

# 脂質代謝系を介した新たな摂食制御機構の解明 —脳内摂食中枢におけるケトン体利用効率の影響について—

森 浩 子

京都府立医科大学大学院 総合医療医学教育学 助教

## 諸 言

国内では肥満防止と肥満解消のために、カロリー制限とともに脂肪の摂取を制限する食事指導の取り組みがなされている。脂質を摂りすぎると肥満になりやすく、コレステロールが高くなり血管系疾患の原因となり得るという説に基づいているようであるが、近年の研究によって脂質の摂取が肥満や血管系疾患の原因ではないことが明らかになっている。脂質が肥満の原因であるとの説は1960年代から米国を中心に広がったが、実はその後1971～2000に行われた全米健康調査(NHANES)によって脂肪の摂取が肥満の原因であるという見解が誤っていたことが示されている(MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2004)。調査期間中の約30年間にわたって全米をあげて脂肪の摂取比率を減らす努力の結果、逆に肥満率が倍増したことが報告された(脂質を制限した結果、糖質の摂取割合が増えていた)。それ以来、欧米諸国では肥満や生活習慣病の主要因は糖質の過剰摂取であることが認識され<sup>1,2)</sup>、低脂肪高炭水化物食による従来の栄養指導の問題点や今後の栄養指導の指針に関する議論が高まっている。ここ数年では脂質摂取の重要性の見直しがなされており、脂肪の摂取を控えるよりも、糖質の摂取を控えた食事に減量効果があることが解明されている<sup>3,4)</sup>。糖質を制限し脂質代謝が亢進した身体状態では末梢の脂肪組織から脂肪酸遊離が亢進しエネルギー源として効率よく消費されるからである。さらに糖質を過剰摂取しない状態であれば、積極的な脂質摂取は血中コレステロール値を正常化し、心血管疾患、癌、冠静脈疾患のリスクを上昇させないことも明らかとなった<sup>4,5)</sup>。健康に害をもたらすイメージを抱きがちな脂質であるが、脂質は必須栄養素であり、細胞膜を構成しコレステロールやステロイドホルモン等の生理活性物質の原料となる重要な物質である。現代の生活では精製炭水化物や糖類を多く含む食品が大量に消費され、現代人は糖質の過剰摂取の状態にある。日本国内においても、糖質の過

剰摂取に警鐘を促し、脂質を中心とした代謝系の安全性と重要性を見直す必要がある。先に述べたように、積極的な脂質の摂取による肥満の改善とその安全性は全身レベルで確認されている。糖質摂取を制限し、かつ脂質を積極的に摂取している場合には、脳はケトン体をエネルギー源として利用している。ケトン体とは肝細胞によって脂肪酸から生合成されるエネルギー基質であり、血中ケトン体は全身に分配され、ミトコンドリア内における酸化リン酸化を経てATPが取り出され、全身組織のエネルギー源として使用されている<sup>6)</sup>。脳には血液脳関門が存在する為、脂肪酸やアミノ酸などの高分子化合物は脳内に到達することができないが、ケトン体は脳内に移行できるエネルギー基質である。このときケトン体は、グルコースが枯渇した栄養状況下において脳が必要とするエネルギー量の3分の2から4分の3を供給するとされているが、脳の各領域によってこのケトン体の利用効率に違いがあるのかは分かっていない。本研究では、脳内でのケトン体利用の実態を明らかにするために、免疫組織化学染色法によってケトン体からのエネルギー産生に関わるCoA転移酵素(succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase: SCOT)の詳細な分布を調べ、マッピングを行った。

## 実験方法

### 1 サンプルング

実験動物は、SD系ラット(雄10週齢)およびC57BL/6マウス(雄10週齢)を使用した。ラットおよびマウスは清水実験材料より購入し、12時間の明暗サイクル、室温22度±2℃にセットしたケージ内で1週間飼育し、実験に使用した。ラットおよびマウスに2% isofluraneによる麻酔を導入し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳を取り出し一週間25%ショ糖液に浸析し保存した。保存した脳を取り出し、クライオスタットで冠状断脳切片(40µm)を作成し、サンプルと

した。なお、本研究における実験動物の取り扱い、京都府立医科大学実験動物承認委員会の承認を受け実施した。

## 2 免疫組織化学染色法

ラットおよびマウスの脳内の SCOT の分布を調べるために、脳の連続スライスを用いて SCOT に対する免疫組織化学染色を行った (160 $\mu$ m おきに 40 $\mu$ m 切片を回収し解析に使用した)。一次抗体として HPA012047 (anti-OXCT1, SIGMA)、ビオチン二次抗体および酵素標識抗体としてヒストファイン SAB-PO (R) キット (ニチレイ) を使用し、DAB で発色させた。また、隣接する切片にたいして Nissl 染色を行った。Nissl 染色液には Cresyl Violet を用いた。蛍光二重免疫組織化学染色では、一次抗体として HPA012047 および G3893 (mouse anti-GFAP, SIGMA) を使用、二次抗体として Alexa Fluor 488 goat-rabbit IgG (Molecular Probes, Inc.)、Alexa Fluor 546 goat-mouse IgG (Molecular Probes, Inc.) を使用した。各切片はスライドガラスにマウントし永久切片とし観察に用いた。

## 3 観察、分布の解析およびブレインマップ作成

脳の連続スライス切片は、デジタルカメラ付き顕微鏡 DN-107T (AS TOOL) で撮影・画像取り込みを行った。取り込んだ画像は Photoshop (Adobe Systems) 上でトリミングした後、測定範囲を 0.1 mm<sup>2</sup> と定め、陽性細胞数をカウントした。SCOT 陽性細胞の分布の密度は、Nissl 染色陽性の細胞数に対する SCOT 陽性細胞の割合で示し、その値に応じてスコア化した。マッピングにあたっては、SCOT 陽性細胞の分布域を示すとともに、各領域における SCOT 陽性細胞の密度に応じて色付けをした。マッピング作業での画像処理には Photoshop を用いた。各脳領域の用語については、Paxinos らによる “The mouse brain”<sup>7)</sup> を参照した。蛍光観察には LSM 700 (Carl Zeiss) を使用した。

## 結 果

### ラット脳内における SCOT 免疫陽性細胞の分布

ラット (SD系、雄10週齢) の脳内の SCOT 免疫陽性細胞の分布を表1に示す。SCOT 免疫陽性細胞は大脳皮質の一次運動野 (primary motor nucleus)、体性感覚皮質 (somatosensory cortex)、聴覚皮質 (auditory cortex)、視覚皮質 (visual cortex)、帯状皮質 (cingulate cortex)、

表1 ラット脳各領域における SCOT 免疫陽性反応

Region	Density
Cerebral cortex	
Primary motor nucleus	+++
Somatosensory cortex	+++
Auditory cortex	+++
Visual cortex	++
Cingulate cortex	+++
Agranular nucleus	++++
Retrosplenial cortex	++++
Perirhinal cortex	+++
Piriform cortex	+++
Hippocampal formation	
CA1 field of Ammon's horn	++
CA2 field of Ammon's horn	++
CA3 field of Ammon's horn	+++
Dentate gyrus	++
Septum	
Lateral septal nucleus	++
Medial septal nucleus	++
Nucleus of diagonal band	-
Basal ganglia	
Nucleus accumbens	-
Caudate putamen	-
Olfactory tubercle	-
Globus pallidus ext.	-
Globus pallidus int.	-
Island of Calleja	-
Substantia innominata	-
Subthalamic nucleus	-
Amygdala	
Medial amygdala dorsal	+++
Medial amygdala ventral	+++
Cortical amygdala	++
Central amygdala medial	+++
Central amygdala lateral	+++
Basolateral amygdala	++++
Thalamus	
Dorsolateral geniculate nucleus	+++
Ventral posterolateral nucleus	+++
Ventral posteromedial nucleus	++
Posterior nuclear group	-
Ventrolateral nucleus	++
Ventromedial nucleus	++
Mediodorsal nucleus	++++
Anterodorsal nucleus	+++
Anterovernal nucleus	-
Anteromedial nucleus	+++
Lateral posterior nucleus	+++
Laterodorsal nucleus	+++
Paraventricular nucleus	++
Paratenial nucleus	+++
Intermediodorsal nucleus	++++
Central nucleus	+++
Central medial nucleus	+++
Paracentral nucleus	+++
Parafascicular nucleus	-
Reuniens nucleus	-
Rhomboid nucleus	-

表 1 ラット脳の各領域における SCOT 免疫陽性反応 (続き)

