

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590280

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた超日生体リズムの脳内発生機構の研究

研究課題名(英文) Role of orexin system in coordinating ultradian rhythm

研究代表者

大塚 曜一郎 (Ootsuka, Youichirou)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：70302403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は脳内オレキシン神経が、超日リズム形成に関与している可能性を検討することである。野生型マウスで体温、心拍数および行動に同期した一過性の増加が見られ、その間隔は平均90分であり、マウスでもラットと同様な‘超日リズム’が存在することが明らかとなった。遺伝子操作で、オレキシンあるいはオレキシン細胞神経を欠損させる、あるいは光操作でオレキシン神経活動を制御すると超日リズムの変動幅が減弱した。以上の結果は脳内オレキシン神経が超日リズムの発現に重要な役割を果たしていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present project is to explore brain system that coordinates the ultradian rhythm, focusing orexin, a neuropeptide that is important to promote wakefulness. The project investigated ultradian pattern in genetically-modified mice that have a deficient of orexin or of orexin neurons. In the wild type, body temperature and heat rate increased episodically at every approximately 90 min, confirming the existence of the ultradian rhythm in mice as with rats. In orexin-related transgenic mice, the amplitude of ultradian increase in body temperature and locomotor activity was significantly reduced. The project also employed optogenetically-modified mice in which orexin neuronal activity can be controlled by focal light illumination. Long lasting activation of orexin neurons attenuated the amplitude of the ultradian rhythm. These data suggest that orexin system is important for coordinating ultradian rhythm in body temperature and locomotor activity.

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

キーワード：オレキシン 生体リズム 遺伝子改変マウス

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、熱産生組織である褐色脂肪組織を含む種々の組織の温度や、脳波、心臓循環パラメータなどの生理学的指標を、覚醒・自由行動下の動物で同時記録する技術を開発してきた。この技術を用い、これまで1) 褐色脂肪組織の熱産生、すなわち代謝レベルが約100分周期で一過性に生じ(‘超日リズム’)、環境温度や摂食に依存せず昼夜を通して見られること、2) この‘超日リズム’は血圧、心拍、運動量および脳の温度の変化と、さらには脳波の覚醒レベルの揺らぎと相関があることを見いだした。これらの発見から、脳の覚醒レベルの変化を伴う行動・自律神経系出力に同期して見られる‘超日リズム’は、単なる末梢からのフィードバックの結果ではなく、脳からの中枢指令により生じるリズムであることが示唆される。‘超日リズム’は、生命生存に必須である覚醒レベルと代謝レベルの調節をバランスよく制御するための重要な内因性リズムであると考えられる。生体リズムの研究ではサーカディアンリズム(概日リズム)について多くの研究がなされているが、‘超日リズム’はマウス、ラットを含む種々の動物で覚醒レベル、歩行、交尾活動などの様々な生理パラメータに見られるにもかかわらず(M. Stupfel et al., *Am J Physiol*, 268: R253-265, 1995)、あまり注目されていない。概日リズムでの研究では、多くの場合、超日周期の揺れはアーティファクトと見なされ、あるいは個々のデータではなく平均されたグループデータで検討されるため、‘超日リズム’は目立たなくなり、その存在は見過ごされることがほとんどである。

概日リズム調節に重要な脳内ニューロン群を破壊した後、この‘超日リズム’はより顕著となる(F. C. Baker et al., *Am J Physiol* 289: R827-838, 2005)。それゆえ、この‘超日リズム’は概日リズムとは別の機構で作られる、より基本的な重要な内因性リズムと考えられる。しかしながら、‘超日リズム’を調節する脳内神経機構は全く明らかにされていない。覚醒・睡眠制御系で重要な役割を持つ脳内神経伝達物質であるオレキシンを欠損したマウスで体温を計測すると、‘超日リズム’が減弱している(T. Mochizuki et al., *Am J Physiol*, 291: R533-R540, 2006)。それゆえオレキシン含有神経が‘超日リズム’の形成に関与している可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、オレキシン遺伝子改変マウスを用い、脳内オレキシン神経の‘超日リズム’形成に果たす役割を検討すること、具体的には、以下のことを明らかにすることが目的であった。

