

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23730706

研究課題名(和文) 睡眠・高次脳機能調節におけるアストロサイト脂質代謝の役割

研究課題名(英文) The role of lipid metabolism in brain functions and sleep

研究代表者

近久 幸子 (CHIKAHISA, Sachiko)

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：00452649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳内脂質代謝と睡眠などの高次脳機能との関連について明らかにすることを目的とした。マウスに6時間断眠を行うと脂質代謝産物である末梢血のケトン体が増大するとともに、そこで脳内のケトン体代謝合成の促進が認められた。脳室内へケトン体を投与すると、睡眠を深くするとともに、体温を低下させた。脳ではアストロサイトがケトン体の産生組織であることから、本研究の結果は、アストロサイトにおける脂質代謝が、睡眠などの脳機能の調節に関与している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of brain lipid metabolism in higher brain functions including sleep regulations. Six-hour sleep deprivation markedly increased plasma ketone body concentration in mice. Moreover, sleep deprivation activated ketogenesis in the brain. We also found that icv injection of ketone bodies enhanced sleep depth and decreased glutamate release in freely moving mice. In the brain, astrocyte is known to produce ketone bodies from fatty acids. Lipid metabolism in the astrocyte may play a significant role in brain functions including sleep homeostasis.

研究分野：社会科学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：脂質代謝 睡眠 高次脳機能

## 1. 研究開始当初の背景

現在、糖尿病、高脂血症、肥満症といった生活習慣病の増加が大きな社会問題となっている。また、不眠症や睡眠時無呼吸症候群など、日本人の4人に1人が何らかの睡眠障害を抱えているといわれており、こちらも近年増加の一途を辿っている。短時間睡眠者は肥満傾向があるとともに5年生存率が低下することが大規模疫学調査によって明らかにされるなど (Kripke et al., Arch Gen Psychiatry, 2002)、睡眠不足と生活習慣病の関連性が指摘されてきたが、そのメカニズムは不明な点が多い。

一方近年、脳の情報処理におけるグリア細胞の新たな機能が明らかとなってきた。グリア細胞の一種であるアストロサイトはシナプスにおける信号伝達を調節するだけでなく、脳における脂質代謝の主要なメディエーターとして、脳神経系細胞の脂質代謝や細胞間コレステロール輸送を調節する。最近の報告では、アストロサイトを介した睡眠調節や断眠による記憶・学習能の低下や (Halassa et al., Neuron, 2009)、アルツハイマー病との関連性も指摘されつつある (Allaman et al., J Neurosci, 2010)。これらのことから、睡眠や高次脳機能と中枢脂質代謝を結びつける重要な因子として、アストロサイトの機能が決定的に関与しているものと予想される。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、申請者は、脳内脂質代謝において中心的役割をもつアストロサイトにおいて、脂質代謝を介した睡眠制御機構および高次脳機能調節が存在し、個体全体のエネルギー調節と脳機能調節とを結びつける役割を果たしているのではないかと考えた。そこで本研究では in vivo 生理実験に薬物投与と遺伝子操作を組み合わせながら、アストロサイトの脂質代謝を介した睡眠制御および高次脳機能調節のメカニズムを究明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 睡眠制限による代謝機能変化への影響

実験はICR系雄性マウスを用いた。マウスに明期開始から6時間にわたる断眠を行い、血中グルコース、遊離脂肪酸、ケトン体濃度の測定を行った。また、肝臓および中枢の組織において、各種代謝調節因子の遺伝子発現変化をreal-time RT-PCR法によって観察した。コントロールとして、断眠を行わない群、および6時間の絶食群も作成した。

### (2) 脂質体代謝に関わる遺伝子のノックダウンによる、睡眠および高次脳機能変化

脂質代謝の代謝産物であるケトン体は、肝臓だけでなく、アストロサイトにおいても産生されることが最近の報告で明らかとなっている。そこで、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、ケトン体合成に重要な役割を果たす peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppar- $\alpha$ ) や 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (Hmgcs2)、ケトン体代謝酵素である succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (Scot) の発現を、中枢特異的に抑制したマウスを作成した。実験はICR系雄性マウスを用いた。マウスの頭部に脳室内投与用カニューレを設置する手術を施し、2週間のリカバリー後、各モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを、5日間連続で投与を行った。睡眠記録および行動解析は投与開始から7日目以降に行った。行動解析は、記憶・学習能(8方向放射状迷路、Novel object recognition test等)および不安・うつなどの情動行動(Open field・高架式十字迷路、強制水泳テスト等)についてコントロールマウスとの比較を行った。

