

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591602

研究課題名(和文) 脳発達期の摂食リズムの乱れがもたらす視交叉上核リズムの変化と行動の異常

研究課題名(英文) Effects of periodic maternal separation on development of circadian rhythm in rat pups

研究代表者

坂田 ひろみ (Sakata, Hiromi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：50294666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳期ラットに対し、母仔分離を明期/暗期の切替えと同時刻または明期/暗期の切替え時刻から3時間後に行ったところ、一過性体温低下は母獣との同居/分離リズムより明暗周期に同調することが明らかとなった。さらに恒常明で母子分離を行ったところ、母獣との同居が主観的活動期または主観的休息期のどちらの場合も、一過性体温低下は母獣との同居を開始する直前(母獣分離をしてから約12時間後)に出現した。以上より、哺乳期ラットの特徴でもある一過性体温低下は母獣との同居/分離周期よりも明暗周期に強く同調するが、同調因子としての光環境が無い場合は母獣との同居/分離周期に同調する性質があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Rat pups under went the maternal separation during for 12 hours a day from postnatal days 13 with a synchronized timing of separation/cohabitation with light ON or OFF, or with 3-hour delayed timing from light ON or OFF. As a result, the emergence of a transient and acute decrease in deep body temperature, which is characteristic in preweaning pups, was entrained a light and dark cycle, but not timing of maternal separation/cohabitation. A maternal separation under constant lightness revealed that if there was no in light condition as a time cue, the transient and acute decrease in the deep body temperature entrained maternal separation/cohabitation.

研究分野：先天異常学

キーワード：概日リズム 脳発達 深部体温 明暗周期 母仔分離 ラット

1. 研究開始当初の背景

概日リズムの調節において最も強力な同調因子は「光」である。概日リズムの中核は視床下部にある視交叉上核(SCN)であるが、SCNは網膜からの光情報を直接または間接的に受け取り、光環境の周期に自らのリズムを同調させ、そのリズムを末梢器官に向けて発振している。SCNのリズムは、例えば摂食リズムの変化により消化器等の末梢器官のリズムが変化したとしても、その影響を受けず、光環境に同調したリズムを保つことが知られている。しかし、2008年に胎仔期には母獣の摂食リズムにより胎仔SCNリズムが変化することが報告されたことより、発達過程においては、光が最も優先される同調因子ではなく、別の因子(例えば摂食リズム等)がより強い同調因子になるのではないかと考えられるようになった。そこで我々は、乳期ラット仔において母獣による哺乳を明期のみ、又は暗期だけに制限したモデルで、SCNと肝臓における時計遺伝子 *Per1* の発現リズムを調べたところ、SCNにおいても肝臓と同様に哺乳時間の違いで *Per1* 発現リズムが変化することを見いだした。すなわち、胎生期や乳仔期におけるSCNリズムは、光環境よりも摂食リズムにより強く同調する可能性が示唆された。このことから、脳発達期においては摂食リズムの乱れは、概日リズム中枢のリズムを乱し、成人よりも重大な影響をもたらすと推察される。

脳発達期に正常な概日リズム獲得に不具合が生じると、それ以降の小児期、思春期、あるいは成人になってからの概日リズム(体温、ホルモン、血圧など)や概日リズムと関連が深い睡眠覚醒リズムに異常が生じ、睡眠障害や行動障害などを引き起こす可能性が指摘されている。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。一方で我々は、テレメトリーシステムのマウス用小型送信機をラット乳仔に留置することで、乳仔期の深部体温リズムの観察に成功した。この研究により、乳仔期のラットは成熟ラットとは全く異なる幼若型深部体温リズム明らかにした(図1)。さらに我々は幼若型深部体温リズムが離乳により劇的に変化し、成熟型へと移行することに着目し、幼若期の深部体温リズムに及ぼす母獣の影響を検討した。そして、成熟ラットでは摂食リズムを変化させても概日リズムの中核である視交叉上核での時計遺伝子 *Per1* の発現リズムは変化しないのに対し、乳仔期ラットは摂食リズムを反転させると視交叉上核の *Per1* 発現リズムも反転することを見いだし幼若期には摂食が重要な概日リズム同調因子として作用する可能性が示唆された。

