

Clock 変異マウスを用いた、絶食時の体温リズム変調メカニズムの解析

時澤 健¹ 内田有希² 永島 計¹

(¹早稲田大学人間科学学術院, ²早稲田大学大学院人間科学研究科)

Effect of Fasting on Circadian Body Temperature Rhythm in *Clock* Mutant Mice

Ken Tokizawa¹, Yuki Uchida², and Kei Nagashima¹

(¹Faculty of Human Sciences, Waseda University,

²Graduate School of Human Sciences, Waseda University)

【目的】 体温の概日リズムは調節された生理現象であることを我々は明らかにしている。しかし絶食時には、非活動期に特異的な体温の低下が生じる。この時間特異的な体温低下がいかなるメカニズムで生じるかは明らかではない。本研究では、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）において明らかにすること、および絶食時の体温調節反応を支配するメカニズムにおいて、視床下部の神経活動および時計遺伝子 *Clock* の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2～4 ヶ月令のICR系統の野生型雄マウスを、27°Cの環境温において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。体温と活動の概日リズムが確認されたのちに、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°C、180分間の中程度寒冷暴露を行った。この間の体温および酸素摂取量をテレメトリーおよび間接的カロリーメトリーにて測定した。寒冷暴露終了直後に灌流固定した脳を採取し、神経活動マーカーであるcFos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、野生型と同様の絶食および寒冷暴露プロトコルを行った。cFosの免疫組織化学染色により、絶食および寒冷暴露に反応した視床下部内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。これは、逆行性の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、視交叉上核での発現を観察し、さらにcFosおよび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。

【結果】 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（ $5.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$ ）、酸素摂取量に変化はみられなかった。一方、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（ $9.4 \pm 2.4 \text{ mL/min/kg}$ ）。体温の低下は明期が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蛋白免疫陽性細

胞数（cFos-IR）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のに対して、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においては、暗期寒冷暴露後および暗期寒冷暴露後ともに増加したものの、暗期が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、絶食によって有意に増加し、さらに絶食中寒冷暴露後に有意に増加した。

Clock 変異マウスにおいては、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ものの（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。ま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： $17.7 \pm 2.9 \text{ mL/min/kg}$ ）、その増加は暗期が明期と比較して有意に大きかった（ $p < 0.05$ ）。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の応答を比較すると、暗期では差は見られなかったが、明期では体温の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において、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* 変異型の明期で有意に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、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。

【総括】 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。時間特異的に抑制するメカニズムとして時計遺伝子 *Clock* および視交叉上核から室傍核への情報伝達の可能性が示唆された。