

論文要旨

Fasting-induced reduction in locomotor activity and reduced response of orexin neurons in carnitine-deficient mice

〔 カルニチン欠乏マウスの絶食による自発行動減少とオレキシン神経反応の低下 〕

吉田剛一郎

【序論および目的】

Juvenile visceral steatosis (*jvs*^{-/-}) マウスは、細胞膜カルニチン輸送体 Octn2 の遺伝子異常 (*slc22a5* gene での L352R) に基づく、ヒト原発性カルニチン欠乏症のモデル動物であり、脂肪肝、高アンモニア血症、低血糖、心肥大、成長障害などの多彩な症状を呈する。今回、*jvs*^{-/-}マウスにおいて、絶食下で暗期の活動時期における自発行動 (locomotor activity; LA) が減少することを見いだした。絶食時には脂肪酸酸化 (fatty acid oxidation; FAO) が亢進するため、FAO 障害では絶食になることを特に避けるよう指示されている。FAO 障害の絶食による LA 減少において行動支配を担う central nervous system (CNS) の役割は明らかになっていない。睡眠覚醒サイクルと食欲を支配する orexin は、LA との関連が指摘されている。CNS の orexin は、末梢 FAO を支配することも指摘されている。しかしながら、FAO 障害における CNS 異常と orexin 神経活動の関連について検討は行われていない。本報告では、カルニチン欠乏症モデル動物である *jvs*^{-/-}マウスを用いて、絶食下における LA 異常、および orexin 神経活動の関連について、組織学的、生理学的な方法で検討を行った。

【材料および方法】

実験には雄 3 ヶ月齢の野生型 (*jvs*^{+/+})、ヘテロ接合体 (*jvs*^{+/-}) およびホモ異常 (*jvs*^{-/-}) マウスを用いた。絶食は 8:00 に食餌を抜き取ることにより行った。カルニチン投与 (300 μ mol/kg BW) は、腹腔内より絶食と同時に 1 日に 1 回 (8:00) または 2 回 (8:00 と 20:00) 行った。絶食したマウスに対するショ糖 (9 g/kg BW) および medium-chain triglyceride (MCT; 5 g/kg BW) の経口投与は胃チューブを用いて 12:00、16:00 および 20:00 の 3 回行った。Modafinil (100 mg/kg BW) の腹腔内投与は 18:00 に行った。体温は 23:00 における直腸温をデジタルサーモメーターを用いて測定した。LA はケージ内で 3 方向の光センサーをマウスが遮る回数とした。酸素摂取量は、メタボリックケージに呼気ガス分析装置を連結させたエネルギー代謝測定システムを用いて測定した。視床下部外側野に存在する orexin 神経細胞の c-Fos 発現は、灌流固定後切片を作成し、それぞれの抗体を用いた二重免疫染色法によって検討した。睡眠解析は electroencephalogram (EEG) と electromyogram (EMG) の測定により、non-rapid-eye movement (non-REM; 0.75-4.0 Hz) 睡眠、REM (6.0-9.0 Hz) 睡眠および覚醒期に分類し、その量、持続時間および頻度をそれぞれ分析した。

【結果】

1. 絶食およびカルニチン投与が *jvs*^{-/-}マウスの LA におよぼす影響

摂食下では *jvs*^{+/+}、*jvs*^{+/-} および *jvs*^{-/-}マウスの 3 群間で LA に大きな変化は認められなかった。8:00 に餌を抜き取り絶食下となると、*jvs*^{+/+} および *jvs*^{+/-}マウスの LA は摂食下と大きな変化は示さなかったが、*jvs*^{-/-}マウスでは暗期の活動時期における LA は著しい低下を示した。それに伴い、*jvs*^{-/-}マウスの絶食下 48 時間における total LA も *jvs*^{+/+} および *jvs*^{+/-}マウスと比較して 1/3 程度にまで低下した。餌を除去後、1 日 2 回、8:00 と 20:00 にカルニチンを 10 μ mol/head 腹腔内投与した結果、*jvs*^{-/-}マウスの暗期の LA は回復し、絶食下 48 時間の total LA も対照マウスと差のないレベルにまで回復した。

