

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：17702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23500783

研究課題名(和文) カルニチン投与が全身の代謝および中枢神経系におよぼす持続的作用

研究課題名(英文) Prolonged effect of carnitine administration on metabolism and central nervous system of fasted carnitine-deficient mice

研究代表者

吉田 剛一郎 (YOSHIDA, GOICHIRO)

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・准教授

研究者番号：10274870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カルニチン欠損JVSマウスを用いて、カルニチン投与が全身の代謝および中枢神経系におよぼす持続的效果を検討した。絶食によってJVSマウスの自発行動量は低下した。カルニチンの1回投与により、低下した自発行動量と脂肪の消費は増加し、その投与効果は、カルニチンレベルが投与前の低いレベルに復した後も、少なくとも2日間は継続した。JVSマウスでは、絶食により視床下部外側野におけるc-Fos陽性のオレキシン神経細胞の割合は低下した(カルニチン投与によって改善する)。これらの結果は、絶食JVSマウスで低下する自発行動量には、オレキシン神経活動の低下が関与することを示す。

研究成果の概要(英文)：We examined the roles of carnitine in the general metabolism and the central nervous system, and the prolonged effects of carnitine administration to the fasted carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice. Fasting reduced locomotor activity (LA) of JVS mice. Single carnitine administration caused an increase of the reduced LA and the fat expenditure, and the effects were prolonged for at least two days after the administration (as low as at the original carnitine-deficient state). In JVS mice, fasting also caused a decreased percentage of c-Fos positive orexin neurons in the lateral hypothalamus (ameliorated by carnitine administration). These results suggest that the reduced LA in fasted JVS mice is related to the inhibition of orexin neuronal activity.

研究分野：総合領域

キーワード：カルニチン 脂肪酸酸化 JVSマウス 絶食 オレキシン 中枢神経系

### 1. 研究開始当初の背景

マラソンなど持久的な運動を遂行するには、脂肪からのエネルギー産生が必要となる。脂肪酸酸化によるエネルギー産生では、そのコファクターとして機能するカルニチンを介して、長鎖脂肪酸アシル CoA をミトコンドリアマトリックスに取り込むことが必須となる。すなわち、カルニチンは脂肪からのエネルギー産生様式において必要不可欠なものである。しかしながら、持久的な運動を行う際、カルニチンがそのエネルギー産生におよぼす影響については、カルニチン投与を行って効果があるとするもの、効果はないとするものに分かれ、明確に出来ないというのが現状である。その詳細を検討するために、カルニチンを先天的に欠損し、脂肪からのエネルギー産生に支障をきたすモデル動物 juvenile visceral steatosis (*jvs<sup>-/-</sup>*) マウスを入手した。*Jvs<sup>-/-</sup>* マウスは、細胞膜カルニチン輸送体 OCTN2 の遺伝子異常 (*slc22a5* 遺伝子産物の L352R 変異) に基づく、全身性のカルニチン欠損を呈するモデル動物である。*Jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは餌を除くこと(絶食)によって、暗期活動期における自発行動量および酸素摂取量が低下することを見出した。絶食により低下した *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量と酸素摂取量は、カルニチンの腹腔内 1 回投与により野生型 (*jvs<sup>+/+</sup>*) マウスと差のないレベルにまで回復し、その投与効果は長期(少なくとも 2 日間)にわたり続く。*Jvs<sup>-/-</sup>* マウスに投与されたカルニチンは、血中と肝臓でヘテロ接合体 (*jvs<sup>+/-</sup>*) マウスのレベルにまで達する顕著な取り込みを認めるが、投与 12 時間後には元の低いレベルに復する。一方、心臓、骨格筋、精巣におけるカルニチンの取り込みは極わずかであり、脳への取り込みは認められない。脂肪酸代謝パラメーターである血中の遊離脂肪酸とケトン体、および肝臓総脂質量は、肝臓のカルニチンレベルに相応するように投与 12 時間後には全て元のレベルに復する。すなわち、血中や臓器のカルニチンレベルおよび脂肪酸代謝パラメーターの変動からでは、カルニチンの自発行動量と酸素摂取量におよぼす持続的投与効果の説明は難しい。呼吸ガス分析値および尿中窒素排出量から三大栄養素(糖質、脂肪、タンパク質)別の消費エネルギーを求めたところ、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスではカルニチン投与 2 日後においても対照である生理食塩水投与 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスと比較して、脂肪からのエネルギー産生は亢進を示す。さらに、カルニチン投与 36 時間後に、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスの尾静脈より <sup>14</sup>C-palmitate を投与して、呼吸中に排出される <sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub> 発生量を測定したところ、生理食塩水投与 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスより多量で、絶食 *jvs<sup>+/+</sup>* マウスのレベルに匹敵する脂肪酸代謝初速度を示す。エネルギー産生面からみると、カルニチン投与を行った *jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは、血中や臓器におけるカルニチンレベルが低下した後も、長鎖脂肪酸酸化レベルは維持されている。これは、カルニチン以外にも

