

カルニチン欠損と疲労病態

佐伯武頼、李孟賢、堀内正久、吉田剛一郎、小林圭子
鹿児島大学医学部生化学第1講座

(1) 要約

慢性疲労患者の血清アシルカルニチンの低下が報告され、カルニチンと疲労の関連が示唆された。本研究では、カルニチンの細胞膜輸送タンパク質の欠損に基づくJVS (juvenile visceral steatosis) マウスが絶食によって自発行動低下、摂食量の減少を起こすことから、これを疲労モデルとしてその発症機構の解明を行っている。朝(8:00)から食餌を除くこと(絶食)によって、夜間の行動量がJVSマウス(j/j)では減少することが観察される。しかし、ヘテロ接合体(+j)や野生型(wt)では見られず、摂食状態と変わらない。JVSマウスの絶食による行動低下はカルニチン投与によって回復するが、カルニチンを含まない食餌の投与によっても回復することから直接カルニチンの有無によって起こるのではない。カルニチンを必要としない中鎖脂肪酸からなる中性脂肪(MCT)の投与は、MCTが代謝され、ケトン体産生が増し、酸素消費が高まるにもかかわらず、行動量を増すことができなかった。グルコースや蔗糖では行動の多い個体と少ない個体が存在した。JVSマウスを絶食にすると低体温になるが、グルコースやMCTの投与によって体温は上昇する。しかし行動量は増加しない。JVSマウスの絶食中の肝臓および脳のエネルギー充足率またはATP/ADP比が低下するような傾向は見られなかった。また、血漿ASTならびにALTがJVSマウスの48時間の絶食によって上昇するが、行動量減少は絶食開始5時間(15:00からの絶食によって20:00-23:00の行動量が低下する)から見られることから、行動量低下は肝障害によるのではない。脳内c-Fos発現の検索からNucleus pontisにおいて絶食によって発現低下が起こることが判明した。しかしカルニチン投与によって行動量が回復する条件下でもc-Fos発現は増加しなかった。また、食餌摂取量もJVSマウスにおいては特異な変化を来すことから、外側視床下部のorexin(+)細胞におけるc-Fos発現を検討した結果、絶食によって、orexin neuronにおけるc-Fos発現は対照マウスでは増加するにもかかわらず、JVSマウスでは低下することが判明した。このことはJVSマウスの絶食による疲労様症状(行動量減少、食欲減退)は中枢性・神経性の要因によって生じている可能性が高いことを示す。現在カルニチンの効果を検討しているが、orexin neuronにおけるc-Fos発現は行動量と相関があるが、食欲とは相関しない可能性が示唆されている。

一方、長鎖脂肪酸代謝の律速酵素であるcarnitine palmitoyltransferase Iの阻害剤であるmethyl palmoxirate (MP)を通常のマウスに投与することによって、JVSマウスと同様な、絶食による自発行動減少モデルが作成できることを示した。この結果は、絶食による行動量低下はカルニチン欠乏に特異的ではなく、脂肪酸代謝障害全般に見られる現象と考えられ、長鎖脂肪酸代謝障害が行動量低下の主因であることを示唆している。

(2) 研究目的

本研究の目的は、カルニチン欠損がいわゆる疲労状態を引き起こすかどうか、その病態、さらにその分子機構を明らかにすることである。そのために、カルニチン細胞膜輸送タンパク質(Octn2)欠損マウス(Juvenile visceral steatosis; JVSマウス)を用いて、エネルギー代謝、心肥大発症機構、行動・摂食異常の病態およびその神経系活動との関連を分子レベルで追求するものである。

(2) 研究方法

動物 - JVSマウスのヘテロ接合体(+/-)同士のmatingによって野生型(+/+;wt)、ヘテロ接合体、およびJVS (j/j) マウスを得た。また、ヘテロ接合体メスとJVSマウスオスのmatingによって得たヘテロ接合体とJVSマウスも使用した。実験には生後58-80日令のマウスを使用した。通常は、症状を出さないヘテロ接合体を対照マウスとした。食餌はCE2 (日本クレア) を使用し、必要に応じ (通常は8:00に)、食餌を取り去り絶食とした。明暗サイクルは、7時から19時の12時間サイクルで行った。恒温室を使用し、室温の管理を行った。

測定 - 自発行動量は、直径48cmの大型円形ケージを使用し、ケージ側面に取り付けられた3箇所のビーム発生装置と光センサーを用い、ビームを横切る回数をカウントして行動量とした。48時間、または20:00から23:00の3時間の行動量を測定した。行動量測定後、ネブタール麻酔下採血し、血漿中のグルコース(血糖)、遊離脂肪酸 (FFA)、ケトン体濃度、AST、ALTなどを測定した。

酸素消費量およびRQ (respiratory quotient)の測定は、メタボリックケージと総合呼気分析装置(ARCO 1000A)を用いて行った。直腸温はサーミスタデジタル温度計(Digital thermometer D411; TAKARA THERMISTOR INSTRUMENTS CO. LTD)を用いて測定した。

肝臓内adenine nucleotideは以下の方法で抽出し測定した。ketamine (100mg/kg bw)麻酔下、開腹し、肝臓をfreeze-clamp法によって採取し、液体窒素下に粉末化し、6N perchloric acidを加え、ホモゲナイズした。遠心上清を5N KOHを用い、中和後、HPLCを用いて定量した。脳adenine nucleotideについては、microwave (5KW, 1.5 sec)を用いて脳を処理後、肝臓と同様にperchloric acidで抽出し、測定した。

免疫組織化学は、灌流固定後、脳の切片を作成し、c-FosとOrexinの抗体を用いてPAP法によって染色した。

(3) 研究成果と考察

JVSマウスを絶食にすることによって、以下の異常行動が出現する。 JVSマウスの摂食時自発行動は、wtならびにヘテロ接合体と変わらないが、絶食にすると通常行動する夜間の行動が両対照群に比べ著しく低下する (図1)、 絶食による自発行動量減少はカルニチンの投与によって解消するが、カルニチンを含まない合成食投与によっても行動量は回復するのでカルニチン自体が欠損していることによる効果ではない、 行動量と血糖値、ならびに血漿脂肪酸濃度(FFA)の相関は、血糖値とは正の相関を、FFAとは負の相関を示すが、必ずしも相関係数は高くなく、両因子とも決定因子とは考えにくい、 カルニチンを必要とせずに代謝される中鎖脂肪酸からなる中性脂肪(MCT)の胃チューブによる投与でも行動量を増加させることができなかつた、 行動を増加することができないMCT投与によって熱発生があり、体温が上昇する (エネルギー代謝)、 肝内ならびに脳内adenine nucleotideレベルの変化は摂食量と関連する、 脳内c-Fosの発現変化ならびにorexin neuronにおけるc-Fos発現に変化を生じる、 カルニチン投与後の臓器内カルニチン濃度変化は主に肝臓のみに取り込まれ、心臓や骨格筋には取り込まれない、 Carnitine palmitoyltransferase (CPT-I)阻害剤であるMethyl palmoxirate (MP)投与によって異常行動モデルマウスが作成できる (次項)。

以下、データを示す。

(ア) 食餌摂取と自発行動量の変化

マウスなどげっ歯類は、日中は少なく、夜間行動が増加する行動パターンをとる。その行動パターンはJVSマウスも変わらず、摂食時には、wt、ヘテロ接合体、JVSマ

ウスともに48時間の行動量に有意差はなかった。しかし、朝8:00に食餌を除去した場合（絶食状態）の48時間の行動量はJVSマウスにおいてのみ著しく減少した。

（イ）絶食時間の効果

JVS マウスの減少した行動量に対する絶食時間の影響を検討した。朝8:00に食餌を取り去り、行動量の多い20:00から23:00までの行動量（総絶食時間；15時間、測定までの絶食時間；12時間）を測定したが、食餌を取り去る時刻を15:00（総絶食時間；8時間、測定までの絶食時間；5時間）では8:00からの絶食と変わらず、行動量は少なかった。しかし、17:00からの絶食（総絶食時間；6時間、測定までの絶食時間；3時間）では摂食JVSマウスと変わらない行動量を示した。以上の結果は、自発行動低下を起こす、何らかのクリティカルな時間がある可能性を示唆している。

（ウ）カルニチン投与ならびに食餌成分等の効果

絶食時の行動量減少に対するカルニチンの効果を検討した。カルニチンを8:00と20:00の2回投与することによってJVSマウスの行動量は著しく増加した。ヘテロ接合体ではカルニチン投与によって有意に行動量が増加した。その原因は現在のところ不明である。カルニチンを含まない合成食をJVSマウスに投与した場合の行動量は摂食時と変わらないことから、行動量を規定する因子はカルニチン自体ではないと考えられる。食餌成分として、まず、sucrose（角砂糖）の効果を検討した。朝8:00に通常の食餌を取り去り、角砂糖をケージ内においた。そのJVSマウスの行動は摂食時と変わらなかった。続いてカルニチン欠乏マウスでも代謝可能である中鎖脂肪酸を成分とするtriglyceride (MCT)を胃チューブを用い、投与した。投与時間は、12:00、16:00、20:00の3回に分け、トータルカロリーは角砂糖摂取量と同じ（3.2-3.8 Kcal）とした。中に行動量が多い個体が存在したが、平均としてMCT投与群は絶食群とほぼ変わらなかった。そこでsucroseを溶液として胃チューブで投与した結果、行動量はばらつきがあり、2群に別れたが、行動量が多い個体が多かった。Glucoseについてもチューブ投与を試みたが、同様にばらつきがあり、多くの個体はむしろ行動量が少ない個体が多かった。

