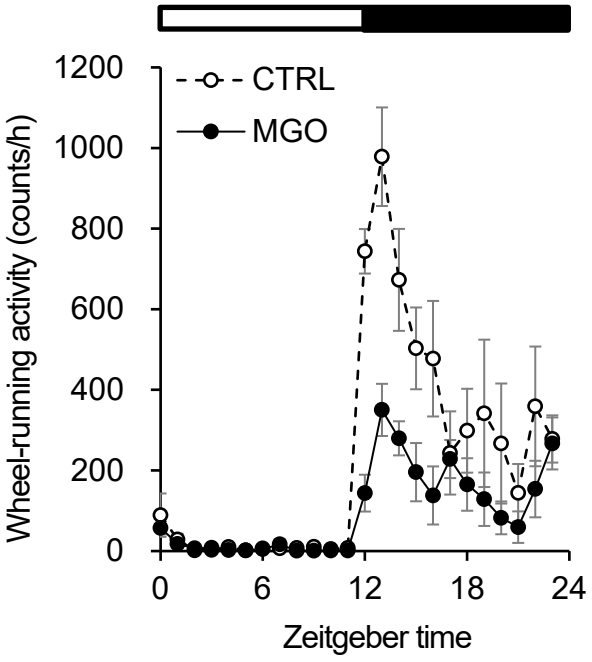
7　睡眠や体内時計機能に与える糖化ストレスの影響	大石　勝隆

【目的】高齢者では、睡眠覚醒リズムの乱れのみならず、深部体温や血圧などの様々な生体リズムの乱れが頻繁に認められる。本研究では、加齢に伴う睡眠障害や生体リズムの乱れのメカニズムを明らかにするために、認知症や血管障害などの加齢性疾患との関連性が指摘されている糖化ストレスに着目し、糖化最終生成物（AGEs）の中枢神経系への蓄積が、睡眠や体内時計システムに与える影響について、培養神経細胞やモデルマウスを用いた解析により明らかにする。さらに、哺乳類と類似した体内時計システムを有し、加齢に伴う生体リズムの減衰も認められるショウジョウバエを用いた解析により、糖化ストレスが生体リズムに与える影響について、種を超えた普遍的な制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】培養神経脂肪を用いた解析では、PER2::LUC マウスの胎仔脳由来の神経前駆細胞を *in vitro* で分化誘導し、培地へのメチルグリオキサール（MGO）代謝酵素 GLO1 の阻害剤 S-p-ブロモベンジルグルタチオンシクロペンチルジエステル（BBGC）の添加により糖化ストレスを負荷し、リアルタイム発光検出システムを用いて時計分子 PER2 の発現リズムに与える影響を調べた。マウスを用いた解析では、MGO を飲水投与し、活動リズムや睡眠脳波に与える影響を調べた。ショウジョウバエを用いた解析では、飼料用寒天に MGO を添加し、活動リズムと睡眠覚醒リズムを調べた。

【結果】PER2::LUC マウス由来の神経細胞を使った解析では、BBGC の培地への添加により、発光周期の短縮と振幅の減少が認められた。マウスに対する慢性的な MGO の投与では、暗期（活動期）の活動量が顕著に低下するとともに、覚醒時間の減少とノンレム睡眠時間の増加が認められた。明期（非活動期）においては、明期前半の覚醒時間の増加とレム睡眠時間及びノンレム睡眠時間の減少が認められた。ショウジョウバエの活動リズム及び睡眠リズムへの MGO 投与の影響においては、明期前半の活動期（モーニングピーク）の活動量が増加するとともに、明期中期の睡眠（昼寝）への移行が顕著に遅れており、明期後半の活動期（イブニングピーク）における睡眠時間の減少が抑制されていた。MGO の投与は、マウスやショウジョウバエにおいて、活動リズムや睡眠覚醒リズムに影響する可能性が示されたが、MGO には糖化ストレス以外にも多様な作用が知られており、さらなるメカニズムの解明が必要である。

マウスの活動リズムに与える MGO 投与の影響



7. 睡眠や体内時計機能に与える糖化ストレスの影響

大石　勝隆

産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 食健康機能研究グループ

Key words：概日リズム，活動リズム，睡眠覚醒リズム，マウス，ショウジョウバエ

緒　言

平成 29 年国民健康・栄養調査（厚労省）では、睡眠の問題の深刻さが指摘されており、睡眠で休養が取れていないと回答した成人が 20%を超えていることが明らかとなった。加齢やストレス、生活リズムの乱れなどの結果として生じる睡眠障害は、うつ病などの精神疾患や、高血圧、糖尿病、肥満などの生活習慣病の大きなリスク要因ともなっている。2017 年の米国のシンクタンクの発表によると、日本の睡眠障害による経済損失は 15 兆円、GDP 比で 2.9%と世界で最も深刻であるとされている。

高齢者では、睡眠障害のみならず体温、血圧、ホルモンの分泌などの様々な生体リズムの乱れが頻繁に認められる。近年、体内時計や睡眠の制御メカニズムが、ショウジョウバエからヒトに至るまで高度に保存されていることが明らかとなってきた。一方、加齢に伴う生体リズムの乱れは、多くの生物で共通して認められる現象であるものの、その分子メカニズムはほとんど不明であり、ただ漠然と「老化」の一言で説明されてきた。

加齢に伴う睡眠障害や生体リズムの乱れの分子メカニズムを明らかにするために、認知症や血管障害などの加齢性疾患との関連性が指摘されている糖化ストレスに着目し、糖化最終生成物（AGEs）の中枢神経系への蓄積が、睡眠や体内時計システムに与える影響について、モデルマウスを用いた解析により明らかにする。さらに、哺乳類と類似した体内時計システムを有し、加齢に伴う生体リズムの減衰も認められるショウジョウバエを用いた解析により、種を超えた普遍的な生体制御メカニズムの解明を目指す。

方　法

1. 神経培養細胞を用いた時計遺伝子の日周発現に対する糖化ストレスの影響

時計遺伝子 *Per2* の下流に発光レポーター遺伝子であるルシフェラーゼをノックインした PER2::LUC マウスの胎仔脳由来の神経前駆細胞を *in vitro* で分化誘導し、時計分子 PER2 とルシフェラーゼの融合タンパク質を日周発現する神経細胞を作製した［1］。培地へのメチルグリオキサール（MGO）代謝酵素 GLO1 の阻害剤 S-p-ブロモベンジルグルタチオンシクロペンチルジエステル（BBGC）の添加により糖化ストレスを負荷した。10 mM BBGC の存在下で 1 週間の糖化ストレス負荷を行い、フォルスコリン刺激によってリズムをリセットした後、リアルタイム発光検出システム（浜松ホトニクス）を用いてルシフェラーゼの発光リズムを計測した［1］。

2. マウスにおける睡眠や活動リズムに対する糖化ストレスの影響

6 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本エスエルシー）を回転かご付きケージ（メルクエスト社製）にて 4 週間の馴化飼育を行った。その後、1%MGO（ナカライテスク）を 8 ヶ月間飲水投与した。活動リズムの測定には回転かごケージを使い、睡眠脳波の測定には、プライムテック社の無線式の脳波測定装置を用いて、マウスが自由に活動できる状態にて連続測定を行った。脳波の解析については既報に従って行った［2］。

3. ショウジョウバエの睡眠や活動リズムに対する糖化ストレスの影響

羽化後 0 日齢～11 日齢の *Drosophila melanogaster*（yellow white）を用いて、飼育温度は 25℃とし、5%スクロース寒天に 1 mM MGO を添加したものを自由に摂餌させることにより糖化ストレスを負荷した［3］。歩行リズムは、

Drosophila Activity Monitoring System（TriKinetics Inc, MA, USA）を用いて行い、5 分間以上の静止を睡眠と判断した［4］。

