

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860910

研究課題名(和文) 発達期の概日リズムの乱れは成長後の栄養代謝に影響を与えるか？

研究課題名(英文) Does the disruption of circadian rhythms during development affect metabolism in adulthood?

研究代表者

澤田 直樹 (SAWADA, Naoki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50452644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は発達期の概日リズムの攪乱が成長後の代謝に与える影響を明らかにするために、母仔分離法により発達期概日リズム攪乱ラットを作製し、対照群との比較検討を行った。明暗周期下において、攪乱群は対照群と比較して、各週齢の摂餌量と体重、8週齢の血清レプチン濃度、9週齢の脂肪蓄積量、14週齢の高脂肪食の摂餌量、21週齢の糖負荷試験の血糖上昇曲線下面積の増加が認められた。一方で恒常明条件下では、両群間の摂餌量と体重に差が認められなかった。以上より、母仔分離による概日リズムの攪乱は、単独では大きな影響を及ぼさないが、明暗周期との関係により成長後のホルモン分泌や摂餌行動への影響として残り得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the effect of the disruption of the circadian rhythm (CR) during development on the metabolism in adulthood, rat pups were deranged of the CR by periodic maternal separation (MS) during the suckling period. Under light and dark cycle, deranged group showed a significant increase in body weight and food intake compared with the control. Serum leptin level at 8 weeks old (w), retroperitoneal fat depot on 9 w, amount of a high fat diet intake of 14 w, and the area under the curve of the oral glucose tolerance test on 21 w of CR-deranged group were significantly higher than those of the control. Under the constant light, however, there was no difference in body weight between two groups. These results suggest that the effect of CR-derangement by MS can remain after growth as hormonal, behavioral and metabolic changes by the relations with the light and dark cycle, although it does not give a profound effect on pups alone without resetting of CR by light and dark cycle.

研究分野：発生発達医学

キーワード：概日リズム レプチン 母仔分離 ラット

1. 研究開始当初の背景

発達期のストレス環境は、成長後の精神疾患や栄養代謝疾患の発症リスクと関連することが明らかになってきている。その動物モデルとして、授乳期間中の仔ラットを母獣から一定時間隔離する「母仔分離法」を用いた研究が広く行われており、成長後の多動や不安行動の増加等の行動異常を示すことが報告されている。しかしながら、実験条件により仔の体重の増減が異なり、栄養代謝への影響については一定の見解が得られていない。また、母仔分離を行わない群を対照とすると哺乳時間の違いが発育に与える影響を無視できないという問題が生じる。一方で、母仔分離は仔の概日リズムを調節することも知られている。申請者の所属研究グループは、暗期の母仔分離は母仔分離期間中の大脳皮質における時計遺伝子 *Bmal1* の発現リズムを反転させるとともに成長後に多動を示したのに対し、明期の母仔分離では *Bmal1* の発現リズムの乱れや成長後の多動が見られず、母仔分離無しの群と同様であることを見出した。さらに哺乳可能時間が等しいにも関わらず暗期の母仔分離群の方が明期の母仔分離群よりも体重が増加し、その差は成長後にさらに顕著になった。以上より、母仔分離が成長後の栄養代謝に与える影響には発達期の概日リズムの攪乱が関わっており、その影響が成長後も保持されるのではないかと、という考えに至った。

2. 研究の目的

本研究は上記のような背景から、概日リズムに乱れを生ずる暗期 12 時間の母仔分離を行った仔ラットを発達期概日リズム「攪乱群」、概日リズムに乱れを生じない明期 12 時間の母仔分離を行った仔ラットを「対照群」として作製し、両者を比較することで発達期の概日リズムの乱れが成長後の栄養代謝に与える影響を明らかにすることを目的とした。栄養代謝において中心的な役割を果たす肝臓における時計遺伝子や代謝関連遺伝子の発現リズムを調べるとともに、成長後の脂肪量・血清レプチン濃度・摂餌量の測定や糖負荷試験により、成長後の栄養代謝を評価した。

3. 研究の方法

(1) 動物の作製

妊娠ラットを明暗周期下で飼育し、生後 6 日でラット仔を体重の平均値に差がなくなるようにランダムイズし、仮親に哺乳させた。7~21 日の期間中に母ラットを別ケージに移動することで母仔分離を行い、暗期 12 時間の母仔分離を行う発達期概日リズム「攪乱群」、明期 12 時間の母仔分離を行う「対照群」を作製した。21 日齢で離乳し、その後は自由

摂餌とした。9 週齢において深麻酔下で開腹し、精巣上体脂肪および後腹壁脂肪を採取して重量測定を行った。週に一回体重および摂餌量の測定を行った。また高脂肪食の 24 時間の摂餌量および糖負荷試験に用いるラットは同条件で作製後に飼育を続け、群間の体重に有意差が無くなった 14 週齢において、一部のラットは高脂肪食 (HFD-60、オリエンタル酵母) の摂餌量調査に用いた。残りのラットは 21 週齢まで通常食で飼育を続け、糖負荷試験に用いた。また、明暗周期の無い恒常明条件下で出産させた仔についても明暗周期有りと同じ日齢の同じ時刻に母仔分離を行い、12 時間シフトさせた条件で両群を作製した。21 日齢で離乳後も恒常明条件下、自由摂餌で飼育を続け、8 週齢で解剖し脂肪組織の重量測定を行った。本研究は徳島大学動物実験委員会の承認を得て、同大学動物実験規則を遵守して遂行された。

(2) 定量 PCR による遺伝子発現解析

母仔分離による仔の概日リズムの乱れを評価するために明暗周期下で飼育した母仔分離中の 3 週齢 (16~20 日齢) において、明期開始時を ZT (Zeitgeber Time) 0 として、4 時間ごとの ZT 22、ZT 2、ZT 6、ZT 10、ZT 14、ZT 18 にケージから取り出した仔を断頭し直ちに肝臓を採取し、液体窒素中で凍結後に -80 で保存した。また成長後の 7 週齢においても同様に経時的に肝臓サンプルを採取・保存した。凍結サンプルから RNAiso (TaKaRa) を用いて Total RNA を抽出した。得られた Total RNA を DNase I でゲノム DNA を除去した後に M-MLV (Lifetechnologies) を用いて cDNA を合成し、栄養代謝と密接な関係を持つ時計遺伝子である rat *Bmal1* および栄養代謝酵素等を誘導する中心的な転写因子である rat PGC-1 等に特異的なプライマーおよび、SYBR® Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いてリアルタイム PCR 法による定量的遺伝子発現解析を行った。発現量の内部補正には rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。遺伝子発現リズムの振幅と頂点位相 (アクロフェイズ) はコサイナー法 (acro.exe, version 3.5, designed by Dr. Refinetti) により解析した。

(3) テレメトリーシステムを用いた深部体温および活動量のモニター

仔ラットを 18 日齢において深麻酔下で開腹し、テレメトリーシステムの送信機 (TA-F10) を腹腔内に留置した。覚醒後に受信ボード (RPC-1) 上にのせたホームケージに戻し、母獣とともに飼育した。母仔分離中および 21 日齢で離乳後に自由摂餌とした条件下での深部体温および活動量の変化を 5 分ごとにモニターした。リズムの解析は 3 - 2 と同様に行った。

(4) 血清レプチン濃度の測定

摂餌量や脂肪蓄積量に群間の差が見られたため、その機序を考察するために、摂食を抑制し代謝を促進するホルモンであるレプチンの血清中濃度を調べた。血清レプチン濃度は明期から暗期への移行期に高く、暗期から明期に低くなる日内変動を示すことから、ZT 2、ZT 10、ZT 18 の3点で採血し、経時的変化を調べた。8週齢に自由摂餌下において尾静脈から採血管を用いて採血し、遠心して得た血清を-80℃で保存した。レプチン濃度の測定には RAT LEPTIN ELISA KIT (Millipore) を用いた。