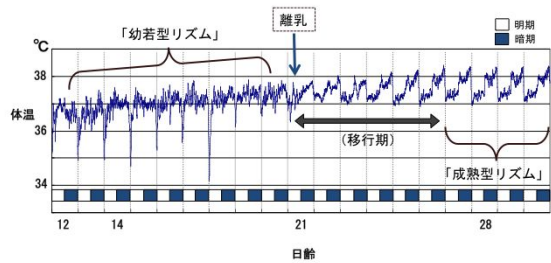


図1. ラットにおける離乳前および離乳後の深部体温概日リズム

乳仔期のラットは、暗期から明期への移行期で認められる一過性の体温低下によって特徴づけられる「幼若型リズム」を示す。離乳(=母獣との分離)を境に、「幼若型リズム」は消失し、移行期を経て明期に低温相、暗期に高温相を示す二相性リズム(成熟型リズム)が出現する。

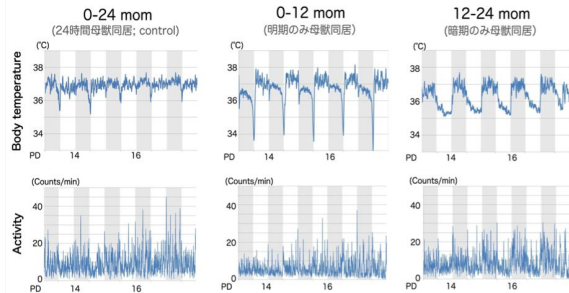


図2. 母獣との同居時間制限による仔の深部体温リズムの変化

生後13日から、母獣との同居時間を明期のみ(0-12mom)12h/day)または暗期のみ(12-24mom)に制限したモデルを作製し、深部体温および活動量の変化を観察した。0-12mom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)直ちに低下し低温相となった。それとは対照的に12-24mom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)に認められる一過性の体温低下現象が、0-12mom群ではより顕著になり、対照的に12-24mom群では認められなかった。このことより、摂食リズムを反転させることで、光環境に対して体温リズムの低温相と高温相が反転したモデルが作製されることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、乳仔期または離乳後の幼若期に摂食リズムを変化させた場合、成長や成熟後の摂食行動等にどのような影響を与えるかについて検討し、脳発達期における摂食リズムの重要性について明らかにすることを目的としている。本研究の成果を踏まえ、身体および精神の健全な発育を促すための摂食リズムおよび光環境リズムとはどのようなものかについて考察することを目指す。

3. 研究の方法

(1)実験1

Wistar-Hannover ラット(日本SLC)の生後(PD)7~21に、哺乳可能な時間を明期のみ(明期群)又は暗期のみ(暗期群)に制限した。PD21に離乳後、固形飼料を明期群には明期のみ、暗期群には暗期だけに与え、PD28まで飼育した。PD28以降は摂食時間の制限を行わず、固形飼料を自由摂取させた。8週齢以降に活動量の測定、概日リズム同調機能の評価を行った。

これらのラットを個別ケージに移し、赤外線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)を用いて活動量を測定した。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)。さらにラットを深麻酔下で開腹し、テレメトリーシステム用送信機を腹腔内に留置した。手術後、ホームケージに戻し、ケージを受信ボード上に置いて5分毎の深部体温の測定を行った。12h/12hの明暗周期(明期: ZT0~12、暗期:

ZT12~24)で飼育中に明暗周期を8時間前進させ、深部体温の頂点位相の推移を観察し、新しい周期への同調反応を評価した。新たな新しい明暗周期に十分に同調したことを確認した後、明暗周期を8時間後退させ、同様の観察を行った。