(1) 野生型、オレキシン欠損マウスおよびオレキシン神経細胞破壊トランスジェニックマウスで、褐色脂肪組織温度、体温、脳内温

度、血圧、心拍数、脳波、運動量を計測し、野生型と2種の遺伝子改変マウスで‘超日リズム’がどのように変化しているか比較検討し、オレキシンが‘超日リズム’形成に関与するか研究する。

(2) オレキシン神経特異的に光受容タンパクを発現したマウスで、オレキシン神経の活動を特異的に亢進あるいは抑制させて、‘超日リズム’への効果を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 野生型マウスでの褐色脂肪組織温度計測の確立

申請者は覚醒自由行動下のラットで肩甲骨下の褐色脂肪組織の温度を計測する装置・技術をすでに開発しており、同じ温度計測プローブを用い、同様の技術をマウスに応用した。

(2) オレキシン・ノックアウトマウスおよびオレキシン神経細胞破壊トランスジェニックマウスの超日リズムの解析

覚醒レベル、活動量および自律神経系出力に同期して見られる‘超日リズム’に注目して、オレキシン・ノックアウトマウスで、褐色脂肪組織温度、体温、脳内温度、心電図、脳波、活動量を計測し、超日リズムの振幅、間隔、同時記録する種々のパラメータ間のリズムの位相を計測し、野生型と比較し、どのような違いがあるか調べた。動物はイソフルラン(isoflurane, 2%)吸入麻酔下で、種々のパラメータ計測用の送信機埋め込み手術を行った。褐色脂肪組織と脳内温度は有線で記録を行い、すべての配線はコネクタに接続し、コネクタは頭頂骨表面にネジとデンタルセメントで固定した。術後少なくとも一週間の回復期間の後、実験を行った。実験当日にホームケージをテレメータ受信機に載せ、自由行動下、12/12時間の明暗周期下で48時間の記録を行う。有線記録では、頭頂骨にデンタルセメントで固定したコネクタに接続したケーブルから自在軸受け(シーベル)を経て記録した。

(3) オレキシン神経特異的に光受容タンパク質を発現したマウスで、光操作でオレキシン神経の活動を特異的に変化させた時の、‘超日リズム’への効果の検討

オレキシン産生神経のみを特異的に刺激するために、アーキロドプシン3(Arch)あるいはチャンネルロドプシン2(ChR2)をオレキシン神経特異的に発現する遺伝子改変マウス(orexin/Archおよびorexin/ChR2)で、光刺激によってオレキシン神経の活動を制御した。光ファイバーを視床下部外側野に留置し、褐色脂肪組織温度、体温、脳内温度、血圧、心電図、脳波、活動量を自由行動下、12/12時間の明暗周期下で記録を行い、光刺激を与え、‘超日リズム’の振幅、間隔が変化するか、またリズムがリセットされるかを調べた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 野生型マウスの超日リズム

平成23年度は野生型マウスで超日リズムを検討した。体温、心拍数、行動量、褐色脂肪組織熱産生が約100分周期で一過性に増加することを見いだした。この一過性の増加に伴い脳波の振幅が減少し、覚醒レベルが増加していた。さらに、摂食運動も伴い、体温増加開始から約15分後に摂食が行われていた。このことから、マウスでもラットと同様な‘超日リズム’が存在することが確かめられた。

##### 2) オレキシン・ノックアウトマウスおよびオレキシン神経細胞破壊トランスジェニックマウスの超日リズム

平成23年後半から24年度は、オレキシン欠損マウスとオレキシン神経細胞破壊マウスで同様な種々の生理パラメータを記録し、超日リズムを検討した。いずれの遺伝子組換えマウスでも超日リズム’での体温と活動の振幅が減弱している一方で心拍数の‘超日リズム’は野生型マウスと同様に見られた。

##### 3) 光操作によるオレキシン神経細胞の活動制御

平成25年度はオレキシン神経細胞特異的に光受容タンパク質を発現したマウスを用い、光操作でオレキシン神経活動の制御し、その超日リズムへの影響を検討した。その結果、一過性にオレキシンの神経活動を抑制しても超日リズムには有意な変化は見られなかった。一方、光操作で一過性にオレキシンの活動を増加すると、光操作中において超日リズムの変動が減弱した。