### (3) ケトン体の中枢投与による、睡眠および高次脳機能への影響

実験はICR系雄性マウスを用いた。マウスの頭部に脳室内投与用カニューレを設置する手術を施し、2週間のリカバリー後、アセト酢酸および $\beta$ ヒドロキシ酪酸を投与し、睡眠、体温、活動量の測定を行った。投与は明期開始時および暗期開始時とした。

また、薬物投与と反対側のマウスの脳室にマイクロダイアリシス用のカニューレを設置し、ケトン体投与後の各種アミノ酸放出量の測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 睡眠制限による代謝機能変化への影響

マウスに6時間にわたる断眠を行ったところ、末梢血中のケトン体濃度の顕著な増大が認められた。さらに、断眠は大脳皮質や視床下部において、PPAR $\alpha$  や Hmgcs2 の mRNA 発現増大を引き起こした(図1参照)。一方、6時間の絶食では、脳内の遺伝子発現に変化は認められなかった。いずれの群においても、グルコースや遊離脂肪酸、トリグリセリドなどの血中濃度に変化は認められなかった。また、EAAT1 (GLAST)、EAAT2 (GLT1) などのアストロサイト型グルタミン酸トランスポーターの遺伝子発現にも有意な変化は認められなかった。

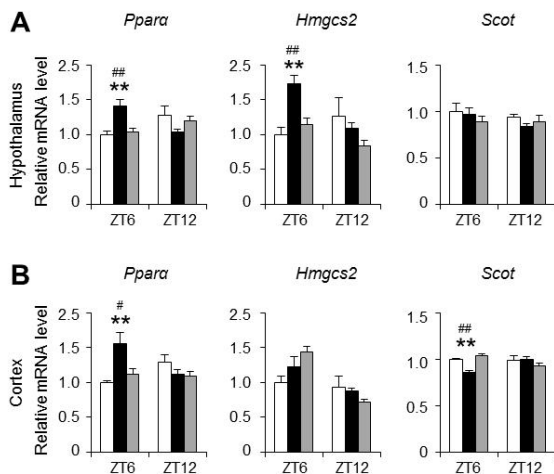


図 1 . 6 時間の断眠および絶食によるマウス視床下部 (A) および大脳皮質 (B) の mRNA 発現変化。 がコントロール、 が断眠群、グレイの が絶食群の結果を示している。(Chikahisa et al, *Neuropharmacology*, 2014)

(2) ケトン体合成およびケトン体代謝に関わる遺伝子のノックダウンによる、睡眠および高次脳機能変化

Ppar- $\alpha$  のアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与により、暗期前半の覚醒量が増大し、ノンレム睡眠量が低下した。さらにこのマウスでは、睡眠深度の指標であるノンレム睡眠時の脳波デルタパワーの減弱が認められた。一方、Hmgcs2 のアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与により、暗期の睡眠量の低下、明期のノンレム睡眠時の脳波デルタパワーの増大、断眠後の体温低下が認められた。Scot のアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与では、顕著な変化は認められなかった。

また、各遺伝子をそれぞれノックダウンさせたマウスの行動解析を行ったが、記憶・学習能および情動行動に有意な差は認められなかった。

(3) ケトン体の中枢投与による、睡眠への直接作用

ケトン体の脳機能への直接作用を調べるために、アセト酢酸および  $\beta$  ヒドロキシ酪酸をマウスの脳室内に投与した。その結果、アセト酢酸を投与すると、レム睡眠量の低下とともに、ノンレム睡眠中の脳波デルタパワーの顕著な増大および体温低下が認められた。これに対し、ヒドロキシ酪酸の脳室内投与では変化が認められなかった (図 2 参照)。

