

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390056

研究課題名（和文） 食餌同期性概日リズムを刻む視床下部背内側核ニューロンの機能解析

研究課題名（英文） Function of food-entrainable clock neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus

研究代表者

三枝 理博（MIEDA MICHHIRO）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：20296552

研究成果の概要（和文）：毎日固定した一定時間帯でのみ餌が得られる環境下では、動物は給餌前数時間にわたり食物探索行動を示し、給餌時間内に十分量摂食するように順応する。この食餌同期性概日行動リズムは、哺乳類の概日リズム制御中枢・視交叉上核（SCN）とは別の生物時計（食餌同期性クロック）によって制御されるが、その詳しいメカニズムは分かっていなかった。本研究で、食餌同期性クロックが機能するためには、脳内の視交叉上核以外の場所における時計遺伝子 *Bmal1* の働きが必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：When food availability is temporally restricted to a fixed time of the day (restricted feeding), animals adapt to this condition within a few days by feeding during the period of food availability and increasing food-seeking activity in the preceding hours. These changes in biological rhythms have been postulated to be brought about by a food-entrainable oscillator (FEO) that is independent of the mammalian master clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN), although little is known of the physical and molecular substrates of the FEO. In this study, we demonstrated that an SCN-independent FEO in the nervous system requires a clock gene, *Bmal1*, and plays a critical role in adaptation of circadian locomotor activity and food intake to restricted feeding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：概日リズム，摂食，視床下部，マウス，ニューロン

1. 研究開始当初の背景

毎日固定した一定時間帯でのみ餌が得られる環境下（制限給餌）では、動物は給餌前

数時間にわたり食物探索行動を示し、給餌時間内に十分量摂食するように順応する。この食餌同期性概日行動リズムは、哺乳類の概日リズム制御中枢・視交叉上核（SCN）とは別

の生物時計（食餌同期性クロック）によって制御される。食餌同期性クロックは環境、生活習慣への適応、不適応のメカニズムを理解する上で重要であると考えられる。しかしながら、これまでに多くの研究者の努力に係わらず、未だに食餌同期性クロックの神経基盤は明らかになっていない。

我々は以前、時計遺伝子の発現解析等から、視床下部背内側核（DMH）が食餌同期性クロックの有力な候補部位であることを見いだした。DMH 食餌同期性クロック（DOMFEC）ニューロンを詳細に解析することで、食餌同期性概日リズム制御の神経メカニズムを明らかにするととの着想に至った。

2. 研究の目的

DMH 食餌同期性クロック（DOMFEC）ニューロンを突破口とし、食餌同期性概日リズム制御の神経メカニズムを明らかにすることを目的とした。

具体的にはまず、DOMFEC ニューロンにおける概日時計が食餌同期性クロックの機能に必要であるかを、脳領域・細胞特異的な *Bmal1* 欠損マウスを作成・解析することで検証することを目指した。また DOMFEC ニューロンからの投射先の同定や、DOMFEC ニューロンの時間発火パターン・電気生理学的性質を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

DOMFEC ニューロンにおける概日時計の役割の検証については、様々な脳領域・細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと、概日時計に必須の因子 *Bmal1* の flox マウスを交配し、様々な脳領域・細胞特異的 *Bmal1* 欠損マウスの食餌同期性概日リズムを解析した。

また投射先の同定には、Cre 依存的に神経軸索トレーサー（Channelrhodopsin 2）を発現する組換えアデノ随伴ウイルスを作成し、DOMFEC ニューロンに特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスに局所注入することにより、DOMFEC ニューロンを特異的にラベルする方法を確立した。

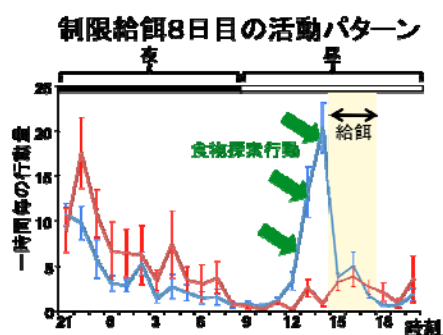
また *Per2-luciferase* レポーターマウスを用い、DOMFEC ニューロンを含む脳領域の explant culture において時計遺伝子 *Per2* 発現の概日リズムを観察することに成功した。さらに、スライス標本での電気生理学的解析を行うために、DOMFEC ニューロン特異的に緑色蛍光タンパク質を発現するマウスの作成にも成功した。

4. 研究成果

申請者は、食餌同期性概日リズムの制御において、DMH における時計遺伝子の機能が重要であるとの仮説の下、本研究計画を提案し、遂行してきた。しかしながらこの2-3年に、DMH のみならず既知時計遺伝子の食餌同期性概日リズムへの関与に関してさえ否定的な報告がなされた。

食餌同期性概日リズムが、SCN により駆動される光同調性概日リズムと非常によく似た概日性を示すことを考えると、既知時計遺伝子が食餌同期性概日リズムに全く関わらないとの結論は驚きであった。そこで申請者はまず始めに、*Nestin-Cre* マウスと *Bmal1flox* マウスを交配し、神経系特異的に時計遺伝子 *Bmal1* を欠損したマウスを作成・解析した。このマウスは幸運にも SCN では殆ど組換えが起こらず、SCN の概日時計はほぼ正常であったが、それ以外の多くの脳領域で *Bmal1* が欠損していた。その結果、制限給餌下における食物探索行動が顕著に減弱し、摂食量、体重も有意に減少した（図）。従って、神経系における時計遺伝子・概日時計が食餌同期性活動リズムの出現に必須であり、この時計を欠損すると自発活動リズムだけでなく摂食調節機構も時間的食餌制限に適応できず、体重を維持できないことが明らかになった。時計遺伝子が関与しないとの先行報告には問題点があり、それを踏まえ、ここ2-3年の論争に終止符を打つ統合的な説明を提示した。これらの成果を発表し、大きな反響を得られた。

— 正常マウス
— 神経系特異的 *Bmal1* 欠損マウス



また DMH の食餌同期性概日リズムへの関与に関してもごく最近、先行論文との違いを踏まえた上で「やはり DMH が重要である」との報告がなされている。この報告により、「DMH は食餌同期性概日リズムに関わらない」との結論の根拠が消失した。従って、本研究課題の妥当性・重要性が確認された。しかしながら、未だ DMH が食餌同期性クロック

クとして機能することの完全な証明には至っていないので、今後さらにこの作業仮説を証明することを目指す。

さらに本研究で、DMHを含む前脳腹側部 (SCNは除く) 特異的な Bmal1 欠損マウスにおいて、食餌同期性活動リズムの減弱を確認した。これは DMH が食餌同期性クロックとして機能するとの仮説に合致する。興味深いことに、このマウスは自由摂食下 (常に餌がある状態) においても、夜行性ではあるが、活動期での自発活動パターンに異常が生じる。従って、SCN の光同期性クロックは大まかな夜行性の活動パターンを決定し、詳細な活動リズムの表出には SCN 外の前脳腹側部に存在する概日時計が必要であると考えられる (投稿準備中)。

今までの研究で領域特異的・細胞特異的 BMAL1 欠損マウスの解析が、食餌同期性クロックの研究に有効であることが明らかになったので、今後はさらに他の領域特異的・細胞特異的 BMAL1 欠損マウスの解析を進め、食餌同期性クロックの神経メカニズムに迫っていく。また、本研究で作成した神経系特異的 Bmal1 欠損マウスは、SCN 光同期性クロックを正常に保ったまま、食餌同期性クロックのみを特異的に欠損した唯一のモデルマウスなので、このマウスを用いて食餌同期性クロックがいかんして食欲や末梢臓器の機能を調節するかを、明らかにしていきたい。

