

## 生物時計による体温・代謝調節制御メカニズムの全容解明

永島 計<sup>1</sup>, 時澤 健<sup>1</sup>, 尾上侑己<sup>1</sup>, 内田有希<sup>2</sup>, 森久 恵<sup>2</sup>, 中村真由美<sup>3</sup>

早稲田大学・人間科学学術院・統合生理学

(<sup>1</sup>人間科学学術院, <sup>2</sup>人間科学研究科, <sup>3</sup>人間科学総合研究センター)

## 【目的】

体温の概日リズムは調節された生理現象であり、環境温度の変化に対しても影響をうけず一定のリズムを保つ。しかし、げっ歯類の絶食時には非活動期に特異的な体温の低下が生じることが報告されている。この時間特異的な体温低下はエネルギー節約に関与すると考えられているが、メカニズムは明らかではない。本研究は1) 絶食が体温調節反応に及ぼす影響を暗期(活動期)と明期(非活動期)に分けて解析し、体温調節にかかわる脳視床下部での神経核、生物リズムの形成にかかわっていると考えられている時計遺伝子の一つである*Clock*との関与を明らかにすること、2) 低体温を引き起こすシグナルとしてレプチン、グレリンという2つの内因性ペプチドの関与を調べた。

## 【方法】

**実験1**：2～4ヵ月令のICR系雄マウスを、27℃の環境温、12時間の明暗サイクル(午前7時点灯、午後7時消灯)で飼育した。テレメトリーで体温と活動量を連続測定し、2日間の絶食を行った。絶食開始時刻は午前9時もしくは午後9時とし、各々この時間の47時間後、午前8時(明期)と午後8時(暗期)に、20℃、180分間の寒冷暴露を行った。この間の酸素摂取量を間接カロリーメトリにて測定した。寒冷暴露終了直後に脳を灌流固定し、神経活動マーカーであるcFosタンパクの免疫組織化学染色を行った。また、時計遺伝子*Clock*の変異マウスを用いて、同様の絶食および寒冷暴露プロトコルを行った。cFos発現に基づいて、絶食および寒冷暴露に反応する視床下部の神経核を特定したのちに、時計中枢である視交叉上核からの出力経路について検証した。逆行性神経トレーサーであるコレラトキシンBを該当する神経核に投与し、cFosおよび抑制性ニューロンの神経伝達物質であるGABAの合成酵素であるGAD 65の多重免疫組織化学染色を行った。**実験2**：野生型およびレプチンを欠損するob/obマウスを実験1と同様に飼育した。20℃の寒冷暴露を午前8時(明期)と午後8時(暗期)に行った。**実験3**：野生型マウスに腹腔内にグレリン(8 nmol)または対照として生理食塩水を午前8時(明期)と午後8時(暗期)投与し、10℃の寒冷暴露を午前9-11時(明期)と午後9-11時(暗期)に行った。深部体温と活動量をテレメトリー、酸素摂取量を間接カロリーメトリに

て計測し、脳視床下部の神経活動をcFos蛋白免疫組織化学染色にて評価した。

## 【結果】

**実験1**：野生型マウスにおいて、絶食明期寒冷暴露時には、体温は30分目以降に有意に低下したが( $5.5 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ )、酸素摂取量に変化はみられなかった。絶食暗期寒冷暴露時には、130分目以降に有意に低下し( $2.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ )、酸素摂取量は有意に増加した( $9.4 \pm 2.4 \text{ ml/min/kg}$ )。体温の低下は明期に暗期と比較して有意に大きく( $p < 0.05$ )、酸素摂取量の増加は暗期が明期と比較して有意に大きかった( $p < 0.05$ )。視床下部のcFos免疫陽性細胞(cFos-IR)数は、内側視索前野および室傍核で、暗期寒冷暴露後に有意に増加したが、明期寒冷暴露後には有意な変化はみられなかった。視床下部背内側核および弓状核では、暗期寒冷暴露後および暗期寒冷暴露後ともに増加したが、暗期に明期と比較して有意に大きかった。明期にのみ活動する視交叉上核においては、絶食によってcFos-IRは有意に増加し、さらに寒冷暴露により有意に増加した。*Clock*変異マウスでは、明期寒冷暴露時と暗期寒冷暴露時ともに体温は有意に低下したが(明期： $1.8 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 、暗期： $2.4 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ )、明期と暗期の間に有意な差はみられなかった。酸素摂取量は明期寒冷暴露時と暗期寒冷暴露時ともに有意に増加し(明期： $10.4 \pm 2.8 \text{ mL/min/kg}$ 、暗期： $17.7 \pm 2.9 \text{ mL/min/kg}$ )、暗期に明期と比較して有意に大きかった( $p < 0.05$ )。野生型と*Clock*変異マウスの寒冷暴露時の体温および酸素摂取量は暗期では差がなかったが、明期の体温低下は野生型の方で有意に大きく( $p < 0.05$ )、酸素摂取量の増加は*Clock*変異マウスの方で有意に大きかった( $p < 0.05$ )。視交叉上核以外の神経核でcFos-IRは明期と暗期で差は認められなかった。野生型と比較すると、内側視索前野および室傍核において、野生型明期と比較して*Clock*変異型の明期に有意にcFos-IRは多かった。コレラトキシンBを室傍核に投与し、視交叉上核での発現をcFosと同時に観察したところ、二重に発現していた神経細胞は、野生型の絶食状態においては自由摂食および*Clock*変異型と比較して多かった。また二重に発現していた神経細胞のまわりにGAD 65の発現も観察された。