結果および考察

1. 神経培養細胞を用いた時計遺伝子の日周発現に対する糖化ストレスの影響

フォルスコリン刺激後の代表的な発光リズムを図 1 に示した。BBGC 処理により発光リズムの位相が後退しているものの、周期を計算すると 0.5 時間の短縮が認められた（図 2）。発光リズムの振幅については、BBGC 添加によって顕著に減少していることが示された（図 2）。

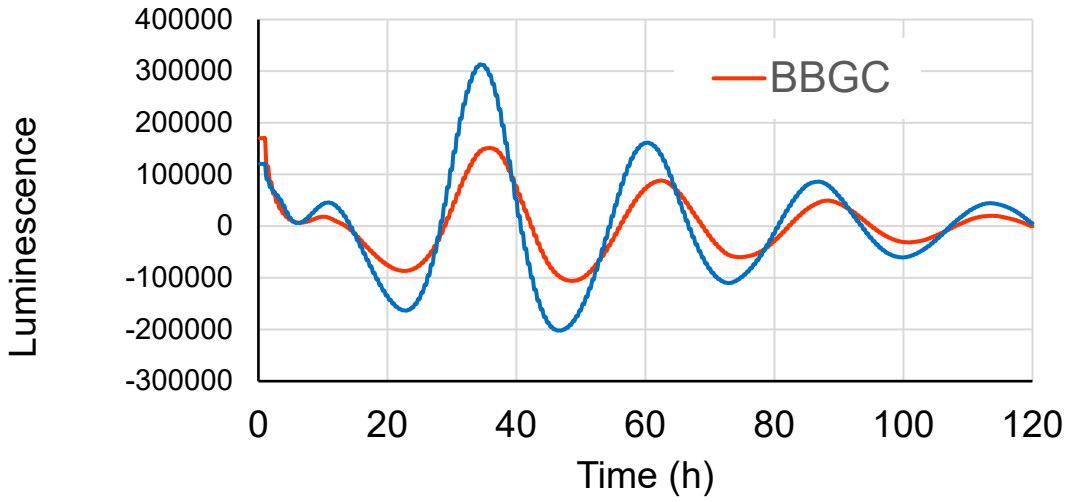


図 1. PER2::LUC 神経細胞の発光リズムに与える BBGC 添加の影響
PER2::LUC マウスの胎仔脳由来の神経細胞に対して 1 週間の BBGC 処理をした後にフォルスコリンで刺激し、発光リズムを計測した。各群の平均値をグラフに表した（n=4）。

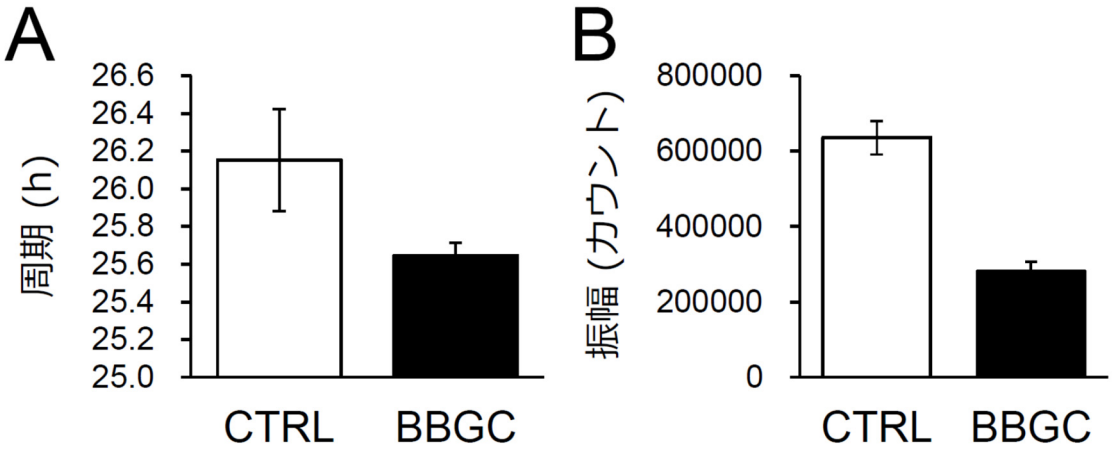


図 2. PER2::LUC 神経細胞の発光周期と振幅に与える BBGC 添加の影響
A） 4 日間の発光計測データから、周期を計測した（n=4、平均±標準誤差）。
B） 4 日間の発光計測データから、周期を計測した（n=4、平均±標準誤差）。

2. マウスにおける睡眠や活動リズムに対する糖化ストレスの影響

8ヶ月間のMGO投与後の活動リズムと睡眠覚醒リズムを図3に示した。活動期である暗期において、特に前半の活動量がMGO投与群において顕著に低下した（図3A）。暗期前半の覚醒時間は大きく影響を受けていないことから（図3B）、今回見られた活動量の減少は、覚醒レベルの低下によるものではないと考えられる。一方、非活動期（明期）前半においては、MGO投与によって覚醒時間が増加し（図3B）、レム睡眠時間（図3C）及びノンレム睡眠時間（図3D）が顕著に減少していることから、入眠が障害を受けている可能性が考えられた。今後は内在性の体内時計への影響を調べるための恒暗条件下での活動リズムの測定や、時計遺伝子発現に対する影響などを評価する必要があるものと考えられる。

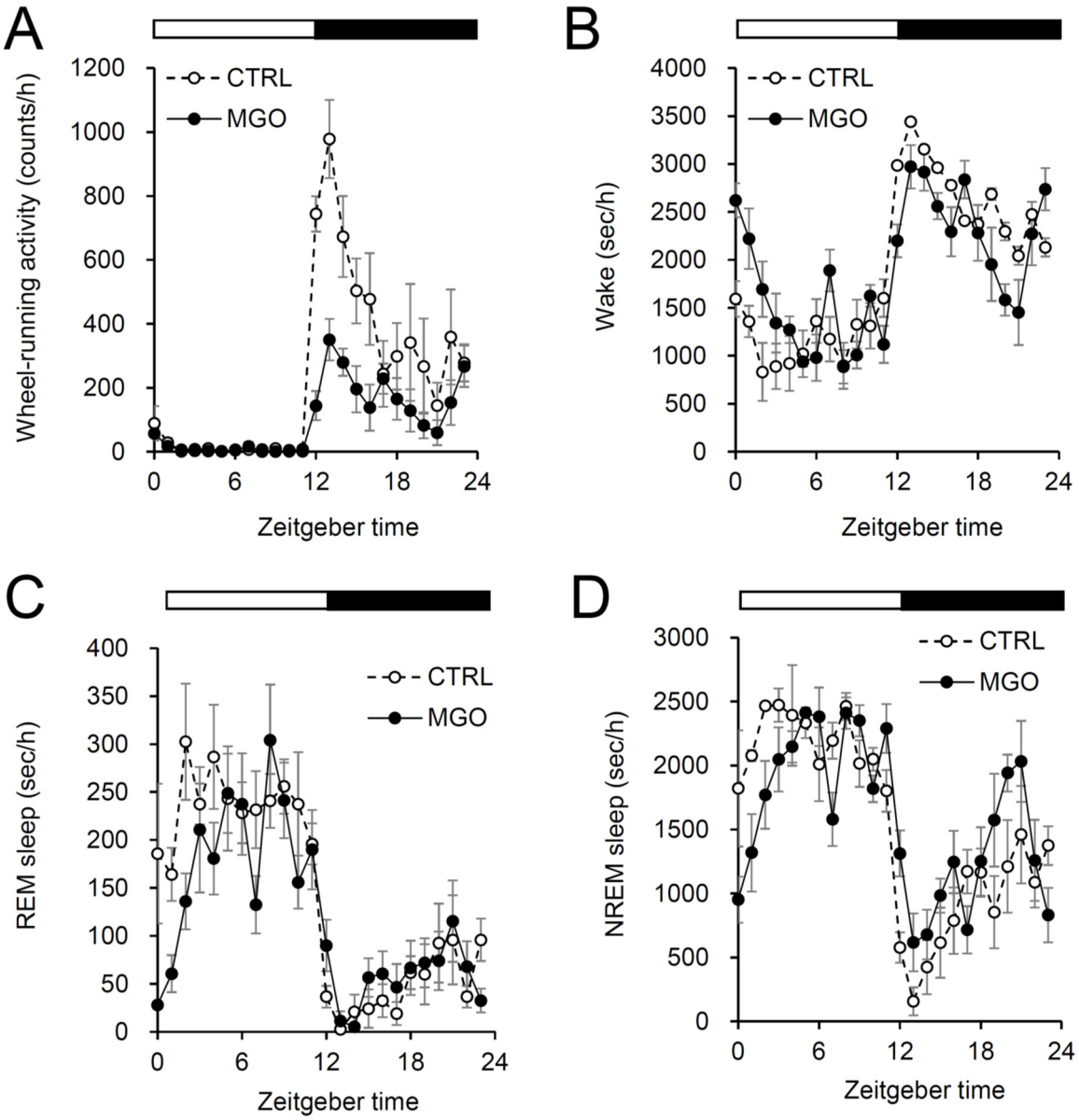


図3. 慢性的なMGOの投与がマウスの活動リズム及び睡眠覚醒リズムに与える影響

A) 回転かご運動の日内リズム（CTRL：n=4、MGO：n=5、平均±標準誤差）。

B) 覚醒時間の日内リズム（CTRL：n=4;、MGO：n=5、平均±標準誤差）。

C) レム睡眠時間の日内リズム（CTRL：n=4、MGO：n=5、平均±標準誤差）。

D) ノンレム睡眠時間の日内リズム（CTRL：n=4、MGO：n=5、平均±標準誤差）。

白いバーが明期、黒いバーが暗期を示す。

3. ショウジョウバエの睡眠や活動リズムに対する糖化ストレスの影響

ショウジョウバエの歩行活動リズムおよび睡眠リズムに与える MGO 投与の影響を図 4 に示した。歩行活動リズムに関しては、活動期（明期）前半の活動量が増加傾向を示した（図 4A）。睡眠リズムに関しては、明期中盤にかけての睡眠回数の増加の位相や、その後の睡眠回数の減少の位相がともに後退しており、暗期終盤の睡眠回数の減少の位相も後退していることから、1 日を通した位相後退の傾向が認められた（図 4B）。このことは、内在性の体内時計の周期が延長している可能性を示すものと考えられたが、恒暗条件下にて歩行活動リズムを調べた結果、フリーラン周期の延長は認められなかった（データ未掲載）。また、MGO 投与によって明期後半の活動量の増加（イブニングピーク）には影響が認められなかった一方で、同じ時間帯において一定程度の睡眠も認められており、結果的に MGO 投与群においては、睡眠がほとんど認められない時間帯が消失していた（1 日を通して睡眠が観察された）。ショウジョウバエにおいては、体内時計のリセットのための光受容を全身で行っていることが知られており［5］、光感受性に対する MGO の影響なども調べる必要があるものと考えられる。

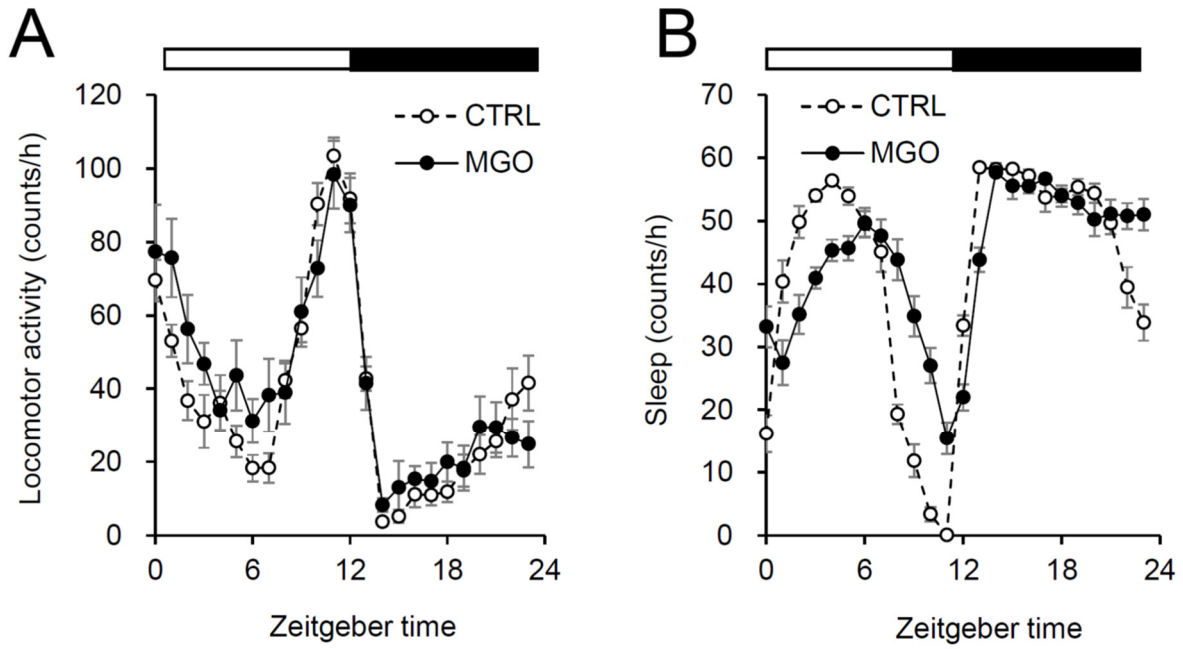


図 4. MGO の投与がショウジョウバエの歩行活動リズム及び睡眠リズムに与える影響

A） ショウジョウバエの歩行活動リズム（n＝16、平均±標準誤差）。

B） ショウジョウバエの睡眠リズム（n＝16、平均±標準誤差）。

白いバーが明期、黒いバーが暗期を示す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院農学研究科生産・環境生物学専攻応用生物学領域講座の霜田政美教授である。

文　献

1） Kondoh D, Yamamoto S, Tomita T, Miyazaki K, Itoh N, Yasumoto Y, Oike H, Doi R, Oishi K. Harmine lengthens circadian period of the mammalian molecular clock in the suprachiasmatic nucleus. Biol Pharm Bull. 2014;37(8):1422-7. PMID: 25087965 DOI: 10.1248/bpb.b14-00229

2) Okauchi H, Higo-Yamamoto S, Sowa T, Oike H, Yamamoto S, Wada N, Sakamoto K, Oishi K. Chronically skipping breakfast impairs hippocampal memory-related gene expression and memory function accompanied by reduced wakefulness and body temperature in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Mar 26;524(1):129-134. PMID: 31980181 DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.01.077

3) Barnett BM, Muñoz ER. Genetic damage induced by methylglyoxal and methylglyoxal plus X-rays in *Drosophila melanogaster* germinal cells. Mutat Res. 1998 Oct 12;421(1):37-43. PMID: 9748492 DOI: 10.1016/s0027-5107(98)00152-3

4) Cirelli C, Bushey D. Sleep and wakefulness in Drosophila melanogaster. Ann N Y Acad Sci. 2008;1129:323-9. PMID: 18591491 DOI: 10.1196/annals.1417.017

5) Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. Independent photoreceptive circadian clocks throughout Drosophila. Science. 1997 Nov 28;278(5343):1632-5. PMID: 9374465 DOI: 10.1126/science.278.5343.1632