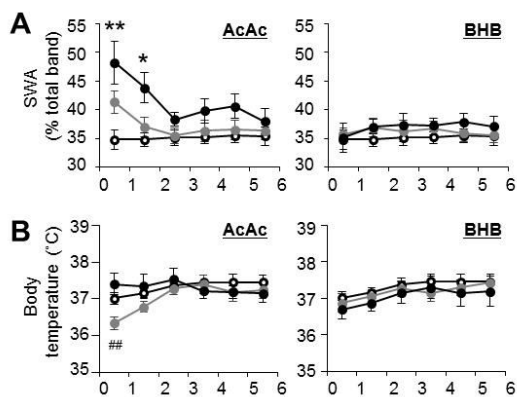


図 2 . アセト酢酸 (AcAc) およびヒドロキシ酪酸 (BHB) 投与によるノンレム睡眠時の脳波デルタパワーの変化 (A) と体温変動 (B)。横軸は投与後 1 時間ごとの変化を示す。 が vehicle 投与、 が高濃度 (200  $\mu$ g)、グレイの が低濃度 (50  $\mu$ g) 投与を示している。(Chikahisa et al, *Neuropharmacology*, 2014)

また、ケトン体投与時におけるグルタミン酸および GABA 放出量の測定を行った。アセト酢酸はプレシナプスにあるシナプス小胞存在型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) を阻害し、シナプス小胞へのグルタミン酸の取り込みを抑制することによって、シナプス間隙へのグルタミン酸放出を抑制することが報告されている (Juge et al., *Neuron*, 2010)。本実験においても、アセト酢酸の脳室内投与により、脳内のグルタミン酸放出の抑制が認められた。このことから、アセト酢酸が興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸の放出抑制を介して、ノンレム睡眠時の SWA を増大させた可能性が考えられる。

ケトン体は肝臓の他に、脳内のアストロサイトで産生され、中枢のエネルギー代謝に関与することが報告されている (Blazquez et al., *J Neurochem*, 1998)。現段階では、断眠による血中ケトン体の増加が、肝臓由来かアストロサイト由来かについては明らかとなっていない。しかし、断眠時には肝臓においてケトン体合成酵素である Hmgcs2 が mRNA レベルでは変化が認められなかったため、アストロサイトが関与している可能性が極めて高いと考えられる。今後、断眠によるケトン体産生亢進の機序および睡眠調節を含めた高次脳機能との関連について詳細に検討を加えていく予定である。

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 7 件)

1. Chikahisa S, Shimizu N, Shiuchi T, Sei H. Ketone body metabolism and sleep homeostasis in mice. *Neuropharmacology*. 79: 399-404, 2014, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.009. (査読あり)
2. Chikahisa S, Kodama T, Soya A, Sagawa Y, Ishimaru Y, Sei H, Nishino S. Histamine from brain resident mast cells promotes wakefulness and modulates behavioral states, *PLoS One*, 8: e78434, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0078434. (査読あり)
3. Shimizu N, Chikahisa S, Nishi Y, Harada S, Iwaki Y, Fujihara H, Kitaoka K, Shiuchi S, Sei H. Maternal dietary restriction alters offspring's sleep homeostasis, *PLoS One*, 8: e64263, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0064263. (査読あり)
4. Kitaoka K, Shimizu N, Ono K, Chikahisa S, Nakagomi M, Shudo K, Ishimura K, Sei H, Yoshizaki K. The retinoic acid receptor agonist Am80 increases hippocampal ADAM10 in aged SAMP8 mice. *Neuropharmacology*, 72:58-65, 2013, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.009. (査読あり)
5. Chikahisa S, Sei H. The role of ATP in sleep regulation, *Frontiers in Neurology*, 2: 1-5, 2011. doi: 10.3389/fneur.2011.00087. (査読あり)
6. Shimizu N, Chikahisa S, Kitaoka K, Nishino S, Sei H. Refeeding after a 24-hour fasting deepens NREM sleep in a time-dependent manner, *Physiology & Behavior*, 104: 480-487, 2011, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.05.011. (査読あり)
7. Kitaoka K, Shimizu M, Shimizu N, Chikahisa S, Yoshizaki K, Nakagomi M, Shudo Koichi, Sei H. Retinoic acid receptor antagonist LE540 attenuates wakefulness via the dopamine D1 receptor in mice, *Brain Research*, 1423: 10-16, 2011, doi: 10.1016/j.brainres.2011.09.023. (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Chikahisa S, Shimizu N, Shiuchi T,