**実験2**：野生型マウスにおいては明期と暗期ともに、寒冷

暴露によって深部体温は変化しなかった。また酸素摂取量は有意に増加した。ob/obマウスにおいて、寒冷暴露により深部体温は有意に低下した。明期と暗期の間で有意な差は認められなかった(明期、 $3.8 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ ; 暗期 $2.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ )。酸素摂取量は野生型より有意に低かった。cFos-IR数は視床下部のいずれの神経核においても野生型とob/obマウスの間で有意な差は認められなかった。

**実験3:** グレリンを投与した野生型マウスにおいて、明期の寒冷暴露によって深部体温は生理食塩水投与と比較して有意に低下した。酸素摂取量は生理食塩水投与と比較して有意に低かった。一方暗期では、グレリン投与試行の寒冷暴露によって深部体温は低下せず酸素摂取量は有意に増加し、生理食塩水投与との間に有意な差は認められなかった。cFos-IR数は視交叉上核において明期にグレリン投与により有意に増加した。また弓状核においては明期と暗期ともにグレリン投与によりcFos-IR数は増加したものの、暗期の方で増加は大きかった。室傍核において、グレリン投与のみではcFos-IRは見られなかったものの、グレリン投与で寒冷暴露を行った暗期においては、cFos-IR数は有意に増加した。

#### 【考察】

1. 摂食条件は体温調節に大きく関わっており、絶食時には寒冷時の体温調節反応を時間特異的に抑制することが明らかになった。従来、生物時計の最上位中枢と考えられてきた視交叉上核は時間の情報、time-cueをだす器官と考えられてきたが、本研究にて温熱情報や栄養情報をうけ、かつ伝達する時間情報の強さ(量的要素)を変化させている可能性が示唆された。また、この時間特異的に抑制するメカニズムに時計遺伝子*Clock*が関与していることが明らかになった。絶食時に明期特異的に低体温がおこる原因として、視交叉上核から室傍核への抑制性の神経シグナルが重要であることが示唆された。すなわち、室傍核は全身の交感神経活動に大きく関与することが知られているが、絶食時の明期には視交叉上核の神経活動が増加し、室傍核への抑制性のシグナルを増強させる。この結果、体温の低下を防御する熱産生の亢進や、皮膚血管の収縮の増強がおこらなくなると考えられる。

2. 絶食時の低体温は調節された現象と考えられるが、絶食に伴いいくつかの循環血液中のペプチドが変化する。研究では絶食中に減少する白色脂肪細胞から分泌されるレプチン、増加する消化管粘膜から分泌されるレプチンに着目した。レプチンの欠損マウスの実験から得られた結果からは、レプチンの低下は体温調節反応を弱めるが、絶食時の時間特異的な体温調節反応野変化には関与していないと考えられた。すなわちレプチンは視交叉上核に対して影響を及ぼしていないと考えられる。一方、絶食に伴い増加する

グレリンは絶食時の時間特異的な体温調節に関与していると考えられる。しかしながら、グレリンがいかなる神経経路で視交叉上核に作用するのかは未だ明らかではない。視交叉上核の神経活動が何故グレリンで増加するのか、どのようなニューロンに作用するのかは明らかではなく、更なる研究が必要であると考えられる。

今回の研究では、ダイエットなどの摂食条件の変化からおこる生体のリズム、あるいは体温のリズムの変調の問題を示唆している。

#### 【研究成果・業績】

- 1 : Uchida Y, Kano M, Yasuhara S, Kobayashi A, Tokizawa K, Nagashima K. Estrogen modulates central and peripheral responses to cold in female rats. *J Physiol Sci.* 2009; 60:151-60.
- 2 : Kanosue K, Crawshaw LI, Nagashima K, Yoda T. Concepts to utilize in describing thermoregulation and neurophysiological evidence for how the system works. *Eur J Appl Physiol.* (in press).
- 3 : Tokizawa K, Uchida Y, Nagashima K. Thermoregulation in the cold changes depending on the time of day and feeding condition: physiological and anatomical analyses of involved circadian mechanisms. *Neuroscience.* 2009; 164: 1377-86.
- 4 : Konishi M, Kanosue K, Kano M, Kobayashi A, Nagashima K. The median preoptic nucleus is involved in the facilitation of heat-escape/cold-seeking behavior during systemic salt loading in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292: R150-9.