(5) 糖負荷試験

脂肪蓄積量の増加は糖代謝にも影響することから、成長後の糖代謝を評価するためにブドウ糖負荷試験を行った。母仔分離を行い、離乳後21週齢まで通常食で飼育した群において、1晩絶食の後の翌朝に空腹時血糖を測定し、1g/kg体重のグルコース溶液をゾンデを用いて経口投与した。糖負荷後30分、60分、120分に尾静脈から採血し、グルテストNeo (三和化学研究所) を用いてグルコース濃度を測定した。得られた値を元に血中グルコース濃度の上昇曲線下面積 (AUC) を台形公式を用いて計算した。

4. 研究成果

(1) 母仔分離が仔ラットの時計遺伝子の発現リズムに与える影響

母仔分離中の肝臓における時計遺伝子 *Bmal1* と代謝関連遺伝子 *PGC-1* の発現リズムは対照群では無処置群と同様の振幅が見られたのに対し、攪乱群では振幅が小さくなり、*PGC-1* ではアクロフェイズがシフトしていた (図1A)。一方で、離乳後に自由摂餌下で飼育した後の10週齢では、両群におけるこれらの遺伝子の発現の振幅およびアクロフェイズは同様であった (図1B)。その他の代謝関連遺伝子である *GR*、*FGF21*、*PPAR* についても、振幅やアクロフェイズに群間の差は見られなかった。以上より、同じ12時間の母仔分離であっても、明期の母仔分離は仔の肝臓の概日リズムを乱さないが、暗期の母仔分離では乱されることが明らかとなった。また、その乱れは離乳後に自由摂餌とした後は消失した。

(2) 恒常明条件下において母仔分離が仔ラットの体温および活動量の概日リズムに与える影響

仔ラットの代謝は離乳とともに劇的に変化する。(1)において暗期の母仔分離により生じた概日リズムの乱れが成長後に消失した原因が、離乳に伴う変化によるものなのか、それとも母仔分離による刺激が無くなり明暗周期に同調したことにより生じたものなのかを明らかにするために、明暗周期の無

い恒常明条件下で出生した仔ラットについて母仔分離により概日リズム攪乱モデルを作製し、テレメトリーシステムを用いて継続的に仔の体温と活動量の概日リズムをモニターした。その結果、離乳直後の対照群は無処置群と同様に深部体温および活動量のアクロフェイズが本来の明期あたる時刻に見られたのに対し、攪乱群では逆転していた (図2A)。さらに、40週齢まで恒常明で飼育した後も同様の傾向が見られた (図2B)。一方で、明暗周期下で作製した攪乱群は離乳後の体温および活動量の日内リズムに対照群との差が見られなかった。以上より、明暗周期有りの条件下の攪乱群で見られた概日リズムの乱れが消失した原因は、離乳による変化よりも、明暗周期への同調が原因であると考えられた。

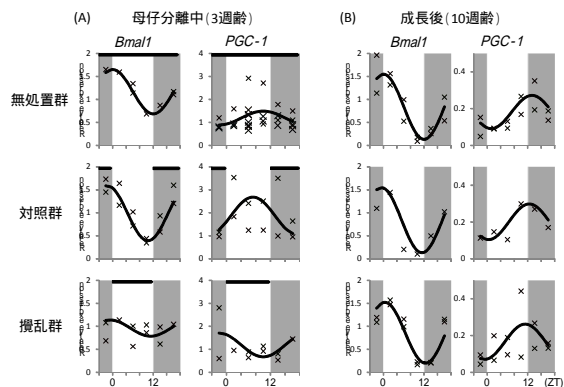


図1. 肝臓における遺伝子発現リズム

各サンプルの値をxで、各時間の平均値から得られたコサインカーブを線で示す。母仔分離中の母鼠との同居時間をグラフ上部に黒線で示す。グラフ内の灰色は暗期を、白は明期を示す。ZT: zeitgeber time.