2. ショ糖および MCT 投与が *jvs*^{-/-}マウスの LA とエネルギー産生におよぼす影響

エネルギー欠乏が *jvs*^{-/-}マウスの LA に影響をおよぼすのかを検証するため、変動の大きい 20:00 から 23:00 の暗期 3 時間の LA に対する、ショ糖および MCT の投与効果を検討した。絶食下で低下した *jvs*^{-/-}マウスの暗期 3 時間 LA は、ショ糖の胃チューブによる経口投与により、ほぼ摂食下の LA レベルにまで回復した。しかしながら、MCT 経口投与では、絶食 *jvs*^{-/-}マウスの低下した LA を回復させることは出来なかった。一方、絶食 *jvs*^{-/-}マウスにショ糖または MCT 投与を行うと、生食を投与し

た絶食 jvs^{+} コントロールマウスと比較し、酸素摂取量は有意に増加を示し、またショ糖と MCT 投与群での差は認められなかった。すなわちショ糖に加え、絶食 jvs^{+} マウスの LA 増加に対して投与効果の認められなかった MCT も、生体においては酸素消費を保ち、エネルギー産生に利用されていた。

3. LA と血中グルコースおよび遊離脂肪酸 (FFA) レベル

LA に対する規定要因を検討するため、暗期 3 時間 LA と、23:00 における血中パラメーターとの相関をみた。MCT 投与を行った絶食 jvs^{+} マウスでは、生食投与の jvs^{+} コントロールマウスと同様に低血糖、高 FFA レベルを示した。一方、カルニチンを腹腔内 1 回投与して暗期 3 時間 LA が増加した絶食 jvs^{+} マウスにおいても、同様に低血糖、高 FFA レベルを示した。LA と血中グルコースおよび FFA との間に有意な相関は認められなかった。

4. Modafinil の LA に対する投与効果

脳におけるドーパミン代謝経路を介して LA の誘発因子となる modafinil を 18:00 に絶食 jvs^{+} マウスの腹腔内に投与したところ、低下した暗期の LA は有意に増加を示した。すなわち、エネルギーが欠乏している jvs^{+} マウスにおいても LA は上昇することを示した。

5. 体温と LA の関係

カルニチン欠乏が長鎖脂肪酸の利用を制限することによる熱産生への影響と、そのことが jvs^{+} マウスの LA にもたらす影響について検討した。摂食下 23:00 の jvs^{+} ($36.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$) ならびに絶食 $jvs^{+/+}$ マウスの体温 ($37.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) と比較し、絶食 jvs^{+} マウスの体温は有意に低下 ($32.5 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$) していた。絶食 jvs^{+} マウスの低下した体温は、カルニチン腹腔内投与 ($36.8 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$)、ショ糖経口投与 ($36.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$) および MCT 経口投与 ($35.2 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) と上昇を示し、体温と暗期 3 時間 LA との間には弱い相関が認められた ($r = 0.59$)。

6. Orexin 神経細胞における c-Fos 発現と脳脊髄液中の orexin A レベル

脳内神経活動の指標となる c-Fos を発現した視床下部外側野の orexin 神経細胞について検討した結果、摂食 jvs^{+} マウスの c-Fos を発現した orexin 神経細胞の割合 ($40.2 \pm 10.5\%$) と比較して、絶食 jvs^{+} マウスでの発現割合は激減 ($5.1 \pm 0.1\%$) した。この時の $jvs^{+/+}$ と jvs^{+} マウスにおける orexin 神経数自体に差はなかった。絶食 jvs^{+} マウスにカルニチンの腹腔内 2 回投与を行った結果、c-Fos を発現した orexin 神経細胞の割合は、摂食下のレベルにまで上昇 ($48.8 \pm 3.1\%$) した。暗期 3 時間 LA と c-Fos を発現した orexin 神経細胞の割合とは高い相関 ($r = 0.90$) を示した。絶食 jvs^{+} マウスの脳脊髄液中の orexin A レベルについても検討したところ、絶食 $jvs^{+/+}$ マウスのレベルと比較して有意に低下を示した。

7. 睡眠解析

絶食 jvs^{+} マウスでは orexin 神経活動の低下が認められることから、orexin 神経が調節していると考えられている睡眠覚醒サイクルについて EEG/ EMG を用いて解析を行った。摂食 jvs^{+} 、 $jvs^{+/+}$ および絶食 $jvs^{+/+}$ マウスにおいて、消灯による覚醒の継続と REM 睡眠の頻度の減少が認められる一方、絶食 jvs^{+} マウスでは消灯後 non-REM および REM 睡眠が頻発し、覚醒は断片化した。消灯前後 1 時間における覚醒、REM および non-REM 睡眠それぞれの量、持続時間および頻度を分析した結果、絶食 $jvs^{+/+}$ マウスと比較し絶食 jvs^{+} マウスでは消灯後 1 時間の覚醒量の低下、覚醒持続時間の短縮および覚醒頻度の増加が認められた。同様に、絶食 jvs^{+} マウスにおける REM 睡眠はその量、持続時間、頻度共に増加を示し、non-REM 睡眠についても量、持続時間、頻度共に絶食 $jvs^{+/+}$ マウスと比較して顕著な増加を示した。

【考察および結論】

Orexin は行動、覚醒、食欲など多くの活動に関与する neuropeptide である。絶食による jvs^{+} マウスの LA 減少を引き起こす因子を検討したところ、CNS における orexin 神経活動の低下が関与していることが示された。しかしながら、その機構は不明である。絶食 jvs^{+} マウスの LA 減少は、カルニチンの腹腔内投与によって回復することから、投与されたカルニチンの脳、その他の臓器への取り込みと消長、それに伴うグルタミン酸を介する神経伝達物質の変動が投与効果に関与している可能性もある。本報告では、FAO 障害における LA 減少では、orexin 神経システムの異常が関与していることを示したと同時に、FAO 障害における絶食の危険性の機構の一つを明らかにしたと考える。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 622 号	氏名	吉田 剛一郎
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	乾 明夫	佐野 輝

Fasting-induced reduction in locomotor activity and reduced response of orexin neurons in carnitine-deficient mice

〔 カルニチン欠乏マウスの絶食による自発行動減少とオレキシン神経反応の低下 〕

Juvenile visceral steatosis (*jvs*^{-/-}) マウスは、細胞膜カルニチン輸送体 Octn2 の遺伝子異常 (*slc22a5* 遺伝子産物の L352R 変異) に基づく、ヒト原発性カルニチン欠乏症のモデル動物であり、脂肪肝、高アンモニア血症、低血糖、心肥大、成長障害などの多彩な症状を呈する。カルニチン欠乏症における脂肪酸酸化障害では、絶食が生体にどのような悪影響をおよぼすのか、低血糖や高アンモニア血症を起こすこと以外には現在のところよくわかっていない。学位申請者は絶食 *jvs*^{-/-} マウスの暗期において、自発行動 (locomotor activity; LA) が減少することを見出した。LA 低下の機構を明らかにする過程で、覚醒状況と関連のある orexin 神経活動との関係を見出し検討した。

本論文で明らかにされた知見の概略は以下のとおりであった。

- (1) カルニチン欠乏 *jvs*^{-/-} マウスは絶食下になると、暗期の活動時期における LA は低下した。
- (2) 絶食下において低下を示した *jvs*^{-/-} マウスの暗期の LA は、カルニチンの腹腔内投与により野生型 (*jvs*^{+/+}) マウスと差のないレベルにまで回復した。
- (3) 絶食下で低下した *jvs*^{-/-} マウスの暗期 3 時間 (20~23 時) の LA は、ショ糖の経口投与により摂食下の LA レベルにまで回復した。しかしながら *jvs*^{-/-} マウスにおいてもエネルギー源として利用される medium-chain triglyceride (MCT) の経口投与では回復させることは出来なかった。
- (4) 血糖や血中遊離脂肪酸レベルと、暗期 3 時間 LA との関係を見たら、ところ相関は認められなかった。すなわち、これらが自発行動量の規定要因とは考えにくい。
- (5) 絶食 *jvs*^{-/-} マウスの低下した体温 (23 時) は、カルニチン腹腔内投与、ショ糖および MCT 経口投与によりそれぞれ回復した。体温と暗期 3 時間 LA との間には弱い相関が認められた。
- (6) 中枢神経興奮剤である modafinil を 18:00 に絶食 *jvs*^{-/-} マウスの腹腔内に投与したところ、低下した暗期の LA は有意に回復を示した。すなわち、*jvs*^{-/-} マウスの LA 低下は、エネルギー不足によるのではないと推測される。
- (7) 絶食により低下した *jvs*^{-/-} マウスの視床下部外側野における c-Fos ポジティブな orexin 神経細胞の割合は、カルニチンの腹腔内投与により摂食時のレベルまで回復した。暗期 3 時間 LA と c-Fos ポジティブな orexin 神経細胞の割合とは、高い相関 ($r=0.90$) を示した。また絶食 *jvs*^{-/-} マウスの脳脊髄液中の orexin A レベルは、絶食 *jvs*^{+/+} マウスのレベルと比較して有意に低下を示していた。
- (8) 絶食 *jvs*^{-/-} マウスでは覚醒状況と関連のある orexin が低下していたことから、睡眠覚醒サイクルについて脳波解析を行なったところ、絶食 *jvs*^{-/-} マウスでは消灯後の覚醒期に、レムおよびノンレム波が現れ、覚醒は断片化された。これは orexin 欠損マウスと同様の脳波パターンを示しており、絶食 *jvs*^{-/-} マウスでは orexin 神経活動が低下したことを示唆する。

以上の結果は、脂肪酸酸化障害における LA 減少では、orexin 神経活動の異常が関与することを示している。脂肪酸酸化障害における絶食の危険性の機構の一つを明らかにしたことは重要な知見であり、本論文を学位論文として十分に価値のあるものと認定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 622 号	氏名	吉田 剛一郎
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	乾 明夫	佐野 輝

主査および副査の3名は、平成18年3月14日、学位請求者 吉田 剛一郎 に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) なぜ $jvs^{-/-}$ マウスはカルニチン欠乏を呈するのか？カルニチンの合成系は影響しないのか？

(回答) ナトリウム依存性カルニチントランスポーターの Octn2 欠損によるカルニチンの腎臓における再吸収障害が原因である。また、合成系では前駆物質である、 γ -butyrobetaine (γ -BB) も Octn2 を介して再吸収されるため、尿中 γ -BB の排泄亢進を認めている。このことから合成系が一部障害されていると考えている。

質問 2) $Jvs^{-/-}$ マウスのカルニチンレベルは、野生型 ($jvs^{+/+}$) マウスと比較して、どの程度低下しているか？

(回答) 総カルニチンレベルで見ると、 $jvs^{-/-}$ マウスでは、血中では $jvs^{+/+}$ マウスの 17%、肝臓では 3% にまで低下している。脳では 22%、心臓、骨格筋、精巣においては数%程度と、全身的にカルニチンレベルの顕著な低下を起こしている。

質問 3) ヒトの全身性カルニチン欠乏症では脳症が問題となるが、 $jvs^{-/-}$ マウスではどうか？関連して、 $jvs^{-/-}$ マウスはどの程度生存するのか？

