平成 31年 3月 17日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

探用年度 29年度 受付番号 73 氏 名 11 反,傻

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。 なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ロサンゼルス (国名: アメリカ)

2. 研究課題名(和文) 神経変性疾患予防への時間栄養学的アプローチ

3. 派遣期間:平成 30年 1月 10日 ~ 平成 31年 3月 16日(431日間)

4. 受入機関名及び部局名

University of California Los Angeles, Department of Psychiatry and Biobehavioral Sciences, Prof. Christopher S. Colwell (研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等) (注)「6.研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

研究遂行状況の概要

本研究ではハンチントン病に着目し、食事タ イミング制御による時間栄養学的アプローチ が、運動機能改善、神経変性予防をもたらすこ と、さらにその作用機序を新規に明らかにする ことを目的とする。特にメカニズムとして、一 定期間の絶食により体内で生成されるβヒド ロキシ酪酸の、神経保護効果に着目する (Newman et al., Trends Endocri, 2014)。つまり、食タ イミングの制御による一定の絶食期間が、βヒ ドロキシ酪酸の産生をもたらし、それにより病 態改善が起こるという仮説を立て研究を進め る。

実験1では、ハンチントン病モデルマウス (BACHD マウス)を用いて、2週間から3ヶ 月間の食餌時刻制限が、行動、睡眠、運動機能、 時計遺伝子発現リズムにもたらす影響を調べ た。食餌時刻の制限は、BACHD マウスで見ら れた活動・睡眠リズム、運動機能の低下を改善 した。興味深いことに、個体ごとに評価してみ ると、活動リズムの改善と一方で BACHD マウ スの各臓器における時計遺伝子発現に関して は、自由摂食下でも常に正常に機能しており、 食餌時刻制限による効果は位相の変化のみで あった。これらの研究内容は、Whittaker and Tahara et al., JBR, 2018 として論文掲載され た。また、同内容は、UCLA sleep and memory symposium, SRBR meeting 2018 にてそれぞれ 学会報告も行った。

実験2では、in vivo 電気生理法を用いて、ハ ンチントン病の病巣である線条体における神 経活動の日内変動を測定した。その結果、 BACHDマウスでは日内変動の振幅はWTと変 わらないものの、日々の活動終了時刻の遅れと 相関し、神経活動リズムの終了時刻の遅れが観 察された。また、恒暗条件下では神経活動の発 火ピーク頻度がWTに比べて多かった。5秒間 隔で神経活動を記録した結果、これらの神経活 動は摂食、飲水、グルーミング行動に依存的で



図1食餌時刻制限による活動リズムの変化 (A)自由摂食(左)、食餌時刻制限(右) におけるIRセンサによる活動の日内変動。 (B)リズム性の変化、(C)暗期の活動の 割合、(D)活動開始時刻のバラツキ、(E) 活動量。

あることがわかった。また、歩行や輪回し行動、睡眠中は神経活動がベースラインまで低下することが分かった。薬理学的な実験から、これらの神経活動はドーパミン神経、アセチルコリン神経依存的であることも分かった。

実験3では、 β ヒドロキシ酪酸の効果を、電気生理学的手法にて検討した。概日時計の中枢である SCN のスライスを用いて、培地への β ヒドロキシ酪酸投与が神経発火頻度に与える影響を調べた。その結果、グルコース濃度が低い培地において、 β ヒドロキシ酪酸が SCN の神経活動を増加させることが分かった。さらに、BACHD マウスに β ヒドロキシ酪酸を毎日 ZT23.5 に投与した結果、BACHD マウスで見られる活動量減少、活動終了時刻の遅れが見られなくなった。よって、 β ヒドロキシ酪酸が概日時計のメリハリを高め、行動リズムの改善につながることが明らかとなった。

現在さらに、ケトン食の自由摂食による影響、またアラニン水によるケトン体産生が食事時刻制 限による効果を打ち消すのかどうか、を検討中である。

実験結果

実験1 食餌時刻の制限が BACHD マウ スの活動、睡眠リズム、運動機能、時計 遺伝子に及ぼす影響

ヒトハンチントン病原因遺伝子のト ランスジェニックマウス(BACHD マウ ス)と、WT マウスを用いた。3ヶ月齢 のオスマウスを用い、自由摂食、または 食餌時刻制限(TRF: Time-restricted feeding、ZT15-21の6時間)にて6ヶ 月齢まで飼育した。その後、赤外線セン サーにて活動リズム、さらにビデオ撮 影解析により睡眠リズムを測定した。 その結果、図1に示す通り、活動のリズ ム性(Power)の改善(図1A-B)、暗期 (活動期)の行動量増加(図1C)、活動