4) 平成24-25年度は、本研究課題に深く関連する共同研究を Blessing 教授（フリンダース大学、オーストラリア）開始した。この共同研究では、オレキシン神経細胞破壊ラットでマウスと同様な種々の生理パラメータを記録し、超日リズムを検討した。オレキシン神経細胞破壊ラットでも野生型ラットと同様な超日リズムが記録したすべてのパラメータで見られた。超日周期の褐色脂肪組織と体温の上昇幅と分時当たりの上昇速度はオレキシン神経細胞破壊ラットで野生型に比べ有意に減弱していた。

以上の結果は脳内オレキシン神経が体温と活動の‘超日リズム’の発現に重要な役割を果たしている一方で‘超日リズム’の発生源ではないことを示唆する。

超日リズムはヒトでは、レム-ノンレム睡眠周期、日中では覚醒レベルの変動として見られる。超日リズムの覚醒レベルの変動は日中の気分や仕事の能率に大きな影響を与え、就労の条件などを決定する場合に考慮すべき点と考えられる。また超日リズムは自律神経機能に見られることから、超日リズムが乱れると肥満あるいは自律神経失調症などの疾

患に繋がるかもしれない。実際、超日リズムの振幅が減弱するオレキシン欠損動物は肥満傾向が見られる。それゆえ本研究で得られた知見は生活リズムと疾病の関係の解明に大きく寄与すると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6件)

- 1) Mohammed M, Ootsuka Y, Blessing W, Brown adipose tissue thermogenesis contributes to emotional hyperthermia in a resident rat suddenly confronted with an intruder rat, 査読あり, Am J Physiol, 305, 2014, R394-400, doi: 10.1152/ajpregu.00475.2013.
- 2) Blessing W, Mohammed M, Ootsuka Y, Brown adipose tissue thermogenesis, the basic rest-activity cycle, meal initiation, and bodily homeostasis in rats, 査読あり, Physiol Behav 121, 2013, 61-60, doi: 10.1016/j.physbeh.2013.03.028
- 3) 大塚曜一郎、桑木共之、交感神経活動の中樞神経回路、査読無し、Cardiovascular Frontier、第17号、2013、15-20
- 4) Mohammed M, Kulasekara K, De Menezes RC, Ootsuka Y, Blessing WW, Inactivation of neuronal function in the amygdaloid region reduces tail artery blood flow alerting responses in conscious rats, 査読あり, Neuroscience, 228, 2013, 13-22, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.008.
- 5) Kontos A, de Menezes RC, Ootsuka Y, Blessing W, Brown adipose tissue thermogenesis precedes food intake in genetically obese Zucker (fa/fa) rats, 査読あり, Physiol Behav, 118, 2013, 129-37, doi: 10.1016/j.physbeh.2013.05.021.
- 6) Blessing W, Mohammed M, Ootsuka Y, Heating and eating: brown adipose tissue thermogenesis precedes food ingestion as part of the ultradian basic rest-activity cycle in rats. 査読あり, Physiol Behav. 105, 2012, 966-74. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.11.009.

[学会発表] (計 21件)

- 1) 生駒葉子、桑木共之、大塚曜一郎、Orexin contributes to feeding and drinking behaviour induced by methamphetamine、第91回日本生理学会大会、2014年3月17日、鹿児島
- 2) Ootsuka Y, Miyata K, Ikoma Y, Kuwaki T, Yamanaka A., THE CONTRIBUTION OF OREXIN SYSTEM TO INTEGRATED ULTRADIAN PHYSIOLOGICAL PATTERN, The 34th Annual Meeting of the Australasian Neuroscience Society, 2014年1月3

