

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26380987

研究課題名(和文) 中枢ケトン体を介した新たな睡眠・高次脳機能調節機構

研究課題名(英文) Central ketone body and brain function including sleep regulation

研究代表者

近久 幸子 (CHIKAHISA, Sachiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：00452649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中枢ケトン体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解明することを目的とした。本研究で作製した慢性不眠モデルマウスでは、睡眠量の減少、睡眠深度の減弱、耐糖能異常が認められた。これらのマウスでは、血中ケトン体濃度には変化が認められなかったが、ケトン体の中枢及び末梢投与では睡眠深度の増大をもたらした。また、ケトン体分解酵素のニューロン特異的な過剰発現は、断眠後の睡眠リバウンド、不安様行動、うつ様行動、学習能の変化を引き起こした。以上のことから、中枢ケトン体代謝が睡眠調節や高次脳機能と密接に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of brain ketone body metabolism in brain functions including sleep regulations. Chronic sleep disruption decreased sleep amount and attenuated sleep depth, accompanying by glucose intolerance in mice. These sleep-disrupted mice showed no change in plasma ketone body concentration, although both central and peripheral injection of ketone bodies enhanced sleep depth. In addition, neuron-specific over expression of ketone body-degrading enzyme induced alteration of sleep rebound after sleep deprivation, anxiety/depression and memory/learning behavior. Central ketone body metabolism may play a significant role in higher brain functions including sleep homeostasis.

研究分野：実験心理、環境生理

キーワード：ケトン体 高次脳機能 睡眠

1. 研究開始当初の背景

エネルギー代謝と睡眠調節は密接にかかわり合っている。請者らはこれまでに、脂質代謝に極めて重要な役割を果たす核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR α) や AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化の中枢投与がマウスの睡眠を深くし、断眠後のリバウンドを減弱させることを見出した。PPAR や AMPK の主な機能にケトン体産成があげられる。ケトン体は肝臓のみならず、脳内のアストロサイトでも産生されていることが知られているが (Blázquez et al., J Neurochem, 1998)、その生理機能はほとんど不明とされてきた。最近の報告で、脳内のアストロサイトにおけるケトン体産生には、PPAR や AMPK が重要な役割を果たすことが明らかとなった (Escartin et al., J Neurosci, 2007)。さらに、ケトン体の1つであるアセト酢酸は、脳内の主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を阻害することが報告されている (Juge et al., Neuron, 2010)。しかし、中枢ケトン体の睡眠制御や高次脳機能における役割やそのメカニズムは不定な点が多い。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、脂質代謝に重要な役割を果たすケトン体に着目し、慢性不眠による脳機能障害やエネルギー代謝異常について、中枢ケトン体代謝との関連性を明らかにすることを目的とする。最終的には、アストロサイト由来のケトン体を介した睡眠制御および高次脳機能調節のメカニズムの解明を目指し、糖尿病やメタボリックシンドロームなどのエネルギー代謝異常に併発する睡眠障害や脳機能障害への新たなアプローチ法を探索する。

3. 研究の方法

(1) 慢性不眠モデルマウスの作成

実験は ICR 系雄性マウスを用いた。特殊な金網上で3週間飼育することで、慢性不眠モデルマウスを作製する。

(2) 高次脳機能変化の測定

慢性不眠モデルマウス用いて、オープンフィールド、明暗箱、高架式十字迷路、強制水泳、ロータロッド、novel object、passive avoidance、攻撃行動、握力測定の9つの行動実験を行った。

(3) エネルギー代謝調節の解析

慢性不眠モデルマウスの血中グルコース、遊離脂肪酸、ケトン体濃度の測定、耐糖能の指標である glucose tolerance test (GTT) や insulin tolerance test (ITT)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。

(4) ケトン体の中枢および末梢投与による、睡眠への影響

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 β 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。同様に、アセト酢酸および β ヒドロキシ酪酸の腹腔内投与を行い、睡眠測定を行った。

(5) ケトン体代謝に関わる遺伝子の過剰発現による高次脳機能変化

目的遺伝子の過剰発現時期および発現量を任意に制御できる、テトラサイクリン発現誘導システム (Tet システム) を用いて、餌に含まれるドキシサイクリンによって脳特異的にケトン体代謝酵素である succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (Scot) を過剰発現させたマウスを作成した。これらのマウスを用いて、睡眠記録および行動解析を行った。

4. 研究成果

(1) 慢性不眠モデルマウスの作成

慢性不眠モデルマウスとして、特殊な金網上で3週間飼育することで、通常飼育よりも暗期におけるノンレム睡眠量が少なく、明期におけるノンレム睡眠時の slow-wave activity (SWA) が減弱するマウスを作製した。

(2) 高次脳機能変化の測定

不安様行動、空間認知においては、有意な変化は見られなかったが、攻撃行動、運動学習、握力において有意差が見られた。すなわち睡眠不足のモデルマウスは、新奇なマウスに対する攻撃行動を開始するまでの潜時および攻撃回数が有意に高かった。また、睡眠不足モデルマウスでは握力の低下が認められるとともに、運動学習の指標であるロータロッドの成績が低下していた。

(3) エネルギー代謝調節の解析

慢性不眠モデルマウスは耐糖能の指標である glucose tolerance test (GTT) の悪化を示した (図1)。ITT や血中グルコース、遊離脂肪酸、コレステロール、血中ケトン体濃度には変化が認められなかった。

大脳皮質および視床下部における各種代

謝調節因子の遺伝子発現変化を real-time RT-PCR 法によって測定したところ、大脳皮質において、ケトン体代謝酵素である Scot および ATP 産生に関わる Cox4i1 の発現が増加していた。

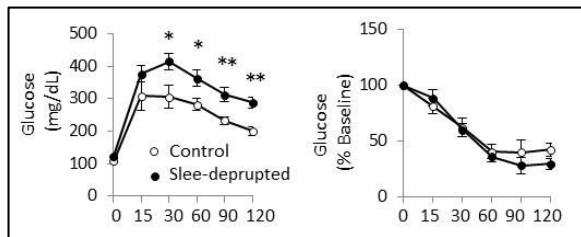


図1. 慢性不眠モデルマウスのノGTT(左)とITT(右)がコントロール、が慢性不眠モデルマウスの結果を示している。

(4) ケトン体の中枢および末梢投与による、睡眠への影響

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βヒドロキシ酪酸をマウスの脳室内および腹腔内に投与した。その結果、アセト酢酸の中枢投与はレム睡眠量の低下および、ノンレム睡眠中のSWAの顕著な増大を引き起こした。一方、ヒドロキシ酪酸の脳室内投与では睡眠に変化は認められなかった。腹腔内投与でも同様に、アセト酢酸のみ、レム睡眠量の低下とノンレム睡眠中のSWAの顕著な増大を引き起こした(図2)。

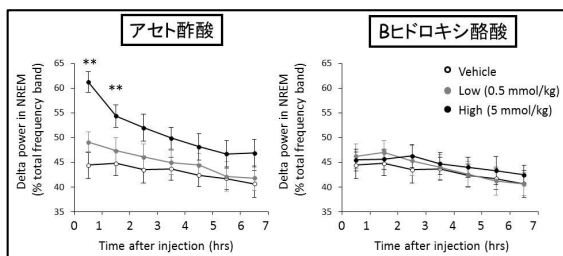


図2. アセト酢酸 (AcAc) およびヒドロキシ酪酸 (BHB) の腹腔内投与によるノンレム睡眠時の脳波デルタパワーの変化 (A) と体温変動 (B)。横軸は投与後1時間ごとの変化を示す。がvehicle投与、が高濃度 (5 mmol/kg)、グレイのが低濃度 (0.5 mmol/kg) 投与を示している。

(5) ケトン体代謝に関わる遺伝子の過剰発現による高次脳機能変化

脳特異的 Scot 過剰発現マウスでは、不安様行動、うつ様行動の増大、認知機能の低下が認められた。睡眠解析について、脳特異的 Scot 過剰発現マウスでは、ノンレム睡眠時のSWAの増大および、レム睡眠時のパワーの増大が認められた。断眠後におけるSWAの増大(リバウンド)も、コントロールマウスと比較して増大していた。また、これらのマウスでは、不安様行動、うつ様行動の上昇、

認知、回避学習の低下が認められ、脳内ケトン体代謝が高次脳機能に影響を及ぼすことが示唆された。

本研究の結果から、中枢ケトン体代謝が睡眠調節や高次脳機能と密接に関わっている可能性が示唆された。しかし、慢性不眠モデルマウスでは血中ケトン体濃度に変化は認められなかったことから、慢性不眠によって引き起こされる高次脳機能変化(行動変化)や代謝障害が、ケトン体代謝を直接介しているかどうかについては、現段階では不明である。今後、中枢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のメカニズムについて、さらに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4件)