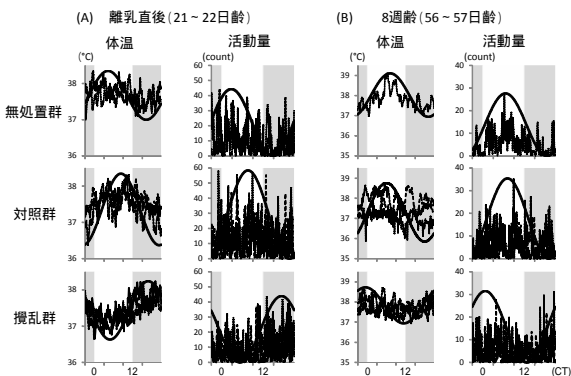


図2. 恒常明条件下で母仔分離を行った各群の体温および活動量の日内変動

各個人の値を点線で、平均値から得られたコサインカーブを実線で示す。グラフ内の灰色は本来の暗期を、白は本来の明期を示す。CT: circadian time.

(3) 発達期の概日リズムの乱れが仔ラットの体重、摂餌量、脂肪蓄積量に与える影響

次に、発達期の概日リズムの攪乱が仔ラットの体重増加に与える影響を検討した。明暗周期下で母仔分離を行った群では概日リズム攪乱群の体重増加は対照群と比較して有意に促進された。この体重差は離乳後も保持され、また、概日リズム攪乱群では離乳後の摂餌量も増加し、8週まで有意差が見られた (図3)。

9週齢において、体重および体重当たりの精巣上体脂肪と後腹壁脂肪の量は攪乱群で有意に増加していた (図4)。一方で、恒常明で母仔分離を行った2群間に体重、摂餌量、

脂肪量の差は見られなかったため、以降の解析は明暗周期下の群を対象とした。

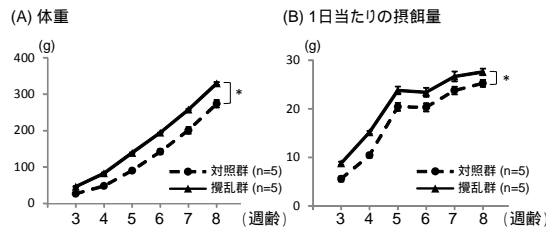


図3. 離乳後仔ラットの体重および摂餌量の推移
Mean ± SEM, *p < 0.01.

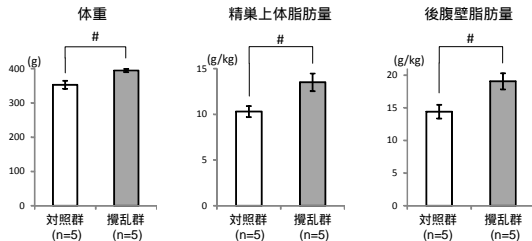


図4. 明暗周期下で母子分離を行った各群の9週齢における体重と脂肪量
Mean ± SEM, #p < 0.05.

以上より、母子分離は単独では仔の成長に大きな影響を及ぼさないが、明暗周期との関係により体重増加、摂餌量、成長後の脂肪蓄積量に影響を及ぼす可能性が示唆された。

(4) 概日リズムの乱れが成長後の血清ホルモン、摂餌行動、糖代謝に与える影響

脂肪量に群間差が見られたことから、脂肪組織から分泌され代謝や摂食を調節するホルモンであるレプチンの測定を測定した。攪乱群の血清レプチン濃度は、全ての時刻において対象群よりも有意に高かった(図5)。精巣上体脂肪におけるレプチン mRNA 発現も、有意ではないが同様の傾向が見られた。レプチンは摂食を調節することから、摂餌量を測定した。13週齢での通常食の摂餌量には差が見られなかったが、14週齢において高脂肪食開始1日目の24時間の摂取エネルギーは概日リズム攪乱群において対象群よりも有意に多かった(図6)。2日目以降は差が消失した。通常食で飼育した群の21週齢における糖負荷試験の結果、概日リズム攪乱群の曲線下面積は対象群と比較して有意に増加していた(図7)。以上の結果は、発達期の概日リズムの攪乱が、成長後のホルモンの分泌や感受性、摂餌行動、耐糖能への影響として成長後も残り得る可能性を示唆する。

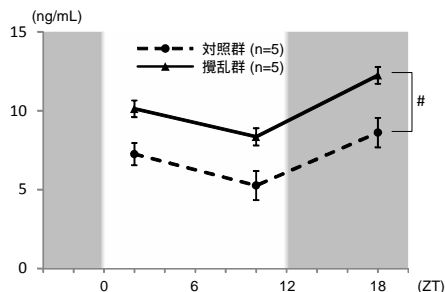
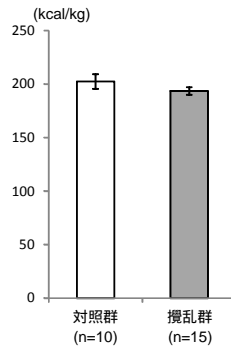


図5. 成長後仔ラットの血清レプチン濃度の日内変動
Mean ± SEM, #p < 0.05.

通常食の摂取エネルギー



高脂肪食の摂取エネルギー

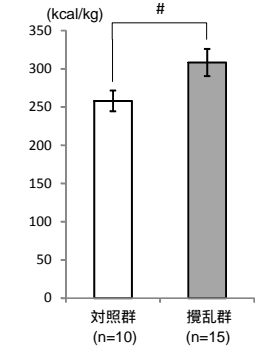


図6. 通常食および高脂肪食の摂取量
Mean ± SEM, #p < 0.05.

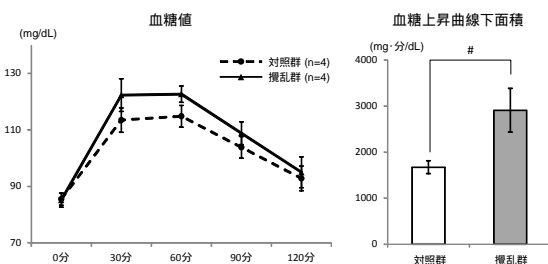


図7. 糖負荷試験における血糖と血糖上昇曲線下面積
Mean ± SEM, #p < 0.05.

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, Fukui Y. Effect of periodic maternal separation on fat mass of rat offspring in adulthood vary with the separation timing, during either light or dark phase. Congenit Anom (Kyoto) (abstract) 2014, 54(4), A10. 査読無

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. Congenit Anom (Kyoto) (abstract) 2013, 53(4), A16. 査読無

[学会発表](計4件)

澤田直樹, 坂田ひろみ, 中川俊, 金井友宏, 嘉村拓朗, 坂本晴菜, 福井義浩 母子分離リズムがラット仔の概日リズムに与える影響 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会2013年3月30日(香川県高松市サンポート高松)

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回先天異常学会学術集会2013年7月23日(大阪府豊中市千里ライフサイエンスセンター)

澤田直樹, 坂田ひろみ, 福井義浩 幼若期

の生活リズムの乱れが成長に与える影響
第 68 回日本解剖学会中国・四国支部学術集
会 2013 年 10 月 2 日(鳥取県米子市鳥取大学)

澤田直樹、坂田ひろみ、福井義浩 母仔分離のタイミングが成熟後の脂肪蓄積に与える影響 第 54 回日本先天異常学会学術集会 2014 年 7 月 26 日(神奈川県相模原市麻生大学)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

澤田 直樹 (SAWADA, Naoki)

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：50452644