長鎖脂肪酸の利用を律速する因子が存在することを示す。

一方、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量低下の機構を明らかにする過程で、覚醒と関連のあるオレキシン神経活動との関係を見出した。絶食下において、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスの暗期活動期における自発行動量が低下した際、視床下部外側野における c-Fos 陽性のオレキシン神経細胞の割合は激減する。

### 2. 研究の目的

カルニチン投与を行った絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスは、血中や肝臓におけるカルニチンレベルが低下した後も、長鎖脂肪酸酸化レベルは維持されており、エネルギー産生の増大が自発行動・運動量を増加させる要因になっていると考えられる。しかしながら、その機構については不明であるので、全身の代謝、および中枢神経系への作用の双方から検討を行う。

全身の代謝については、長鎖脂肪酸の酸化を調節する因子について検討を行う。長鎖脂肪酸酸化には、その律速因子である carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1、CPT1 の活性を阻害する malonyl-CoA が関与する。また、malonyl-CoA の調節に関与する acetyl-CoA carboxylase (ACC)、その調節には AMP-activated protein kinase (AMPK) が関与しており、AMPK 自身はレプチンと交感神経により活性化される。この一連の系について、カルニチンの持続的投与効果の認められる期間において、それぞれの変化を検討する。

中枢神経系への作用については、オレキシン神経系を介した神経伝達機構について検討を行う。脳室内へのオレキシン投与によって脂肪酸酸化は持続的に活性化されることから、中枢神経系の活動には、末梢における脂肪酸酸化を調節する機能があると考えられる。したがって、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスの絶食時における自発行動量低下においては、中枢神経系、とくにオレキシン神経活動の関与を検討する必要がある。*Jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量低下時において、視床下部外側野における c-Fos 陽性のオレキシン神経細胞の割合を検討する。また、オレキシン欠損症に特徴的な睡眠覚醒サイクルについて検討を行うことにより、オレキシン神経系を介した神経伝達機構の関与を明らかにする。

### 3. 研究の方法

カルニチン投与が *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量と酸素摂取量におよぼす持続的効果について、全身の代謝および中枢神経系の双方から検討を行う。全身の代謝については、脂肪酸酸化をターゲットにして、カルニチンの律速酵素である CPT1 のレベル、その調節に関与する AMPK の活性変化など、脂肪酸酸化の調節に関わる因子について測定を行う。中枢神経系については、オレキシン神経活動を中心に検討を行う。

本研究には、細胞膜カルニチン輸送体

OCTN2 を欠損する *jvs<sup>-/-</sup>* マウスと、対照として *jvs<sup>+/+</sup>*、ならびに *jvs<sup>+/-</sup>* マウスを用いる。本動物実験は、鹿屋体育大学動物実験指針、および鹿児島大学動物実験指針に基づき実施する。

(1) カルニチンの自発行動量・酸素摂取量におよぼす持続的投与効果と全身の代謝

カルニチン投与が *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量と酸素摂取量におよぼす持続的効果について、その詳細なメカニズムの検討を進める。カルニチンの *jvs<sup>-/-</sup>* マウスに対する持続的投与効果の認められる期間において、カルニチンの律速酵素 CPT1 の変化について検討を行う。肝臓における CPT1 レベルについて、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により分析を行う。上流に位置する AMPK の変化については、そのリン酸化を免疫抗体法により分析する。

(2) カルニチンの自発行動量・酸素摂取量におよぼす持続的投与効果と中枢神経系

カルニチンの自発行動量・酸素摂取量におよぼす持続的投与効果と中枢神経系の関与について、その指標となるオレキシン神経活動については、脳内神経活動の指標となる c-Fos を発現した視床下部外側野のオレキシン神経細胞について、灌流固定後、切片を作成し、それぞれの抗体を用いた二重免疫染色法により検討を行う。一方、オレキシシグナルの低下については、その裏付けとなる睡眠覚醒サイクルについて検討を行う。マウスの睡眠覚醒サイクルについて、EEG/EMG を測定することにより覚醒、REM 睡眠および non-REM 睡眠に分類し分析を行う。*Jvs<sup>-/-</sup>* マウスにおけるカルニチンの持続的投与効果について、オレキシン神経系を介した神経伝達機構の関与を明らかにする。

#### 4. 研究成果

マウスの自発行動量、および酸素摂取量の持続的な増加の要因として考えるエネルギー産生の亢進について、エネルギー・センサーである AMPK について測定を試みたところ、その下流に位置する ACC とともに、リン酸化レベルは特定できなかった。そこで、AMPK の上流にあり、交感神経系を刺激して脂肪酸代謝系を賦活化する、5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) の投与を行い、自発行動量、酸素摂取量におよぼす影響を検討した。しかしながら、AICAR 投与は、糖代謝におよぼす影響が大きく、低血糖状態にある絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスに適用することは困難であった。

交感神経系において、AMPK の上流に位置するレプチンについて検討したところ、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスへのカルニチン投与後に、血中レプチンレベルは増加を示した。その意義としては、AMPK を活性化し、その下流にある ACC、および malonyl-CoA が調節を受けて、カルニチンの律速酵素である CPT1 を活性化し、持続的な酸化を生じることにあると考える。レプチンに加えて、血中アシルグレリンのレベル

も変化したが、食欲に関すること以外にその意義は不明である。

エネルギー不足が *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量に影響をおよぼすのかを検討するため、変動の大きい暗期 20 時から 23 時の 3 時間における自発行動について、ショ糖および中鎖脂肪酸 (MCT) の投与効果を検討した。MCT は、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは代謝可能であることを肝臓の還流実験でケトン体が生成されることにより確認している。カルニチンを投与した *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量は、*jvs<sup>+/+</sup>* マウスのレベルにまで上昇を示した。ショ糖の経口投与を 12 時、16 時、20 時の 3 回行うと、自発行動量は生食投与を行った *jvs<sup>-/-</sup>* マウスと比較して有意に上昇を示した。しかしながら、同様に絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスに MCT を経口投与した結果、低下した自発行動量を増やすには至らなかった。

一方、同様の実験条件において、12 時から 20 時までの酸素摂取量を測定した結果、絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの生食投与群と比較し、ショ糖および MCT 投与群ともに酸素摂取量は有意に増加した。このことは、投与されたショ糖に加えて、自発行動量を増やすまでには至らなかった MCT も、エネルギー産生には利用されているということを示す。

また、血中パラメーターが自発行動量の規定要因になっているのかということについて、血糖や血中遊離脂肪酸レベルと、暗期 3 時間の自発行動量との関係を検討したところ、高い相関は認められなかった。すなわち、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスについては、エネルギー不足のみにより自発行動の低下が起こっているのではないということを示す。

そこで、中枢神経刺激作用のあるモダフィニルを、絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスに対して 18 時に腹腔内投与し、自発行動量におよぼす効果を検討した。低下した *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの暗期の自発行動量は、モダフィニルの投与によって回復を示した。すなわち、エネルギー不足の状況下でも、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動量は上昇することを示すものである。

カルニチン欠損が、長鎖脂肪酸の利用を制限することによる熱産生への影響と、そのことが *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動におよぼす影響を検討した。23 時における摂食下での *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの体温 (直腸温) は、平均 36.9 であるのに対して、絶食下になると平均 32.5 にまで低下した。低下を示した *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの体温は、カルニチン投与、およびショ糖投与により摂食条件の *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの体温レベルにまで上昇した。また、MCT 投与群においても、体温は絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスと比較して有意な上昇を示した。体温と暗期 3 時間の自発行動量との関係をみたところ、弱い相関を認めた。

覚醒状況と関連のあるオレキシンについて、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスの視床下部外側野における c-Fos ポジティブなオレキシン神経細胞の割合を検討した。摂食 21 時の条件下と比較して、絶食 21 時における *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの c-Fos 表

ジティブなオレキシン神経細胞の割合は激減した。そこで c-Fos ポジティブなオレキシン神経細胞の割合と、暗期 3 時間の自発行動量との関係を検討した。絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは、暗期 3 時間の自発行動量が低下しており、かつ c-Fos ポジティブなオレキシン神経細胞の割合も 5% と低下を示した。しかしながら、カルニチン投与を行った *jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは、摂食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスのレベルにまで回復を示した。暗期 3 時間の自発行動量と c-Fos ポジティブなオレキシン神経細胞の割合の関係は高い相関 ( $r=0.90$ ) を示しており、*jvs<sup>-/-</sup>* マウスの自発行動には、オレキシン神経活動が関与していることを示す。

絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは、オレキシンシグナルが低下していたことから、その裏付けとして、脳波および筋電図を用いて、睡眠覚醒サイクルについて検討を行った。絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは、暗期の覚醒期に覚醒レベルが低下し、ノンレム波の出現が認められた。ヒブノグラムでは、摂食条件下ではほとんど認められない消灯後のレムおよびノンレム波が、絶食した *jvs<sup>-/-</sup>* マウスの暗期覚醒期において頻発しており、覚醒のフラグメンテーション化が認められた。これらは、オレキシン欠損マウスと同様の睡眠パターンを示しており、絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスでは、オレキシンシグナルが低下していることの裏付けとなるものである。

以上の結果は、絶食 *jvs<sup>-/-</sup>* マウスで低下する自発行動量には、オレキシン神経活動の低下が関与することを示す。

#### 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 8 件)

Senpuku H, Miyazaki H, Yoshihara A, Yoneda S, Narisawa N, Kawarai T, Nakagawa N, Miyachi M, Tada A, Yoshida G, Shimada M, Ohashi M, Nishimuta M, Kimura Y, Yoshitake Y. CD56(dim)CD16(high) and CD56(bright)CD16(-) cell percentages associated with maximum knee extensor strength and incidence of death in elderly. Springerplus, 5: 244, 2016. 査読有, DOI:10.1186/s40064-016-1884-3.

Roussel J, Labarthe F, Thireau J, Ferro F, Farah C, Roy J, Horiuchi M, Tardieu M, Lefort B, Francois Benoist J, Lacampagne A, Richard S, Fauconnier J, Babuty D, Le Guennec JY. Carnitine deficiency induces a short QT syndrome. Heart Rhythm, 13: 165-174, 2016. 査読有, DOI:10.1016/j.hrthm.2015.07.027.

堀内正久, 中熊美和, 有村恵美, 牛飼美晴, 吉田剛一郎. 実験研究による解析, 食と生活習慣関連疾患 (心疾患・脂肪肝・疲労病態). 日本衛生学雑誌, 70: 110-114, 2015. 査読有

Du J, Cleghorn W, Contreras L, Linton JD, Chan GC, Chertov AO, Saheki T, Govindaraju V, Sadilek M, Satrustegui J, Hurley JB. Cytosolic reducing power preserves glutamate in retina. Proc Natl Acad Sci USA, 110: 18501-18506, 2013. 査読有, DOI:10.1073/pnas.1311193110.

Llorente-Folch I, Sahun I, Contreras L, Casarejos MJ, Grau JM, Saheki T, Mena MA, Satrustegui J, Dierssen M, Pardo B. AGC1-malate aspartate shuttle activity is critical for dopamine handling in the nigrostriatal pathway. J Neurochem, 124: 347-362, 2013. 査読有, DOI:10.1111/jnc.12096.

Gomez-Galan M, Makarova J, Llorente-Folch I, Saheki T, Pardo B, Satrustegui J, Herreras O. Altered postnatal development of cortico-hippocampal neuronal electric activity in mice deficient for the mitochondrial aspartate-glutamate transporter. J Cereb Blood Flow Metab, 32: 306-317, 2012. 査読有

吉武裕, 東恩納玲代, 吉田剛一郎. 高血圧の運動療法に関するケースレポート; 高齢期の運動療法. 臨床スポーツ医学, 29: 1141-1146, 2012. 査読有

吉武裕, 吉田剛一郎, 東恩納玲代. 災害時におけるエネルギーの確保. ビタミン, 85: 509-512, 2011. 査読有

#### [学会発表](計 5 件)

吉田剛一郎, 東恩納玲代, 吉武裕. カルニチン投与は何を起こしているのか—全身の代謝と中枢神経系における検討. 九州体育・スポーツ学会第 63 回大会, 2014 年 9 月 12 日~14 日. 別府大学 (大分県・別府市)

吉田剛一郎, 吉武裕. カルニチンの投与と脂肪酸代謝の評価. 九州体育・スポーツ学会第 62 回大会, 2013 年 9 月 14 日~15 日. 九州共立大学 (福岡県・北九州市)

Yoshitake Y, Kawano Y, Higashionna A, Yoshida G, Fan X, Hamaoka T. Assessment of leg power using stairs with a low step height in elderly. American College of Sports Medicine 59th Annual Meeting and 3rd World Congress on Exercise is Medicine, May 29 ~ June 2, 2012. San Francisco (USA)

Yoshitake Y, Yoshida G, Higashionna A. The important of nutrition management on disaster recovery. Global Symposium on Disaster Nutrition for Citizen, November 26, 2011. Sendai (Japan)

吉田剛一郎, 吉武裕. カルニチン投与が全身の代謝と中枢神経系におよぼす作用. 九州体育・スポーツ学会第 60 回記念大会, 2011 年 8 月 27 日~28 日. 名城大学 (沖縄県・名護市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 剛一郎 (YOSHIDA, Goichiro)  
鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・准教授  
研究者番号：10274870

(2)研究分担者

佐伯 武頼 (SAHEKI, Takeyori)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究員  
研究者番号：10056070

吉武 裕 (YOSHITAKE, Yutaka)  
鹿屋体育大学・スポーツ人文・応用社会科学系・教授  
研究者番号：00136334

(3)連携研究者

堀内 正久 (HORIUCHI, Masahisa)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：50264403