1. Sagawa Y, Sato M, Sakai N, Chikahisa S, Chiba S, Maruyama T, Yamamoto J, Nishino S. Wake-promoting effects of ONO-4127Na, a prostaglandin DP1 receptor antagonist, in hypocretin/orexin deficient narcoleptic mice. *Neuropharmacology*. 110: 268-276, 2016, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.07.013. (査読あり)
2. Oura K, Otsuka A, Shiuchi T, Chikahisa S, Shimizu N, Séi H. Late feeding in the active period decreases slow-wave activity. *Life Sci*. 160: 18-26, 2016, doi: 10.1016/j.lfs.2016.07.005. (査読あり)
3. Kanda T, Tsujino N, Kuramoto E, Koyama Y, Susaki EA, Chikahisa S, Funato H. Sleep as a biological problem: an overview of frontiers in sleep research. *The Journal of Physiological Sciences*, 66: 1-13, 2016. doi: 10.1007/s12576-015-0414-3. (査読あり)
4. Otsuka A, Shiuchi T, Chikahisa S, Shimizu N, Séi H. Voluntary exercise and increased food intake after mild chronic stress improve social avoidance behavior in mice. *Physiology & Behavior*, 151 :2642-2671. 2015. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.07.024. (査読あり)

[学会発表](計10件)

1. 近久幸子, 清水紀之, 大塚愛理, 志内哲也, 西野精治, 勢井宏義「脳内肥満細胞

- の睡眠覚醒調節における役割」, 2017年3月27日, 第12回環境生理プレコングレス, サラシティ浜松(静岡県・浜松市)
2. Chikahisa S, Harada S, Shimizu N, Shiuchi T, Nishino S, Sei H, "Sleep loss induces diabetes in mice model" 2016, Nov 12-16, Neuroscience 2016 (San Diego Convention Center, San Diego, USA)
 3. 近久幸子, 清水紀之, 志内哲也, 西野精二, 勢井宏義, 「睡眠障害モデルマウスの糖代謝異常におけるマストセルの関与」, 2016年7月7-8日, 日本睡眠学会第41回定期学術集会, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
 4. 近久幸子, 勢井宏義, 「ケトン体による睡眠ホメオスタシス調節機構」, 2015年7月2~3日, 日本睡眠学会第40回定期学術集会, 栃木県総合文化センター, 宇都宮東武ホテルグランデ(栃木県, 宇都宮市)(シンポジウム)
 5. 近久幸子, 西野精治, 勢井宏義, 「睡眠覚醒調節における脳内マストセルの関与」, 2015年7月2~3日, 日本睡眠学会第40回定期学術集会, 栃木県総合文化センター, 宇都宮東武ホテルグランデ(栃木県, 宇都宮市)(シンポジウム)
 6. Chikahisa S, Shimizu N, Shiuchi T, Sei H, "Contribution of PPAR α and Ketone Body to Sleep Homeostasis in Mice" 2015, Mar 28-Apr 1, Experimental Biology (Boston Convention and Exhibition Center, Boston, USA)
 7. 近久幸子, 勢井宏義, 「睡眠ホメオスタシス機構における PPARs およびケトン体代謝の関与」, 2015年3月21~23日, 第92回日本生理学会大会, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県, 神戸市)(シンポジウム)
 8. Chikahisa S, Harada S, Shimizu N, Shiuchi T, Sei H, "Sleep quality affects glucose homeostasis in a mouse model" 2014, Sep 24, Homeodynamics in Clocks, Sleep and Metabolism, Tokyo Translational Therapeutics Meeting (Ito International Research Center, 東京都, 文京区)
 9. 近久幸子, 勢井宏義, 「中枢ケトン体代謝による睡眠ホメオスタシス調節」, 2014年7月3~4日, 日本睡眠学会第39回定期学術集会, あわぎんホール, ホテルクレメント(徳島県, 徳島市)(シンポジウム)
 10. 近久幸子, 児玉亨, 征矢敦至, 佐川洋平, 石丸雄二, 勢井宏義, 西野精治, 「脳内肥満細胞の睡眠覚醒調節における役割」, 2014年7月3~4日, 日本睡眠学会第39回定期学術集会, あわぎんホール, ホテルクレメント(徳島県, 徳島市)(シンポジウム)
- (図書)(計2件)
1. 近久幸子, エネルギー代謝におけるマスト細胞の新たな役割, 実験医学, 2016年34号, 141(1276-1277)
 2. 近久幸子, 勢井宏義, ヒスタミンと睡眠調節 - ヒスタミン神経系とマスト細胞の役割 -, 睡眠医療, 2016年, 10号, 164(35-42)
6. 研究組織
 (1)研究代表者
近久 幸子 (CHIKAHISA, Sachiko)
 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
- 研究者番号: 00452649