

## 夜食症候群の病態生理学的メカニズムの解明

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 統合生理学

志内 哲也

### 1. はじめに

生活習慣の乱れがインスリン抵抗性を引き起こすことが知られて久しい。中でも就寝直前に飲食する夜食症は、戦後の経済成長に伴う現代病であると言える。夜食症の患者はインスリン抵抗性を示すが、必ずしも肥満を呈する訳ではない(1) (Marshall HM, 2004 Int J Eat Disord)。

夜食症候群の原因の一つとして、摂食リズムの乱れにより脂肪組織以外の末梢組織への脂肪蓄積が考えられる。生体リズムとエネルギー代謝は密接にリンクすることが知られている(2)。事実、末梢組織における時計遺伝子(特にBmal1)の発現が脂肪酸代謝に関与するという報告は数多い。また、末梢組織における生体リズムは摂食パターンで制御されることから、夜食症のような摂食リズムの乱れは、末梢組織の生体リズムを崩すことが予想される。しかしながら、中枢での摂食調節作用が、末梢組織における生体リズムやそれに伴う脂肪酸代謝へ与える影響は不明である。

骨格筋における脂肪蓄積はインスリン抵抗性を惹起する。しかし、摂食リズムの乱れによる中枢での摂食調節物質の作用が、骨格筋における脂肪蓄積を調節するかは明らかになっていない。そこで本研究では、摂食リズムと中枢性エネルギー代謝調節機構との関連に着目し、夜食症候群のインスリン抵抗性惹起メカニズムを解明することを目的とした。

### 2. 方法

#### 【実験動物と飼育方法】

8週齢の雄性C57BL/6Jマウスを用いて、摂食時間を暗期のみ(ZT12-24、Control群)、暗期前半4時間のみ(ZT12-16、Morning群)、暗期後半4時間のみ(ZT20-24、Evening群)の3群に分けて飼育し、8週間後に実験を行った。これらの飼育は、室温は24℃、12時間の明暗リズムに設定された、個別飼育実験装置内で実施した。

#### 【脳カニューレ挿入留置手術と脳室内投与】

ケタミン・キシラジン麻酔下において脳定位固定装置にマウスを固定し、25Gのカニューレを側脳室内(Bregmaより後方へ0.3mm、右方へ1.0mm、深部へ2.5mm)に挿入した。挿入したカニューレは、接着剤および歯科用レジンをを用いて固定した。1週間以上、回復させた後、無麻酔下においてマウス側脳室内へ0.5nmol/0.5μlのAgouti-related protein (AgRP)を投与した。

#### 【Insulin tolerance test; ITT】

4時間の絶食後、1.0U/kg濃度のインスリンを腹腔内に投与し、尾静脈より経時的に採血を行い、血糖値を測定した。

#### 【リアルタイムRT-PCR】

採取した組織からRNAを抽出し、cDNAへ逆転写した後、SYBR-green法を用いたリアルタイムPCRを行った。

#### 【ウエスタンブロッティング】

ITTと同様の濃度で腹腔内にインスリンを投与し、15分後に肝臓およびヒラメ筋を

採取・凍結保存した。採取した組織からホモジナイズ後にタンパク質を抽出し、SDS-PAGEを行い、PVDF膜に転写した。その後、免疫抗体反応を用いて目的分子のバンドを検出した。検出したバンドは、ソフトウェア (Image J) を用いて定量した。

### 3. 結果

#### 【摂食スケジュールの違いによる体重、摂餌量、インスリン感受性への影響】

Control群と比べMorning群およびEvening群は、有意に低い摂餌量を示した。実験中の8週間において、Morning群の体重増加はほとんど見られなかったのに対して、Evening群はControl群と同様の体重増加を示した。異なる摂食スケジュールで飼育開始8週間目にITTを行うと、Evening群において全身のインスリン抵抗性が認められた。

#### 【肝臓と骨格筋における時計遺伝子の発現】

異なる摂食スケジュールで4週間飼育した後、肝臓と骨格筋（ヒラメ筋）を摘出し、時計遺伝子のmRNA発現リズムを調べた。すると、Control群と比べMorning群は、発現の程度に差はあるものの、ほぼ同じ発現リズムを示したのに対し、Evening群の時計遺伝子の発現リズムは逆転していた。特にBmal1とper2の発現は大きな変化を示した。一方、骨格筋におけるBmal1およびper2の発現リズムも、Evening群において逆転していたが、肝臓と比較するとその乱れは小さかった。

#### 【肝臓と骨格筋における代謝関連遺伝子の発現と中性脂肪含量】

Evening群の肝臓において、糖新生に重要な酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの発現のリズムが逆転していた。一方、骨格筋においては糖代謝系よりも脂肪酸代謝系の遺伝子群 (Perilipin、CPT1、UCP3など) に発現リズムの乱れが多く、特に、脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase; FAS) の発現は、Evening群において常に高い値を推移し、8週間の飼育後には、FASのタンパク質発現もEvening群の骨格筋において有意に高かった。さらに、Evening群の骨格筋においては、脂肪酸酸化に関与するCPT1のmRNA発現およびAMP-kinaseのリン酸化の低下が見られた。また、他の2群と異なりEvening群において、骨格筋における中性脂肪含量が有意に高かったが、肝臓における中性脂肪含量には3群間で有意な差は見られなかった。