（エ）行動量と体温の関係

一般に絶食によって体温が低下する[1, 2]ことが知られている。特にJVSマウスのようなカルニチン欠乏の場合は、長鎖脂肪酸が利用できないために、低体温になる可能性がある。事実、絶食したJVSマウスの48時間行動量は 4950 ± 1500 で、48時間後の8:00の直腸温は、 28.0 ± 1.4 であった。これに対して、カルニチンを投与したJVSマウスの行動量は多く、 12000 ± 3190 で、直腸温は 31.3 ± 2.1 であった。そこで、代謝活性を、酸素消費および直腸温の観点から検討した。

絶食で生食投与群に比べ、glucose投与群も、MCT投与群も酸素消費は増加した。Glucose投与の場合は投与直後2時間の酸素消費が増加しその後低下するパターンを示し、3回投与のため3峰となった。一方、MCT投与は徐々に酸素消費が増加し、生食投与群より一定の高いレベルを保った。また、RQは、glucose投与後に上昇し、糖質代謝のパターンを示したのに対し、MCT投与後は、RQが低下し、脂質を代謝していることを証明した。さらに体温は行動量測定の前23:00の時点で、生食群、 32.0 ± 2.0 (n=4)、カルニチン群、 36.1 ± 1.1 (n=4)、MCT群、 35.5 ± 0.7 (n=8)、行動量が少ないglucose液群、 36.9 ± 0.9 (n=4)、であった。以上の結果は、絶食によって体温が低下し、行動量が減少するが、glucoseやMCT投与で熱産生を増加させても行動量は必ずしも増加しないことを示す。

（オ）肝障害の出現と行動異常

JVSマウスの長期の絶食によって血漿中のASTおよびALTが上昇することを見出し

た。しかしながら、両トランスアミナーゼが上昇するのは絶食48時間経過した時点であり、行動異常が生じる絶食後12時間の時点では上昇しないことから絶食による自発行動量低下は肝障害などによるものではないと考えられる。

(カ) 肝内および脳内adenine nucleotideレベル

絶食がエネルギー低下を起こすことによって自発行動量が減少する可能性を検討した。絶食による行動量に変化がない対照マウスではATPの低下、および若干のenergy chargeの低下が見られたが、JVSマウスでは逆にATPの増加、energy chargeの増加が見られた。脳においては、対照マウスでは変化がないが、JVSマウスではATPおよびenergy chargeの増加が見られた。脂肪酸代謝阻害剤投与後の摂食量の増加には肝臓のエネルギー充足率energy charge、又はATP/ADP比の低下が関与すると報告されているので、対照マウスのエネルギー充足率の低下は摂食量の増大と関連したものであるかもしれない。逆にJVSマウスのエネルギー充足率の上昇は満腹感、又は食欲不振を示す指標かもしれない。少なくとも肝臓および脳のエネルギー状態が悪化しているようなことはない、と考えられる。

(キ) 脳内c-Fosの発現変化

脳内のc-Fosは神経活動の指標として使われている。そこで対照マウスとJVSマウスについて摂食時と絶食時の脳内c-Fos発現を検討した。JVSマウスのNucleus pontisにおいて、摂食時と絶食時に有意の差が見出せた。JVSマウスの絶食時には他に比べ、約1/4にc-Fosの発現が低下していた。このことは絶食JVSマウスの行動量低下を反映するものと推定される。しかしながら、カルニチン投与はN. pontisのc-Fos発現を上昇させなかった。その原因については不明である。

つづいて、特異的な機能を持つ神経細胞でのc-Fos発現の変化を検討する目的で、Orexinを分泌するorexin neuronにおけるc-Fos発現を二重染色法で検討した(図2)。その結果、絶食によって、対照マウスのorexin neuronの中でc-Fosを発現する細胞の率(c-Fos発現率)は明らかに上昇したが、JVSマウスでは逆に低下した。Orexinは覚醒、食欲、行動など多くの行動に関与するneuropeptideであるので、JVSマウスにおける絶食の、行動量と食欲にorexin neuronの関与、すなわち中枢神経系の関与を示唆するものである。

絶食JVSマウスをカルニチンで治療した結果は、まだ十分な検討が出来ていないが、若干複雑である。c-Fos発現を検査する時間を21:00-22:00で行うと、明らかにc-Fos発現orexin neuronの率は上昇し、対照マウスのレベルに達した。しかし、翌朝の9:00-10:00に検査した結果は、c-Fos陽性細胞の率は低く、無処置絶食JVSマウスのレベルと変わらなかった。この結果は、カルニチンが再摂食時の摂食量には効果があることから、orexinのシグナルは食欲には関連がないことを示唆するものかもしれない。今後さらに検討を加えたい。

(ク) 投与されたカルニチンの消長

JVSマウスにおいてカルニチン投与は非常に大きな効果を示す。絶食による自発行動量減少に対しても、行動量の増加だけでなく、1回投与で36時間後の行動量も維持できるなどの効果も見出している。そこで、腹腔内へのカルニチン(5 $\mu\text{mol}/\text{head}$; 0.42 $\mu\text{mol}/\text{g BW}$)1回投与後の血中、臓器内のカルニチン濃度変化を検討した。その結果を列挙する。検討した臓器(肝臓、脳、心臓、精巣、骨格筋、血液)の内、血液および肝臓への取り込みが顕著であり、肝中の1時間値はヘテロ接合体マウスのレベルにまで達した。しかし、他の臓器への取り込みは少なくヘテロ接合体のレベルまで達したものはなかった。特に、脳内には有意の取り込みは認められなかった。肝

臓内のtotal、およびfree carnitineレベルは4時間まで有意に、またshort acylcarnitineは8時間まで有意に0時間より高かった。しかしそれ以降は0時間のレベルと変わりがなかった。精巢のカルニチンレベルはtotal carnitineで8時間まで、free carnitineで12時間まで0時間より高く、比較的長時間維持されていた。検討した臓器では、いずれも24時間後では0時間のレベルに復帰していた。以上の結果から、カルニチンは、JVSマウス肝臓においては取り込まれることによって直接長鎖脂肪酸の分解促進に働く。しかしそれ以外の臓器では濃度が大きくは増加せず、長鎖脂肪酸の分解を促進しているとは考えにくい。このことから、肝臓での脂肪酸代謝促進の結果として、FFAの低下、血糖値の維持などを介して長期の効果を発揮するのではないかと考えられる。

(ケ) CPT-I阻害剤である MP投与による異常行動モデルマウスの作成とその性状

MPは特異的、不可逆性の強力なCPT-I阻害剤として知られている。カルニチン欠乏JVSマウスの異常行動が主に長鎖脂肪酸代謝異常に起因するのかどうか、またカルニチン欠乏以外で同様の疲労様モデルが作成できるかどうかを検討する目的で、野生型C3HマウスにMP投与を行い、行動量を測定した。MPをメチルセルロースに懸濁し、10mg/kg量を胃チューブによって8:00および20:00に経口投与した。対照としたメチルセルロース投与マウスに比べ、MP投与マウスでは、食餌を除いた1日目には若干の行動が観察されたが、2日目にはほとんど行動が見られなくなった。このことはCPT-I阻害剤で長鎖脂肪酸の代謝を抑制してもカルニチン欠乏マウスと同様に絶食によって行動量が減少することが明らかとなり、両動物モデルの行動異常をきたす機構は同様のものであることが推定される。

引用文献

- [1] Swiergiel AH: Decrease in body temperature and locomotor activity as an adaptational response in piglets exposed to cold on restricted feeding. *Physiol Behav* 40, 117-125 (1987).
- [2] Oda T, Crawshaw LI, Yoshida K, Su L, Hosono T, Shida O, Sakurada S, Fukuda Y, & Kanosue K: Effects of food deprivation on daily changes in body temperature and behavioral thermoregulation in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 278, R134-R139 (2000).
- [3] Tutwiler GF, Ho W, & Mohrebacher RJ: 2-Tetradecylglycidic acid. In *Methods in Enzymology*, Vol 72, 533-551 (1981).
- [4] Friedman MI, Harris RB, Ji H, Ramirez I, & Tordoff MG: Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol* 276, R1046-R1053 (1999).
- [5] Kiorpes TC, Hoerr D, Ho W, Weaner LE, Inman MG & Tutwiler GF: Identification of 2-tetradecylglycidate (methyl palmoixirate) and its characterization as an irreversible, active-site directed inhibitor of carnitine palmitoyltransferase A in isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 259, 9750-9755 (1984).