約1°C低い低温相となった。それとは対照的に12-24 mom群の体温は、明期に低温相、母獣と同居している暗期に高温相を示した。また通常飼育した際(0-24mom)に

離乳前の体温変化パターンの特徴であった明期の始まりに認められる一過性の体温低下現象は、母獣との同居が明期であるか(0-12mom)、暗期であるか(12-24mom)によって大きく異なっていた。(0-12mom)では明期の始まりの体温低下が母獣と常に同居している群(0-24mom)と比較して非常に顕著に認められ、34℃を下回る体温低下を示すことが多かった。それに対して、12-24mom群では明期に入ると徐々に体温が低下していったものの、明期の始まりに急激な体温低下は認められなかった。12-24mom群では明期に比較して暗期の活動量が高く(明期:暗期=1:1.44)、0-12mom群では、明期と暗期の活動量に大きな差は見られなかった(明期:暗期=1:1.13)。以上より、母獣との同居時間を反転させると、体温の高温相と低温相も反転し、体温が母獣との同居や哺乳に同調する性質があることが示唆された。一方活動量は、母獣との同居および哺乳リズムよりも光環境に同調している可能性が考えられた。

(3) 実験3

これまでの報告と同様に、哺乳期の仔および成熟ラットの SCN における Per1 発現は明期に高く、暗期に低下する傾向がみられた。また、成獣では摂食時間を明期だけに制限しても SCN における Per1 発現パターンに変化はなく、摂食リズムやそれに伴う行動リズムの変化は SCN が発振する概日リズムに影響しないことが確認された。これに対し哺乳期の仔では、母獣との同居時間を明期だけに制限すると、SCN での Per1 発現量が明期に低く、暗期に高い反転したパターンを示した。哺乳期の仔では、肝臓における Per1 発現は明期に低く、暗期に高かったが、母獣との同居時間を明期だけに制限すると、SCN 同様に Per1 の発現パターンが反転していた。母獣との同居時間を暗期だけに制限した群では SCN、肝臓共に 24 時間母獣と同居した群と同様の Per1 発現パターンを示した。よって、哺乳期ラットでは SCN リズムが光環境よりも摂食リズムに同調する可能性が示唆された。

(4) 実験4

生後 6, 13, 20, 27, 34, 48, 62, 76, 90, 104 日に各群のラットの体重測定を行った。哺乳・摂餌時間の制限を行っている期間(生後 6~27 日齢)の体重変化を比較したところ、群間に有意な差が認められた (Two-way repeated measures ANOVA, $p < 0.01$)。post hoc 解析の結果、暗期摂食群は、明期摂食群と自由摂食群と比較して体重増加が有意に少ないことが明らかとなった ($p < 0.01$)。摂食さらに、食時間制限解除後も含む 6 日~104 日齢までの体重変化も同様に解析したところ、群間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。post

hoc 解析を行ったところ、暗期摂食群は、明期摂食群と自由摂食群と比較して体重増加が有意に少ないことが明らかとなった。このことより、明期だけの摂食は、暗期だけの摂食と比較して体重が有意に増加すること、および摂食時間制限中に生じた体重の差は成熟後も維持されることが明らかになった。これらのラットの成熟後の活動量を調べたところ、Home cage での活動量は 3 群とも暗期に高く、明期に低い 2 相性を示し、明暗周期に同調していた。1 日の活動量を比較したところ、明期摂食群で活動量が他の群と比較して著しく高かった ($p < 0.01$)。活動量を明期と暗期に分けて比較したところ、明期における活動量は群間で有意差はなかったが、暗期の活動量は明期摂食群で有意に高かった ($p < 0.01$)。このことより、発達期の摂食リズムの変化が成熟後の多動を誘発する可能性が示唆された。New cage test では、新奇環境下においた直後から最初の 15 分間までは明期摂食群が他の 2 群に比べて、比較的活動量が多かったものの、3 群間に有意な差はみられなかった。

高架式十字迷路試験においては、open arms における滞在時間は明期摂食群が比較的長かったものの他群との有意差はみられなかった。また、closed arms, platform における滞在時間も各群間で有意な差はなかった。open arms への進入回数は群間で差がみられなかったが、closed arms への進入回数は暗期摂食群が他の 2 群に比べて有意に多かった ($p < 0.01$)。

高架式 T 字迷路試験においては、closed arm から open arm へ移動するまでの潜時 (passive avoidance) は、全ての群で次第に増加したが、群間に有意な差が認められた。post hoc 解析の結果、暗期摂食群で passive avoidance の獲得が低下していることが明らかとなった ($p < 0.01$)。open arm から closed arm への移行時間 (one-way escape) は、群間で有意差が認められなかった ($p = 0.56$)。

明暗周期への同調能を深部体温リズムの観察により評価したところ、明暗周期を前進させた場合、前進させる前日の頂点位相と比較して、位相が有意な前進を示したのは、明期摂食群では 6 日目以降、暗期摂食群は 4 日目以降、自由摂食群は 3 日目以降であった。同様に明暗周期を後退させた前日 (-1 日) と比較して頂点位相が有意に変化した日は、全群 2 日目以降であった。よって明期摂食群では明暗周期への同調能が障害されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

K Ohta, H Sakata-Haga, Y Fukui

Alteration in anxiety-related behaviours and reduction of serotonergic neurons in raphe nuclei in adult rats prenatally exposed to ethanol, Cong Anom 50, 2010, 査読有, pp105-114
DOI:10.1111/j.741-4520.2010.00269x

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 坂田ひろみ、他 4 名. 哺乳・育仔リズムが仔の概日リズムに及ぼす影響. 日本解剖学会第 66 回中国四国支部学術集会 2011 年 11 月 12~13 日 徳島大学 (徳島市)
2. 坂田ひろみ、他 4 名. Application of *ex vivo* MRI for non-invasive detection of gross malformations in the rat brain. 2011 年 3 月 28~30 日 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (横浜で開催予定だったが、震災のため誌上開催に変更)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 ひろみ (SAKATA HIROMI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・講師
研究者番号 : 50294666

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし