

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

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

永島 計、郭 洋、時澤 健、早稲田大学・人間科学学術院・統合生理学

【背景】体温の概日リズムは調節された生理現象である。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、このメカニズムは明らかではない。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）に分けて解析し、そのメカニズムを体温調節にかかわる脳視床下部での神経、生物リズムのコアとな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、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、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する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。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。

【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たが (5.5 ± 2.0 °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 ± 0.5 °C)、酸素摂取量は有意に増加した (9.4 ± 2.4 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 ± 0.6 °C, 暗期: 2.4 ± 0.9 °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 ± 2.8 mL/min/kg, 暗期: 17.7 ± 2.9 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。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、また生物時計の中枢である視交叉上核から室傍核への抑制性の情報が重要であることが示唆された。