Shiuchi T, Sei H, "Ketone bodies in the brain regulate sleep homeostasis in mice" 2014, Mar 16-21, Gordon Research Conference on Sleep Regulation and Function (Hotel Galveston, USA)

2. Chikahisa S, Shimizu N, Shiuchi T, Shiuchi T, Sei H, "Ketone bodies regulate sleep homeostasis" 2013, Nov 9-13, Neuroscience 2013 (San Diego Convention Center, USA)

3. 近久幸子, 勢井宏義, 「中枢脂質代謝と睡眠」, 2013年6月27日-28日, 日本睡眠学会第38回定期学術集会, 秋田キャッスルホテル(秋田県・秋田市)(シンポジウム)

4. 近久幸子, 清水紀之, 志内哲也, 藤原広明, 勢井宏義, 「脳内ケトン体代謝が睡眠ホメオスタシスへ及ぼす影響」, 2013年6月27日-28日, 日本睡眠学会第38回定期学術集会, 秋田キャッスルホテル(秋田県・秋田市)

5. 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" 2012, June 9-13, Sleep 2012: 26th Annual Meeting of the Associated Professional Sleep Societies (Hynes Veterans Memorial Convention Center Boston, USA)

6. 近久幸子, 勢井宏義, 「脳内脂質代謝と睡眠」, 2012年6月28-30日, 日本睡眠学会第37回定期学術集会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(シンポジウム)

7. Chikahisa S, Shimizu N, Fujihara H, Shiuchi T, Sei H, "Sleep homeostatic regulations in PPAR $\alpha$ -knockout mice", 2012, Mar 19-20, Frontiers in Behavioral Brain Science-Solving the mystery of sleep- (Tokyo International Forum Hall, Japan)

8. Chikahisa S, Sei H, "PPARs, AMPK and sleep homeostasis" 2011, Oct 15-20, 36th Japanese Society of Sleep Research-World sleep 2011 (Kyoto International Conference Center, Japan) (シンポジウム)

9. Chikahisa S, Shimizu N, Kitaoka K, Iwaki Y, Fujihara H, Shiuchi T, Sei H, "Sleep/wake regulation in PPAR $\alpha$  knockout mice" 2011, Oct 15-20, Japanese Society of Sleep Research-World sleep 2011 (Kyoto

International Conference Center, Japan)

10. Chikahisa S, “AMPK and PPAR contribute to sleep homeostasis” 2011, June 11-15, Sleep 2011: 25th Anniversary Meeting of the Associated Professional Sleep Societies (Minneapolis Convention Center, USA) (シンポジウム)

11. Chikahisa S, Sagawa Y, Ishimaru Y, Sakai N, Okuro M, Nishino S “Brain resident mast cells affect sleep/wake physiology and pharmacology” 2011, June 11-15, Sleep 2011: 25th Anniversary Meeting of the Associated Professional Sleep Societies (Minneapolis Convention Center, USA)

12. 近久幸子, 清水紀之, 北岡和義, 勢井宏義, 「中枢の PPAR は睡眠制御に寄与する」, 2011 年 3 月 28-30 日, 第 88 回日本生理学会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(図書)(計 2 件)

1. 近久幸子, 睡眠障害 知る診る治す, 2 章 睡眠のメカニズム, 3 章 ノンレム・レム期の脳の働き, 4 章 睡眠リズムの変化のメカニズム, メジカルビュー社, 2014 年 3 月, 216 (22-30)

2. 近久幸子, 西野精治, 脳とこころのプライマリケア, 第 5 巻 意識と睡眠, 3 章 神経伝達物質と睡眠, 株式会社シナジー出版, 2012 年 6 月, 840 (328-338)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近久 幸子 (CHIKAHISA SACHIKO)  
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 : 00452649

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :