

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 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590224

研究課題名（和文） 脳内 AMPK の睡眠ホメオスタシスおよび体温調節における役割と
そのメカニズム研究課題名（英文） The role and mechanism of central AMPK on sleep homeostasis
and body temperature regulation

研究代表者

勢井 宏義（SEI HIROYOSHI）

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：40206602

研究成果の概要（和文）：細胞内エネルギーセンサーである AMPK は、6 時間の断眠によってリン酸化される。また、AMPK 活性化薬 AICAR の脳室内投与は睡眠期脳波徐波成分を増大させ、一方、AMPK 阻害薬 Compound C は徐波成分を減弱させる。以上から、AMPK は睡眠ホメオスタシスに関与していることが考えられたが、絶食によって AMPK が活性化されても脳波徐波成分に変化はなく、また、PPAR α ノックアウトマウスでは上記薬物の効果がない。したがって、AMPK の睡眠ホメオスタシスに関する効果は PPAR α を介することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：AMPK, a cellular energy sensor, is activated by 6-hour sleep deprivation. Intra cerebro ventricular injection of AICAR, an enhancer of AMPK, induces the enhancement of EEG slow wave activity (SWA) during NREM sleep, while compound C, an inhibitor of AMPK, induces suppression of SWA. These data indicate the involvement of AMPK on sleep homeostasis. However, the activation of AMPK caused by starvation do not change the EEG SWA. Furthermore, in PPAR α KO mice, above-mentioned AMPK-related drugs do not work, suggesting that the role of AMPK on the sleep homeostasis needs PPAR α function.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：睡眠、ホメオスタシス、AMPK、PPAR

1. 研究開始当初の背景

日本では生活習慣の欧米化にともない糖尿病の患者が増加している。いわゆる予備軍も含めるとその数は約 1870 万人と推計されており（厚生労働省「国民健康・栄養調査結果の概要」平成 18 年）、対策が急がれる疾患の一つである。睡眠も現代のストレス社会においてその悩みを抱えるヒトが多い。日本人

の 4～5 人に一人が何らかの睡眠障害を持っていると言われている。その中で注目すべきは、糖尿病患者の多くが不眠など睡眠障害を持っていることである。また逆に、糖尿病の治療薬を服薬する前に睡眠薬を服薬し睡眠を改善すると、HbA1c が有意に低下するというケースも報告されている（日本医師会雑誌、平成 20 年・第 137 巻・第 7 号、特集「睡

眠障害の診断と治療)。さらに、ヒトにおいて、実験的に深い睡眠(ノンレム睡眠 3+4)を3晩阻害すると、インシュリン抵抗性の上昇、耐糖能の低下が引き起こされる(Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:1044-9)。これらの事実は、糖・脂質代謝機構と睡眠機構が密接に関連しあっていることを示している。

一方、体温や代謝、摂食行動、睡眠などの司令塔は脳の視床下部である。視床下部は、グルコースや脂肪酸、レプチンやインスリン、グレリンなどのアディポカイン、ホルモンを介して生体エネルギーの状態をモニターし、これらの情報を統合して全身の代謝や摂食行動を調節する。その中であって、AMPKは、細胞内エネルギーレベルのセンサーと呼ばれ、AMP/ATP比の上昇によって活性化される。また、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CAMKK) β や LKB1、TAK1 のキナーゼによってもリン酸化を受け活性化されるが、視床下部では、CAMKK β が AMPK の活性制御に関わっている。活性化した AMPK は、acetyl-CoA carboxylase (ACC) をリン酸化することによりその活性を抑制、ACC の代謝産物である malonyl-CoA 量を低下させる。その結果、ミトコンドリアの carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) に対する抑制作用を解除し、脂肪酸化を亢進する。AMPK はレプチン、グレリン、グルコースなどのシグナル伝達を担う細胞内分子として働く (see review: Nutrition 2008; 24:786-790)。

睡眠の調節にはサーカディアンリズムとホメオスタシスの2つの機構によって調節されている。サーカディアンリズム機構、すなわち、生物時計は睡眠発生のタイミングを制御している。生物時計を司る時計遺伝子の異常は、睡眠相遅延症候群などの睡眠障害を引き起こす。一方、睡眠は強制的に阻害(強制覚醒=断眠)されると、失った分を長さで取り戻すのではなく、深さで補おうとする。これが、睡眠のホメオスタシスと呼ばれる仕組みである。睡眠の深さは、ノンレム睡眠中の脳波に出現する徐波成分の強さ (slow wave activity; SWA) で表現される。サーカディアンリズムの制御下、SWA は先行する覚醒の長さ に比例して強くなる。

2. 研究の目的

以上の背景や実験結果を踏まえ、今回、AMPK が睡眠のホメオスタシスにどのように関わるのか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、糖尿病などの代謝疾患との関連性について、睡眠障害モデルにおける脳内 AMPK 活性と糖・脂質代謝機能を調べることにより明らかにする。AMPK の活性化は、我々が観察したような覚

醒の他、絶食や運動時におこる。これは、AMPK の賦活剤が睡眠を深くするという、我々のデータとは相反する。従って、AMPK の活性化そのものが SWA を増強したのではなく、AMPK の活性化によって誘導あるいは活性化される系が SWA の増減、すなわち睡眠のホメオスタシスを司っていると仮設される。本研究では、まず、絶食や制限給餌によって誘導される SWA の増減を明らかにする。視床下部における摂食・代謝調節機構において、AMPK の下流にはミトコンドリアにおける脂肪酸化のシステムがあり、AMPK の活性化は、ミトコンドリアにおける脂肪の β 酸化を促進する。本研究では、手がかりとして、脂肪酸化に深く関わる PPAR α に着目し、PPAR α ノックアウトを用いて AMPK との関連性を調べる。

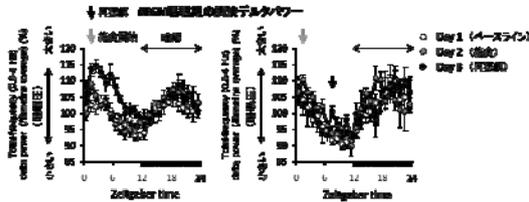
3. 研究の方法

- (1) すべての実験で8~10週齢の雄マウスを用いた。薬理学的な実験においては Jcl/ICR マウスを、ノックアウトマウスの実験では C57BL/6 マウスを使用した。
- (2) 睡眠・覚醒の評価は、脳波・筋電図を記録することで実施した。睡眠・覚醒段階の判定は、Spike2 ソフトウェアを利用した視察判定による。6秒間を1エポックとし、脳波のFFT解析もそのエポック毎に行った。SWA に関しては、NREM 睡眠と判定されたエポックでのパワーを算定し、睡眠・覚醒量とともに、1時間毎にまとめた。
- (3) 薬物の投与は、第3脳室内に留置したカニューレを介した中枢投与とした。ハーバードポンプを用いて、脳への侵襲を極力防ぐよう、ゆっくりと微量を注入した。
- (4) 生化学的な定量には、real-time RT-PCR、ウェスタンブロットティング法を用いた。また、グルタミン酸など、神経伝達物質の放出量については、脳内微小透析(マイクロダイアリシス)法を用いた。
- (5) PPAR α ノックアウトマウスは、ジャクソンラボより購入したものを筑波・産業総合研究所より譲り受けた。

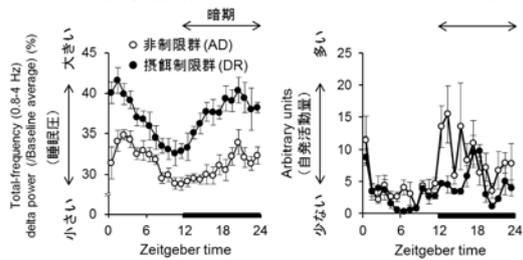
4. 研究成果

- (1) 断眠によって活性化する AMPK の動向を組織学的に観察するため、抗体を用いた免疫染色を試みたが、評価できるほどの染色結果が得られなかった。
- (2) 野生型マウスでは、AMPK の活性化薬 AICAR の脳室内投与は睡眠期の SWA を増強し、逆に、抑制薬である CompoundC は減弱させるが、同様の操作を PPAR α ノックアウトマウスで行ったところ、その反応は観察されなかった。AMPK の SWA への関与は PPAR α あるいはその機能を介することが分かった。

- (3) AMPK や PPAR α は 6 時間の断眠で活性化された。
- (4) AMPK や PPAR α は絶食によっても活性化される。24 時間の絶食による睡眠期 SWA の変化を観察したところ、絶食中には変化がなく、再摂餌後、SWA が 12 時間にわたって増強されることが分かった。しかし、その際、AMPK の活性化は観察されなかった。