(回答) ヒトと同様にカルニチン治療を行わないと1ヶ月以内にほとんどのマウスは死に至る。マウスの離乳期の死因については、低血糖および尿素サイクル酵素の活性低下による高アンモニア血症があげられ、脳に悪影響をおよぼしている可能性がある。数ヶ月後の死因は心肥大であると考えられる。

質問 4) Point mutation の割に脳に重度な障害があるが、どのように考えるのか？

(回答) 文献的には本 point mutation によってカルニチン輸送活性は、ほぼ消失している。

質問 5) $Jvs^{-/-}$ マウスでは覚醒中に non-REM 波が増加しているが、ヒトのナルコレプシーでは sleep-onset REM が特徴的で、カタプレキシーも起こる。ヒトとマウスの違いについては、どのように考えるか？

(回答) 睡眠・覚醒現象がヒトとマウスでは大きく異なる。ヒトは一定の時間、睡眠と覚醒を維持するが、マウスでは短い時間で周期的に入れ替わる。このことを反映して、マウスの脳波解析では覚醒波、REM 波、non-REM 波が短い時間で交代しており、ヒトとは異なる。基本的な睡眠・覚醒現象の違いが、ヒトとマウスの脳波解析の差異もたらしているかもしれない。また $jvs^{-/-}$ マウスではナルコレプシーの症状は確認していない。

質問 6) Modafinil で誘導される自発行動量 (LA) は、 $jvs^{+/+}$ マウス絶食時の行動と同じか？

(回答) 水平方向の動きに加えて、垂直方向への動きも認められ、興奮した状態と考える。

質問 7) Modafinil 投与量はどのように決めたのか？ $Jvs^{+/+}$ マウスに modafinil を投与した時の LA はどうなのか？

(回答) 投与量の検討は、投与量を 50・100・300mg/kg として行った。LA に対する最大効果のみられる最小量である 100mg/kg を投与量として選んだ。 $Jvs^{+/+}$ マウスに対する投与実験は行っていない。

質問 8) Orexin 以外の免疫染色は行なっているのか？

(回答) Tryptophan hydroxylase、dopamine β -hydroxylase などの中枢神経特異的なマーカーの検討を行っている。

質問 9) カルニチン投与後の c-Fos 発現変化を他の部位でも調べているのか？

(回答) 全脳において検討した。特異的なのは orexin 神経細胞に発現した c-Fos であった。

質問 10) MCT を投与してエネルギー産生が増え、体温が上昇しても $jvs^{-/-}$ マウスの LA は上昇しない。一方、カルニチンおよび modafinil を投与すると、低血糖状態においても LA の上昇が認められる。ショ糖を投与すると、血糖は上がり、体温も上がり、

LA は上昇している。一連の関係をどのように考えるか？

(回答) 酸素消費の解析から、投与されたショ糖は速やかにエネルギー産生に利用されるのに対し、MCTの利用は遅れる。ただ単にエネルギーの産生が上がることだけでは動かないと考えている。ショ糖投与後、血中 FFA は著しく低下しており、LA 低下には代謝されない脂肪酸などの毒性効果が発揮されている可能性を考えている。

質問 11) $Jvs^{+/+}$ マウスにおいて、カルニチン投与で $jvs^{+/+}$ マウスと比較して有意に LA が増加しているが、これは hyper-sensitive の結果と捉えて良いのか？ $Jvs^{+/+}$ マウスのカルニチンレベルはどうか？

(回答) $Jvs^{+/+}$ マウスのカルニチンレベルは、血中、肝臓、その他の臓器においても $jvs^{+/+}$ マウスより低く、 $jvs^{+/+}$ マウスより有意に高いレベルを示す。逆に $jvs^{+/+}$ マウスの肝臓における総脂質量は、 $jvs^{+/+}$ マウスより高く、 $jvs^{+/+}$ マウスより有意に低い。したがって、 $jvs^{+/+}$ マウスは $Jvs^{+/+}$ マウスに比べて低カルニチン状態にあり、何らかの適応が生じた結果、カルニチンに対する hyper-sensitive な状況にある可能性があると考えている。