#### 【肝臓と骨格筋におけるインスリン感受性への影響】

糖取り込みに関与するインスリンシグナル伝達経路のうち、Aktのリン酸化をインスリン感受性の指標としてウエスタンブロット法を用いて測定した。その結果、Evening群の骨格筋においてインスリンによるAktリン酸化の低下が見られた。このようなインスリン感受性の低下は、肝臓においては見られなかった。

#### 【視床下部における神経ペプチドの発現】

一方、Evening群の視床下部において、AgRP発現リズムが摂食リズム形成後早期に大きな乱れを示し、8週間後にはPOMC発現の低下を示した。

#### 【AgRPの脳室内投与による骨格筋代謝への影響】

AgRPを脳室内に一過性に投与すると、骨格筋に投射する交感神経の活性および骨格筋におけるAMP-kinaseのリン酸化が低下した。また、AgRPをマウス脳室内に7日間連続で投与すると、摂食量をコントロール群と同量に調整したにもかかわらず、骨格筋における中性脂肪含量および脂質代謝関連遺伝子の発現が高値を示した。

### 4. 考察・まとめ

一般的に、明暗リズムが変わると視交叉上核における時計遺伝子の発現リズムが変化し、摂食リズムが変わると肝臓の時計遺伝子の発現リズムが変化することが知られている(2)。肝臓における時計遺伝子発現リズムの破綻は、肝臓におけるエネルギー代謝

調節に異常をきたし、インスリン抵抗性の原因となる。本研究においては、Evening群の肝臓における時計遺伝子の発現リズムは大きくシフトする結果を得たが、肝臓における中性脂肪蓄積や脂質代謝関連遺伝子の発現増強は見られず、インスリン抵抗性も認められなかった。この原因として、摂食量が考えられる。多くの先行研究では自由摂食であるが、本研究ではControl群の暗期のみの12時間だったのに対し、他2群は暗期の4時間のみの摂食だったため、Evening群とMorning群の摂食量はControl群の摂食量より15%程度少なかった。それゆえ、肝臓への過剰なカロリー蓄積が抑えられたと考えられる。事実、Evening群とMorning群における白色脂肪組織の重量は、Control群の約半分であり、生体全体でエネルギーの蓄積が抑制されていることが分かる。

一方、Evening群においては骨格筋への脂肪蓄積が増加しており、FASなど脂質代謝に関与する遺伝子群の発現増強も見られた。骨格筋への異所性脂肪蓄積は、骨格筋におけるインスリン抵抗性発症の原因となることが知られている。それゆえ、Evening群における骨格筋および全身のインスリン感受性の低下は、骨格筋への脂肪蓄積が原因と考えられる。

視床下部における神経ペプチドは摂食行動に関与するだけでなく、末梢のエネルギー代謝調節にも重要であり、時計遺伝子ほどではないがサーカディアンリズムを示すことが知られている。本研究においてもControl群の視床下部においては、神経ペプチドの緩やかな発現リズムを示したが、Evening群ではAgRPの高い発現を伴ったリズムの乱れが見られた。AgRPはメラノコルチン受容体の内因性アンタゴニストであり、摂食行動および末梢での脂肪蓄積を促す。我々は以前、メラノコルチン受容体のアゴニストの中枢内投与が、骨格筋のAMPKのリン酸化を増強することを報告している(3)。本研究ではAgRPの中枢内投与が、骨格筋のAMPKリン酸化を低下させ、脂肪蓄積を促進する結果を示した。これらのことは、Evening群における骨格筋での脂肪蓄積は、視床下部におけるAgRPの発現増強が原因の一つである可能性を示唆する。

以上、本研究結果より、摂食リズムの乱れによるインスリン抵抗性発症の原因に、視床下部における神経ペプチドの発現リズムへの影響と、中枢メラノコルチン系による骨格筋への異所性の脂肪蓄積が可能性として考えられる。今後は、Evening群におけるインスリン抵抗性発症に、視床下部AgRPの発現増強がどれぐらい寄与するのか、ならびに、AgRP発現を増強する因子の探索が、検討課題になると思われる。

## 5. 参考文献

- (1) Marshall HM, Allison KC, O'Reardon JP, Birketvedt G, Stunkard AJ. Night eating syndrome among nonobese persons. *Int J Eat Disord.* 2004 Mar;35(2):217-22.
- (2) Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. *Cell.* 2008 Sep 5;134(5):728-42
- (3) Tanaka T, Masuzaki H, Yasue S, Ebihara K, Shiuchi T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Yamamoto H, Hayashi T, Hosoda K, Minokoshi Y, Nakao K. Central melanocortin signaling restores skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 2007 May;5(5):395-402.