- (5) PPAR α ノックアウトマウスは、24 時間にわたり、睡眠期 SWA の増強が観察された。この結果は、我々が以前観察した、PPAR のアゴニスト、ベザフィブラート投与の結果と相反するものであり、PPAR α も AMPK と同様、睡眠期 SWA に対して直接の役割を有しているわけではないことが示唆された。断眠、ベザフィブラート、ノックアウトマウスの結果すべてに共通する項目を検討したところ、ケトン体比 (アセト酢酸 / β -ヒドロキシ酪酸) が、SWA の増減に並行して変化していることが分かった。
- (6) 脳内 PPAR α をオリゴヌクレオチドを用いて、その発現を抑制したところ、SWA が減弱するとともに、ケトン体比は減少した。(5) と一致する結果であった。
- (7) ケトン体を脳室内に投与して睡眠および SWA を観察したところ、アセト酢酸は SWA を増強することが分かった。一方、 β -ヒドロキシ酪酸は SWA に影響しなかった。
- (8) アセト酢酸を脳室内に投与した際の大脳皮質におけるグルタミン酸の放出量について脳内微小透析法を用いて定量したところ、有意に抑制されることが分かった。
- (9) 妊娠期マウスに対して 50% の摂餌制限を施し低出生体重のモデルマウスを作成した。生まれてきた仔マウスは出生時におよそ 1/3 程度低体重であったが、その体重は生後 3 日目には対照マウスに追いついていた。8 週齢時で睡眠および行動観察を行った。結果、低出生体重モデルマウスは、睡眠期 SWA が 24 時間にわたって増強していることが分かった。睡眠時間やそのタイミングには差がなかった。また、不安・うつ様行動も有意に増加していた。一方、この時点では体重や末梢血液生化学、糖負荷試験、インスリン負荷試験などに差はなかったが、脳内の PPAR α mRNA 発現が増加していた。



以上の結果から、AMPK や PPAR α は直接、睡眠期 SWA の調節に関与しないものの、ケトン体代謝を含むそれらの下流の仕組みが、深く関わっていることが示唆される。覚醒は ATP を消費しながらグルタミン酸の放出量を増加させる。グルタミン酸の過剰な放出を避けるため、あるいは、ATP の不足を補うため、神経あるいはアストロサイトにおいて脂質が代謝され、その最終産物であるケトン体が増加する。ケトン体のうち、アセト酢酸はグルタミン酸の放出を抑え、睡眠を深くする。そのような状況は、末梢血においてケトン体比の変化として表現される。このように仮説できる。今後、ケトン体代謝と睡眠ホメオスタシス機構について、さらに検討を続ける。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1: Shimizu N, Chikahisa S, Nishi Y, Harada S, Iwaki Y, Shiuchi T, Fujihara H, Kitaoka K, Séi H. Maternal dietary restriction alters offspring's sleep homeostasis. **Plos One**, in press, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0064263
- 2: Chikahisa S, Séi H. The role of ATP in sleep regulation. **Front Neurol**. 2011;2:87. DOI:10.3389/fneur.2011.00087
- 3: Shimizu N, Chikahisa S, Kitaoka K, Nishino S, Séi H. Refeeding after a 24-hour fasting deepens NREM sleep in a time-dependent manner. **Physiol Behav**. 2011 ;104(3):480-487. DOI:10.1016/j.physbeh.2011.05.011

[学会発表] (計 7 件)

- 1: Chikahisa S, Kodama T, Sagawa Y, Ishimaru Y, Sei H, Nishino, S. Effects of ICV administration of a mast cell histamine release enhancer on sleep/wake in wild-type and mast cell deficient mice. SLEEP2012 (APSS), Jun 09-13, 2012, Boston, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (USA).

- 2: Shimizu N, Chikahisa S, Iwaki Y, Kitaoka K, Sei H. Male adult mice with low birth weight show an increased sleep pressure. SLEEP2012 (APSS), Jun 09-13, 2012, Boston, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (USA).
- 3: Chida D, Chikahisa S, Shimizu N, Fujihara H, Shiuchi T, Sei H. Enhanced passive avoidance retention in PPARα knock-out mice. NEURO2012, Oct. 13-17, 2012, New Orleans, Ernest N. Morial Convention Center (USA).
- 4: Shimizu N, Chikahisa S, Iwaki Y, Kitaoka K, Sei H. Low birth weight by undernutrition during pregnancy elicits anxiety and depression in male offspring mice. WorldSleep2011, Oct. 15-20, 2011, 国立京都国際会館 (京都府) .
- 5: Chikahisa S, Shimizu N, Kitaoka K, Iwaki Y, Fujihara H, Shiuchi T, Sei H. Sleep/wake regulation in PPARα-knockout mice. WorldSleep2011, Oct. 15-20, 2011, 国立京都国際会館 (京都府) .
- 6: Shimizu N, Chikahisa S, Kitaoka K, Sei H. Sleep regulation in PPARα knockout mice. NEURO2010, Nov. 13-17, 2010, San Diego Convention Center (USA).
- 7: Chikahisa S, Shimizu N, Kitaoka K, Ogawa S, Sei H. Hypothalamic AMPK contributes to homeostatic sleep regulation. NEURO2010, Nov. 13-17, 2010, San Diego Convention Center (USA).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勢井 宏義 (SEI HIROYOSHI)

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：40206602

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：