質問 12) $Jvs^{+/+}$ マウスは、絶食にしても LA は低下しないのか？

(回答) LA 低下は示さない。したがって LA 実験ではコントロールとしても使える。

質問 13) $Jvs^{+/+}$ マウスは自然発症なのか、ノックアウトマウスなのか？

(回答) 金沢大学で近交系マウスの飼育の過程で、発育不全、脂肪肝発症を契機に見出された自然発症マウスである。

質問 14) Octn2 の異常があるマウスにカルニチンを投与すると、腎障害における再吸収の問題はクリアーできても、細胞膜における取り込みの障害はクリアー出来るのか？

(回答) $Jvs^{+/+}$ マウスにカルニチンの投与実験を行なった結果、血中と肝臓にて顕著な取り込みを確認している。脳や心筋、骨格筋には、ほとんど取り込まれないので、投与効果は、直接カルニチンがそれらの臓器に入り起こるのではなく、別の機序が想定される。

質問 15) $Jvs^{+/+}$ マウスの Octn2 の異常は、あくまでも骨格筋での問題なのか？

(回答) これは腎臓を含めての問題と考えるが、肝臓では別のトランスポーターが存在している可能性がある。

質問 16) ノックアウトマウスは作成されていないのか？そのようなものは出来ないのか？

(回答) 昨年の脂肪酸代謝関連の国際学会でノックアウトマウスが報告され、 $jvs^{+/+}$ マウスと病態が類似することが報告された。一方、脂肪酸代謝の律速酵素である CPT1 の阻害剤である methyl palmoxirate を投与することにより、絶食 $jvs^{+/+}$ マウスにみられる LA 低下を示すマウスを作り出すことは可能である。

質問 17) 絶食 $jvs^{+/+}$ マウスでは脳脊髄液中の orexin A レベルは低下しているが、orexin ニューロン数は変化しているか？ $Jvs^{+/+}$ マウスと $jvs^{+/+}$ マウスにおける、orexin ニューロン数に差異はあるか？

(回答) 絶食による変動はみられない。 $Jvs^{+/+}$ マウスでは $78 \pm 20/\text{mm}^2$ 、 $jvs^{+/+}$ マウスでは $83 \pm 33/\text{mm}^2$ であり差異はない。

質問 18) 脳脊髄液中の orexin A レベルの低下から、視床下部 orexin 神経細胞のある特定一群の集団が c-Fos 発現低下を示していないか？Orexin 神経細胞がどのように調節され、それらがどのように脳の部位に投射されているのか？

(回答) 今回の免疫染色では、そこまでの解析は行っておらず今後の課題である。Orexin 神経細胞は複数の神経促進因子によって調節され、投射先は小脳を除き、全脳にわたることが知られている。個々の神経の投射先との関連はこれからの研究課題である。

質問 19) $Jvs^{+/+}$ マウスは疲労モデルと考えられるか？

(回答) 絶食後の再摂食量が低下することから摂食行動の異常を認めている。脂肪酸代謝異常症では、絶食になることを特に避けるようにといわれているが、悪循環に陥ることによる意欲の減退を伴って生じる現象とも考えている。疲労の定義によるが、疲労により「末梢のエネルギー不足を予想し、休養を求める脳の状況」となるならば、 $jvs^{+/+}$ マウスはまさに疲労モデルであると考えている。

質問 20) カルニチンはミトコンドリアに入ってから β -酸化にも関与しているのか？

(回答) 長鎖脂肪酸は活性化されアシル CoA となる。カルニチンはこのアシル CoA をミトコンドリア内に運び込むための担体である。

以上の結果から、3名の審査委員は、学位請求者本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。