開始時刻のバラツキ改善(図 1D)が見 られた。活動量は WT に比べて BACHD で 低く、TRF による効果は見られなかった (図 1E)。

また、ビデオ解析による睡眠は、30 秒 の無動時間を眠っていると規定し解析 を行った。その結果、TRF 処置により、 明期(非活動期)の睡眠の増加、暗期(活 動期)の睡眠の減少、さらに BACHD で見 られていた睡眠の断片化が抑制される

結果を得た。よって、ハンチントン病モデルマウスで見られていた行動・睡眠リズムの減弱が、TRF 処置により有意に抑えられることがわかった。

次に、時計遺伝子 PER2 をインビボ発光イメージングに て測定するため、BACHD マウスと PER2::LUCIFERASE (PER2::LUC) マウスをかけ合わせた。6-9ヶ月令のマウ スを用い、自由摂食下、または食餌時刻制限下(2週間) で、4時間おき、計6回のイメージングを行い、発光の日 内変動を測定した。まず、自由摂食下では、WT、BACHDマ ウスともに、それぞれの臓器(システムの関係で、腎臓、 肝臓、顎下腺が測定可能) で、正常な日内リズムが観測さ れ、特にジェノタイプによる差は見られなかった。仮説で は、BACHD マウスの行動、摂食リズムの減弱から、末梢時 計の減弱を予想していたが、そのような差は見られなか った。一方で、食餌時刻の制限により、WT、BACHD ともに、 発光リズムのピーク時刻後退(約4時間)が見られた。こ れは、食餌の開始時刻が普段から3時間後退しているこ とで、絶食+再給餌効果による末梢時計のリセットが起 きたからと考えられた。

次に、食餌時刻の制限が、ハンチントン病モデルマウス で起こる運動機能障害に与える影響を調べた。回転棒上 の滞在時間を評価するロータロッド試験では、WT マウス に比べて BACHD マウスで有意に滞在時間の減少が見られ た(自由摂食時)。それに対し、食餌時刻制限群では、WT と同程度の滞在時間を示し、有意な改善がみられた。次 に、チャレンジングビーム試験を行った。これは、徐々に 細くなる1本橋を渡り、足を踏み外した回数(エラー)を 調べる試験である。結果、ロータロッド試験同様、WT, BACHD 間で見られていた差が、食餌時刻の制限により改善







図3 食餌時刻制限による運動機能の変化 (A) ロータロッド試験における回転棒の滞 在時間。(B) チェレンジングビーム試験に おけるエラー数。(C,D) それぞれの運動評 価と、活動リズムのリズム性との相関図。 (E) チャレンジングビーム試験結果。

する結果を得た。さらに興味深いことに、個体ごとのデータを比較してみた結果、活動リズムの改善と運動機能の改善に正の相関が見られた。



実験2 in vivo 電気生理法による線条体神経活動リズムの測定と、食餌時刻制限による影響

図4 食餌時刻制限における線条体神経活動の変化

(A)自由摂食下における線条体神経活動の日内変動。(B)神経活動のリズム性。(C)明期始め(ZTO-3、 ZTOは明期開始時刻、ZT12は暗期開始時刻)における神経活動。(D)BACHDマウスの食餌時刻制限による 神経活動の変化。(E)リズム性。(F)明期のピーク数の変化。

6ヶ月令のWT、BACHDマウスを用い、in vivo multiunit neural activity (MUA) 法による無拘 束下の神経活動記録を行った。電極は線条体の腹側に挿入した(ブレグマより前 0.1mm、左 2.5mm、 下 4.2mm の位置)。マウスは配線により繋がっているが、自由に行動でき、輪回しまたは IR センサ による活動リズムの測定も行える。測定は、firing rate のみをその場で抽出することでデータの 軽量化を測り、数週間連続で測定できる。

①自由摂食下における WT, BACHD の比較

通常の明暗環境、さらに恒暗環境にて測定を行った。ぞれぞれ4日間の平均したデータを解析に 使用した。まず、WT, BACHDマウスともに、線条体の神経活動は、暗期の活動期に高く、明期の非 活動期に低い日内リズムが見られた。振幅には大きな差は見られなかった。しかし、BACHDマウス は、WTマウスに比べ、活動のオフセットが遅れ、それと相関して神経活動のオフセットも遅れてい た。また、恒暗条件下においても、振幅、リズム性にはジェノタイプによる差は見られなかった。 一方で、BACHDマウスでは、神経発火の断片化、つまりピーク数が多かった。