#### (2)実験2

これまで我々が行った母仔分離が仔の深部体温変化に与える影響を観察した実験では(図2)母仔分離と明暗の切り替えが同時に行われるため、体温低下の始まりと回復の要因が母獣の有無、光の有無のいずれであるかを区別できなかった。そこで、解析2では明暗の切り換えから3時間遅らせて母仔分離を行う、L/3h群またはD/3h群について深部体温および活動量の測定を行った。

#### (3)実験3

実験1および2の結果より、母仔分離が体温や活動量の概日リズムに影響すること、さらには成長にも影響することが示唆された。しかしながら、その影響が内在性の概日リズムに直接影響しているのかは明らかでない。そこで各組織における概日リズムへの影響を明らかにするために、中枢時計のSCN、末梢時計の大脳皮質および肝臓における時計遺伝子の発現リズムを調べた。

#### (4)実験4

光環境が変化しない状態で母仔分離をおこなった場合の仔の深部体温変化を観察するため、ラット母獣とその仔を恒常明下で飼育し、主観的活動期又は主観的休息期に母仔分離を行い、深部体温の変化をテレメトリーシステムにより記録した。

### 4. 研究成果

#### (1)実験1

生後6-104日の体重増加を比較したところ、暗期群で他の2群に対し有意差を示した( $p < 0.01$ )。明期摂食群と暗期摂食群は哺乳・摂食可能時間数は等しいにもかかわらず制限開始直後から実験終了まで、明期摂食群の体重は暗期摂食群に対して高かったことから、明期の摂食の方が暗期の摂食よりも体重増加を起こしやすく、生じた体重差は成熟後も保たれる可能性が示唆された。

New cage testでは、新奇環境に曝露後、最初の15分間は明期摂食群が他の2群に比べて、活動量が高い傾向にあったが、群間に有意な差はみられなかった。

Home cageでの活動量は3群とも暗期に高く、明期に低く、明暗周期に同調していた。一方活動量の推移には3群間に有意な差が認められ、明期群では暗期の活動量が他の群と比較して著しく高かった。各群の活動量を明期暗期別に比較したところ、明期における活動量に有意差はなかったが、暗期活動量は明期摂食群で他の群より有意に高かった( $p <$

0.01)。以上より、脳発達期における明期のみの摂食は生後の活動リズムには影響しないが、活動期の多動を誘発する可能性が示唆された。

明暗周期に対する同調能の評価においては、明暗周期を8時間前進させた場合、明暗周期を前進させた前日と比較して、頂点位相が有意に変化し始めた日は、無処置群では3日目、暗期群では1日目であったのに対し、明期摂食群は6日目であった。よって明期群では明暗周期の前進後、新しい周期への同調が遅れており、明暗周期同調機能に障害があることが示唆された。

#### (2)実験2

L/3h群は、L群同様にZT0で一過性体温低下が顕著であり、その後回復したが、体温低下後の完全な回復は母仔同居を再開したタイミングでみられた。また、このZT0での体温低下はすでに暗期のうちから始まっていた。D/3h群では、ZT0でわずかに体温低下し、母獣分離直後から次に母獣との同居を開始するまでの間、継続して徐々に体温が低下し、母仔同居後に回復が見られた。

L/3h群は、母仔分離中であるにも関わらず、ZT0付近において体温低下および上昇がみられたことより、この現象は体温低下が明暗周期に同調していると考えられた。また、D/3h群では、明期・暗期の切り替えのタイミングで体温変化は見られず、体温リズムは母仔分離・同居に同調していた。L/3h群においても母獣同居のタイミングで体温上昇がみられることから、仔ラットの体温維持には母獣同居が重要であると考えられた。