食事のタイミングや睡眠時間等の生活習慣と肥満やメタボリックシンドロームとの関連について最近様々な報告がされている。概日リズムの神経メカニズムと摂食・エネルギー代謝調節の神経メカニズムの間には相互作用があるが、その基盤となる神経ネットワークは明らかでない。食餌同期性クロックが両者のインターフェースとして機能すると思われる。したがって本研究計画で食餌同調性ペースメーカーを欠損したマウスモデルが確立できれば、食習慣や睡眠パターンの乱れが様々な行動・生理機能に与える影響について、神経ネットワークレベルでの理解が可能になる。また、様々な食習慣・生活スタイルにおける健康上のリスク、さらにはその効果的な対処方法の検討につながると期待する。

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 8 件)

- ① Mieda M, Sakurai T. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation of circadian locomotor activity and food intake to periodic

feeding. *J. Neurosci.* 31(2011), 15391-15396. 査読有

- ② Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton, CM, Yanagisawa M, Sakurai T. Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J. Neurosci.*, 31(2011), 6518-6526, 査読有
- ③ Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T. Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One* 6(2011), e20360. 査読有
- ④ Nagata-Kuroiwa R, Furutani N, Hara J, Hondo M, Ishii M, Abe T, Mieda M, Tsujino N, Motoike T, Yanagawa Y, Kuwaki T, Yamamoto M, Yanagisawa M, Sakurai T. Critical role of neuropeptides b/w receptor 1 signaling in social behavior and fear memory. *PLoS One*, 24(2011), e16972. 査読有
- ⑤ Sakurai T, Mieda M. Connectomics of Orexin-producing Neurons: Interface of Systems of Emotion, Energy Homeostasis and Arousal. *Trends Pharmacol. Sci.*, 32(2011), 451-462, 査読有
- ⑥ Sakurai T, Mieda M, Tsujino N. The orexin system: roles in sleep/wake regulation. *Ann N Y Acad Sci.*, 1200(2010), 149-161, 査読有
- ⑦ Mieda M, Sakurai T. Integrative physiology of orexins and orexin receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 8(2009), 281-295, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Mieda M, Sakurai T. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation of circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. 第 89 回日本生理学会、2012 年 3 月 29 日、松本文化会館 (長野県)
- ② Hasegawa E, Yanagisawa M, Sakurai T, Mieda M. Search for neurons mediating functions of orexin as a wakefulness-stabilizer. 第 89 回日本生理学会、2012 年 3 月 31 日、松本文化会館 (長野県)
- ③ 三枝 理博、長谷川 恵美、Nicoletta Kessaris、田中 光一、岡本 仁、櫻井武、 脳領域・細胞特異的 Bmal1 欠損マウスを用いた概日ペースメーカー機構の解析 第 18 回日本時間生物学会、2011 年 11 月 24 日、名古屋大学 (愛知県)
- ④ Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton, CM, Yanagisawa M, Sakurai T.

Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. World Sleep 2011, 2011年10月17日, 国立京都国際会館(京都府)

- ⑤ Mieda M, Sakurai T. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation of circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. 第34回日本神経科学会、2011年9月14日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑥ Mieda M, Hasegawa E, Kessaris N, Tanaka K, Sakurai T. Extra-SCN expression of BMAL1 in the ventral forebrain generates the precise circadian pattern of locomotor activity. 第116回日本生理学会, 2011年3月(震災のため誌上開催)
- ⑦ Hasegawa E, Mieda M, Kisanuki YY, Sinton, CM, Yanagisawa M, Sakurai T. Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. 第116回日本生理学会, 2011年3月(震災のため誌上開催)
- ⑧ Abe T, Mieda M, Tanaka K, Yanagisawa M, Sakurai T. Both OX1R and OX2R orexin receptors mediate efferent signals of orexin neurons in eliciting food-anticipatory activity. 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009年7月29日, 国立京都国際会館(京都府)

[その他]

ホームページ等

北國新聞(朝刊) 平成23年10月28日
(25面)掲載

<http://news.mynavi.jp/news/2011/10/28/025/index.html>

<http://www.newtonpress.co.jp/science/news/sensor/s2012/s201201/201201-3334.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 理博 (MIEDA MICHIHIRO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 20296552

(3) 連携研究者

桜井 武 (SAKURAI TAKESHI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 60251055