②食餌時刻制限による神経活動リズムの変化

次に、実験1と同様に、食餌時刻を暗期の真ん中6時間に制限して10日間飼育後に、神経活動 リズムを測定した。その結果、WT、BACHD マウスともに、輪回し行動の日内リズムが改善した。ま た、線条体の神経活動リズムにも有意な改善が見られた。さらに、明期の神経活動のピーク数が有 意に減少していた。これは、明期の活動、または摂食行動の減少によるものと考えられた。

③特定の行動・神経タイプ依存的な神経活動の変化

これまでは1分間隔で集計していたが、5秒おきの集計にして、さらにビデオ撮影することで、 行動との相関を調べた。その結果、in vivo 電気生理により記録された神経活動は、摂食、飲水、 グルーミング時に増加し、輪回しや歩行、立ち上がりなどでは減少することが分かった。また、線 条体にはドーパミン神経、アセチルコリン神経が投射していることから、これらの神経を薬理学的 に遮断した際の神経活動の変化についても調べた。その結果、ドーパミン受容体拮抗薬(Dopamine D1 receptor antagonist SCH23390, 0.1mg/kg, 腹腔内投与、またはD1/2 receptor antagonist Flupenthixol, 0.5mg/kg, 腹腔内投与)により、線条体神経活動は有意に低下した。また、ムスカ リン性アセチルコリン受容体拮抗薬(Atropine, 1mg/kg, 腹腔内投与)では、明期の投与のみ神経 活動低下作用が見られ、暗期の投与では効果を示さなかった。また、絶食一再給餌による線条体神 経活動の増加は、ドーパミン受容体拮抗薬にて遮断することができた。よってこれらの実験から、

実験3 食餌時刻制限におけるβヒドロキシ酪酸経路の関与



*p < 0.05, ** p < 0.01 vs. vehicle by Dunnett's multiple comparisons test (n = 8 in each)

図5 βヒドロキシ酪酸がBACHDマウス(6ヶ月令)の活動リズムに及ぼす影響

ここでは、急性脳スライスを用いて、視交叉上核(中枢時計)における潜在的な神経活動に、 β ヒドロキシ酪酸がどう影響するのか調べた。培養液に含まれるグルコースの濃度を下げる(5mM か ら 1mM、または 0mM)ことにより、絶食時の低血糖を模した状況を作り、その状態で β ヒドロキシ酪 酸 (1-2.5mM)を培地投与することで、神経発火の変化を調べた。まず、低血糖培地において、中枢 時計の神経活動は有意に低下した。 β ヒドロキシ酪酸(1-2.5mM)の投与は、低下した神経活動を増 加させたことから、 β ヒドロキシ酪酸が中枢時計に直接作用し、神経活動を変化させたことを明ら かにした。これらは急性の反応であり、 β ヒドロキシ酪酸が脳内のエネルギーとなり、神経活動を 増加させたと考えた。現在、神経活動と細胞のエネルギー状態に関与する KATP チャネルの発現変 化、またはそのチャネル依存的な電流変化を測定中である。

次に、6 ヶ月令の BACHD マウスを用いて、生理食塩水 (vehicle)、または β ヒドロキシ酪酸 (200mg/kg or 300mg/kg, i.p.)を4日間、ZT23.5に投与し、活動リズムの変化を調べた。その結果、図5に示すように、 β ヒドロキシ酪酸 300mg/kgの投与群では、明期始めの活動終了時刻が早まり、さらに暗期始めの活動量が増えた。よって、 β ヒドロキシ酪酸の投与が、BACHD マウスの概日時計を改善する可能性がある。

今後の課題

海外学振期間内で、多くの研究結果を出すことが出来たが、まだ研究目的の達成には至っていない。 今後、以下の実験を継続して行う予定である。

①食餌時刻制限による睡眠・覚醒リズム、運動機能の改善が、 β ヒドロキシ酪酸分泌によるものなのか検討する。シュークロース水、アラニン水の飲水により β ヒドロキシ酪酸産生を低下させた際に、上述の食餌時刻制限による効果が消失するのか調べる。②電気生理の結果を補足すべく、KATP チャネルの変化を測定する。また、SCN における ATP 濃度の測定を行う。③ β ヒドロキシ酪酸を 3 ヶ月間続けることで、BACHD マウスの運動機能改善が見られるのか検討する。④食事時刻制限による効果が睡眠の質改善につながるのか、睡眠脳波測定により検討する (n = 4 ずつで実験を一度行ったが、さらに n 数を増やす必要あり)。