#### (3)実験3

SCNにおけるPer1およびPer2の発現リズムは、全群において明期に高く、暗期に低いパターンを示した。Bmal1の発現リズムの振幅は小さいが、群間でのパターンの違いは見られなかった。大脳皮質においては、Per1およびPer2の発現リズムは3群間で変化が見られなかった。Bmal1は振幅が小さいが、無処置群とD群で明期に低く暗期に高い傾向が見られるのに対し、L群では逆のリズムとなった。肝臓においては、無処置群およびD群ではPer1の発現は明期に高く暗期に低いものに対し、L群ではリズムが逆になっていた。Per2の発現は、無処置群とD群で暗期の始まりに高いものに対し、L群では振幅が小さくリズムが不明瞭になった。Bmal1の発現は、無処置群とD群で暗期に高いものに対し、L群では振幅が小さくリズムが不明瞭になった。Bmal1と転写レベルで相互作用を持ち、かつ糖脂質代謝を促進する転写調節因子であるPGC-1は、無処置群において明期に高い傾向が見られたのに対し、L群では暗期に高く、D群では明期に高いリズムを示し、特にD群では発現が高い傾向が見られた。

これまで、中枢時計であるSCNは、PD6付近から明暗周期に同調すること、また、Bmal1

の発現リズムは PD20 付近までは振幅が小さいことが報告されており、本実験での結果はこれまでの報告と一致した。末梢時計(大脳皮質、肝臓)において群間の差がみられるが、SCM では群間でリズムの違いが見られないことより、実験 2 で観察された明暗周期に同調した一過性体温低下は、SCN の支配下にあることが推察される。これまで、大脳皮質は摂食時間制限によりリズムが変化することが報告されているが、本研究では群間にリズムの差が認められなかった。よって、哺乳期の脳皮質は摂食への同調が不十分である可能性が推測された。一方、肝臓では L 群における時計遺伝子の発現リズムが反転していた。一部の末梢時計は摂食時間を制限することでリズムが変化することが報告されていることから、母子分離は哺乳の制限を介して、肝臓の時計遺伝子のリズムを変化させたと推測される。PGC-1 は、異化作用を促進する転写因子であると同時に、Bmal1 の制御を受ける遺伝子であることから、母子分離の影響は肝臓の末梢時計を変化させることと、絶食状態での異化代謝促進の両方の影響を受けていると考えられる。

#### (4) 実験 4

恒常明下で飼育した場合、主観的活動期または主観的休息期に母子分離を行うと、いずれの場合も母獣との同居時間帯に深部体温が上昇した。このことより、母獣との同居が主観的活動期または主観的休息期のどちらの場合も、一過性体温低下は母獣との同居を開始する直前(母獣分離をしてから約 12 時間後)に出現した。以上より、哺乳期ラットの特徴でもある一過性体温低下は母獣との同居/分離周期よりも明暗周期に強く同調するが、同調因子としての光環境が無い場合は母獣との同居/分離周期に同調する性質があることが明らかとなった。

#### 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](計 2 件)

Sawada N. Sakata-Haga H. Nakagawa S.

Kanai T. Fukui Y.

Periodic maternal deprivation during suckling period as a factor disturbing circadian rhythm in rat pups (abs)

Congenit Anom 53(4):A16(2013)査読無

Sakata-Haga H. Kamura T. Sakamoto H.

Kanai T. Fukui Y.

Feeding rhythm in the perinatal period changes SCN rhythm and affects behavior in adulthood

Congenit Anom 52(4):A14(2012)査読有

[学会発表](計 3 件)

坂田ひろみ、澤田直樹、福井義浩

哺乳期の母子分離が仔の体温・行動リズ

ムと離乳後の発達に及ぼす影響

日本睡眠学会 第 39 回定期学術集会

2014 年 7 月 3-4 日(あわぎんホール・徳島県・徳島市)

澤田直樹、坂田ひろみ、中川俊、金井友宏、福井義浩 母子分離法を用いた発達期における概日リズム攪乱モデルの解析

第 53 回日本先天異常学会学術集会

2013 年 7 月 21 日~23 日(大阪千里ライフサイエンスセンター・大阪府・豊中市)

坂田ひろみ、嘉村拓朗、阪本晴菜、金井友宏、福井義浩 発達期の哺乳・摂食リズムと成熟後の行動に及ぼす影響

第 52 回日本先天異常学会学術集会

2012 年 7 月 8 日(東京女子医科大学・東京都・新宿区)

#### 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

福井 義浩 (FUKUI, Yoshihiro)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 50144168

