

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 夏堀 晃世

学位論文題名

Expression of circadian rhythms in clock gene in association with a novel behavior rhythm induced by methamphetamine in rats: an animal model of human sleep-wake cycles
(メタンフェタミン投与ラットにおける新奇行動リズムと時計遺伝子概日リズムの発現に関する研究: ヒト睡眠覚醒リズムの動物モデル)

【背景と目的】

哺乳類の概日リズム機構は階層的な多振動体からなり、視床下部視交叉上核の中核振動体が他の脳内や全身組織の末梢振動体を支配し、睡眠覚醒リズムをはじめとする生理機能リズムを制御する。細胞内では、*Clock*、*Bmal1*、*Cry*、*Per*の4種類の時計遺伝子とそのタンパク産物が転写翻訳フィードバックループを形成し、約24時間周期のリズムを発現すると考えられている。

一方ヒトでは、睡眠覚醒リズムが深部体温や血中メラトニンなどの他の概日リズムと乖離する(内的脱同調)ことから、概日機構の2振動体仮説が提唱されている。しかし2振動体の局在や振動機序については不明であり、この問題の解決にはヒト概日リズムの特徴を適切に再現する動物モデルが必要である。従来より、中枢神経刺激薬メタンフェタミンの投与により出現するラット行動リズムは、内的脱同調をはじめヒト睡眠覚醒リズムのいくつかの特徴を模倣することが知られており、メタンフェタミン誘導性振動体(MAO: methamphetamine-induced oscillator)の存在が想定されていた。しかし、MAOの局在や振動機序は未解明である。

本研究はMAOの局在、振動機序を解明することにより、ヒト概日リズム機構の脳内メカニズムを明らかにすることを目的とした。脳部位としては複数のドパミン神経組織に注目し、培養組織の時計遺伝子発現リズムを光学的に測定した。この方法により、各部位の独立した概日振動を解析することができる。また本研究は、振動体MAOと視交叉上核との競合関係、従来から類似性が指摘されていた制限給餌により出現する食餌性振動体(FEO: food-entrainable oscillator)との異同の解明を目的とした。

【方法と結果】

実験には、時計遺伝子*Period2*のプロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するトランスジェニックラット(*Per2-dLuc*)の成獣雌を用いた。24時間周期の明暗サイクル下(明期6-18時)で飼育したラットへメタンフェタミンを投与し、感熱式赤外線センサーで自発行動量を連続測定した。また視交叉上核と4箇所のドパミン神経組織(嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質)をスライス培養し、*Per2-dLuc*発光量をルミノメーターで連続測定した。

実験1では、ラットにメタンフェタミン水溶液(0.005-0.01%)を自由摂取させた。その結果、暗期の行動が亢進するとともにリズム位相が後退し、数週間後に明暗サイクルから脱同調した。このとき脳組織を採取し、各脳部位の概日振動を測定した。視交叉上核の*Per2-dLuc*リズムは、対照群と比較し差はなかった。一方、嗅球では8.5時間の位相前進、線条体、頭頂皮質、黒質ではそれぞれ4.5時間、7.6時間、4.9時間の位相後退を認めた。

実験2では、脳組織の概日振動が振動体MAOと視交叉上核の二重支配を受けている可能性を検証するため、視交叉上核を破壊したラットを実験に用い、正常ラットと比較した。また

MAO の位相を固定させるため、10 時から 4 時間のみメタンフェタミン 0.005%水溶液を与えるメタンフェタミン制限投与を 14 日間行った。対照群は同一時刻、同一期間、制限給水を行った。正常ラットへのメタンフェタミン制限投与により投与時刻に出現した行動は、その後のメタンフェタミン自由摂取下で位相後退した。対照の制限給水ラットは制限給水時刻前に行動の亢進を認めたが、その後のメタンフェタミン自由摂取下では、暗期の行動量が増加しわずかに位相後退を示した。このことから、メタンフェタミン制限投与により投与時刻に同調した MAO の成立と行動リズムへの発現が示された。一方、視交叉上核破壊ラットでは、メタンフェタミン制限投与時刻に同調して出現した行動リズムは位相後退したが、正常ラットでみられた位相後退の抑制は認められなかった。このことから、正常ラットに発現した MAO 行動リズムは視交叉上核の影響を受けていることが示された。メタンフェタミン制限投与 14 日目に採取した *Per2-dLuc* リズムは、正常ラットでは視交叉上核を除き、全体で平均 2.7 時間位相前進した。さらに視交叉上核破壊により、嗅球で 5.2 時間の位相前進、黒質で 8.6 時間の有意な位相後退を認めた。一方、制限給水による各組織の概日リズムは、視交叉上核破壊により線条体と頭頂皮質の位相が有意に前進した。

実験 3 では、振動体 MAO と食餌性行動リズムを支配する振動体 FEO の異同を明らかにするため、定時刻（10 時）にメタンフェタミン腹腔内投与（2 mg/kg b.w.）または 2 時間の制限給餌を 14 日間行い、行動リズムと各脳組織の概日リズム振動を比較した。メタンフェタミン投与後および制限給餌直前に、行動の著しい亢進が認められた。一方、14 日目に採取したドパミン神経組織の *Per2-dLuc* リズムは、メタンフェタミン投与により平均 1.9 時間の位相後退を認めた一方、制限給餌により平均 6.3 時間の位相前進を認め、両者で異なる変化を示した。視交叉上核のリズムはいずれの場合も変化しなかった。

【考察】

実験 1 より、ラットへのメタンフェタミン投与により行動リズムが位相逆転したとき、ドパミン神経組織の概日リズム振動は本来の位相から脱同調し、その方向、程度は脳部位により異なることが示された。視交叉上核概日リズムの位相には変化が認められなかったことから、行動リズムと同様、これら脳内概日リズム振動体は視交叉上核振動体から脱同調したと結論される。実験 2 では、視交叉上核破壊ラットと正常ラットとの比較検討により、ドパミン神経組織の概日リズム振動は、MAO と視交叉上核からそれぞれ二重の支配を受けていることが示された。測定した脳組織によりリズム位相変化の方向、程度が異なったことから、MAO はこれら複数の脳組織の概日リズム振動から構成される複合振動体である可能性が示された。一方、対照の制限給水によっても新たな行動リズムが出現し、各脳組織のリズム位相はメタンフェタミン群と異なったことから、MAO とは異なる制限給水による振動機構（WEO: water-entrainable oscillator）が存在する可能性が示された。実験 3 では、一日一定、同一時刻のメタンフェタミン投与と制限給餌により、近接した時刻に行動の亢進が認められたにもかかわらず、脳組織の概日リズム振動は異なる位相変化を示した。このことから、これまでの定説に反し、MAO と FEO とは異なる振動機構であることが示された。

【結論】

ヒト睡眠覚醒リズムの動物モデルであるメタンフェタミン誘導性行動リズムは、脳内ドパミン神経系に存在する複数の組織の概日振動体から構成される複合振動体 MAO に支配される。MAO と視交叉上核概日振動体はともに末梢振動体に影響し、その程度や様式は脳部位によって異なる。MAO と同一視されていた FEO は、各脳組織の概日リズム振動が異なる動態を示したことから別の振動機構と考えられる。