- 0 日, Adelaide, Australia
- 3) Ikoma Y, Kuwaki T, Ootsuka Y, INVOLVEMENT OF OREXIN IN METHAMPHETAMINE- INDUCED HYPOPHAGIA AND HYPERACTIVITY, The 34th Annual Meeting of the Australasian Neuroscience Society, 2014年1月29日, Adelaide, Australia
  - 4) Blessing WW, Mohammed M, Ootsuka Y, The Basic Rest- Activity Cycle (BRAC) is present in transgenic rats with ataxin3- mediated destruction of orexin neurones, but amplitude of the BRAC- associated brown adipose tissue and body temperature change are reduced, XXXVII International Congress of Physiological Sciences, 2013年7月21日-26日, UK
  - 5) Ikoma Y, Kuwaki T, Ootsuka Y, A role of glutamate co- released from orexin neurons in methamphetamine- induced autonomic physiological response, XXXVII International Congress of Physiological Sciences, 2013年7月21日-26日, Birmingham, UK
  - 6) Mohammed M, Ootsuka Y, Yanagisawa M, Blessing WW, Transgenic Sprague Dawley rats with ataxin3- mediated destruction of orexin neurons display reduced tail artery Sympathetic Cutaneous Vasomotor Alerting Responses (SCVARs), XXXVII International Congress of Physiological Sciences, 2013年7月21日-26日, Birmingham, UK
  - 7) Blessing WW, Mohammed, M, Ootsuka Y, Udden access to live cochroaches increases brown adipose tissue (BAT) thermogenesis in conscious unrestrained rats, XXXVII International Congress of Physiological Sciences, 2013年7月21日-26日
  - 8) 宮田紘平、大塚曜一郎、桑木共之、オレキシンニューロンに共存するグルタミン酸はストレス誘発性熱産生に重要である、第90回日本生理学会、2013年03月29日~2013年03月29日、東京
  - 9) 生駒葉子、宮田紘平、桑木共之、大塚曜一郎、メタアンフェタミン-生理反応でのオレキシン共存伝達物質であるグルタミン酸の役割、第90回日本生理学会、2013年03月29日~2013年03月29日、東京
  - 10) 生駒葉子、宮田紘平、桑木共之、大塚曜一郎、メタアンフェタミン投与による自律生理反応でのオレキシン神経伝達物質グルタミン酸の役割、第8回環境生理プレコングレス、2013年03月26日、新宿
  - 11) Miyata K, Ootsuka Y, Kuwaki T, Ultradian Basic Rest-Activity Cycle in orexin deficient mice, Neuroscience 2012 (Society for Neuroscience), 2012年10月17日~2012年10月17日、New Orleans, USA
  - 12) Ootsuka Y, Application of latest gene-engineered mice to autonomic neuroscience research, Collaborators Day 2012(招待講演)、2012年09月28日、Adelaide, Australia
  - 13) 大塚曜一郎、宮田紘平、桑木共之、循環・呼吸・行動・摂食の超日リズムとオレキシン、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09月15日~2012年09月15日、札幌
  - 14) 大塚曜一郎、睡眠・覚醒とエネルギー代謝の超日生体リズム、日本睡眠学会第37回定期学術集会(招待講演)、2012年06月29日~2012年06月29日、横浜
  - 15) 宮田紘平、大塚曜一郎、桑木共之、Methamphetamine causes considerable bradycardia in orexin knockout mice、第89回日本生理学会大会、2012年3月31日、長野
  - 16) 大塚曜一郎、宮田紘平、桑木共之、オレキシン欠損マウスでのメタアンフェタミンの心拍への効果、第7回環境生理学プレコングレ、2012年3月28日、長野
  - 17) 宮田紘平、大塚曜一郎、桑木共之、オレキシン神経機構の超日リズム形成への関与、第62回西日本生理学会大会、2011年10月14日、佐賀
  - 18) Ootsuka, Y., Miyata, T, Kuwaki, T., Ultradian 90 min biological rhythm is attenuated in orexin-deficient mice, Joint Meeting of 7th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience and 22nd Symposium of the American Autonomic Society AAS2011, 2011年9月15日, Bouzios, Brazil
  - 19) Blessing W.W., Ootsuka, Y., Ultradian rhythmicity in autonomic and behavioural parameters, Joint Meeting of 7th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience and 22nd Symposium of the American Autonomic Society AAS2011, 2011年9月15日, Bouzios, Brazil
  - 20) Ootsuka, Y., Miyata, T, Kuwaki, T., The role of orexin in autonomic physiological response elicited by methamphetamine in mice, Satellite Symposium for Joint Meeting of 7th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience and 22nd Symposium of the American Autonomic Society AAS2011, 2011年9月13日, Ouro Preto, Brazil
  - 21) 大塚曜一郎、循環・体温の超日リズム、第10回九州脳と高血圧研究会、2011年7月16日、福岡

[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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 曜一郎 (OOTSUKA, Youichirou)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・客  
員研究員  
研究者番号：70302403

### (2) 研究分担者 該当なし

### (3) 連携研究者

山中 章弘 (YAMANAKA, Akihiro)  
名古屋大学環境医学研究科・教授  
研究者番号：60323292

桑木 共之 (KUWAKI, Tomoyuki)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：80205260