Region	Density
Hypothalamus	
Periventricular nucleus	-
Vascular organ of lamira terminals	++
Medial Preoptic nucleus	++
Anteroventral periventricular nucleus	++
Medial preoptic area	+++
Medial Preoptic nucleus	++
Parastrial nucleus	++
Lateral preoptic nucleus	+++
Magnocellular preoptic nucleus	++
Ventrolateral preoptic nucleus	++
Suprachiasmatic nucleus	-
Anterior hypothalamic area	-
Anterior Area anterior part	-
Anterior Area central part	-
Anterior Area posterior part	-
Lateral hypothalamic area	++
Supraoptic nucleus	+++
Arcuate nucleus	+++
Ventromedial nucleus	++
Dorsomedial nucleus	++
Medial tuberal nucleus	++
Magnocellular nucleus	++
Posterior hypothalamic area	++
Mammillary body	
Premammillary nucleus	-
Medial mammillary nucleus	-
Lateral mammillary nucleus	-
Supramammillary nucleus	++

ラット脳の領域ごとの SCOT 免疫陽性細胞の密度を示す。0.1mm<sup>2</sup> 内のニッスル染色陽性細胞に対する SCOT 免疫陽性細胞の割合 (%) で算出し、割合に応じてスコア化した。-: 陰性、±: < 10、+: 10 - 25 %、++: 26-50%、+++ : 51-75%、++++: > 75%

無顆粒島皮質 (agranular nucleus)、膨大後部皮質 (retrosplenial cortex) および大脳辺縁系皮質の嗅周皮質 (perirhinal cortex)、梨状皮質 (piriform cortex) に高密度に分布していた。400倍で観察したところ、皮質領域ではとくに錐体細胞層においてSCOTの強い陽性反応が見られた (図1)。海馬領域では、CA1、CA2、CA3の錐体細胞層においてSCOT免疫陽性細胞が存在していたほか、歯状回 (dentate gyrus) でも陽性反応が見られた (図2)。その他、扁桃体 (amygdala) の広範囲や視床および視床下部にもSCOT陽性細胞の分布が認められた。全身のエネルギー代謝や摂食パターンの調整において中心的役割を果たす視床下部腹内側核、背側核、弓状核周辺においてもSCOT免疫陽性細胞が多数存在していた。一方大脳基底核および乳頭体のほとんどの領域では、SCOT陽性細胞が見られなかった。これらの観察結果をもとに作成した、ラット脳内のSCOT陽性細胞分布の模式図を図3に示す。また、SCOT陽性細胞がアストロサイトグリアではない事を確認するために、蛍光二重免疫組織化学染色法によって、SCOT免疫陽性反応とGFAP (Glial fibrillary acidic protein: グリア細胞線維性酸性タンパク質) 免疫陽性反応の共存を調べた (図4)。その結果、ラット脳内のSCOTとGFAPの共存は見られなかったことから、SCOT陽性細胞はアストロサイトグリアではないとの結論を得た。

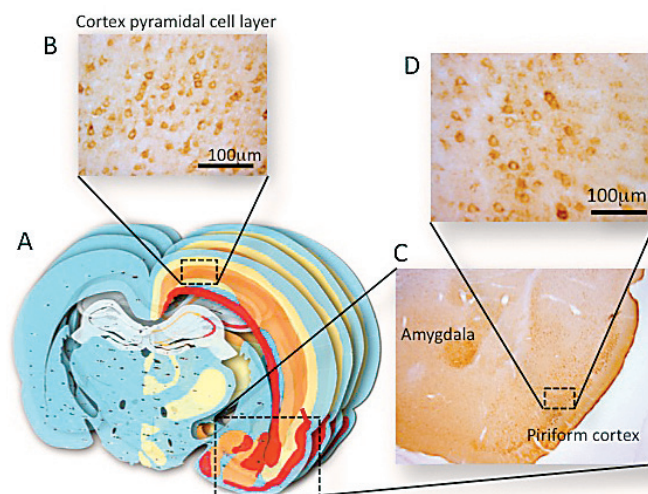


図 1 ラット脳での SCOT 免疫組織化学染色像

A: SCOT 免疫陽性細胞の分布図 B: 大脳皮質領域の錐体細胞層に著しい SCOT 免疫陽性反応が確認できる (×400) C: 扁桃体および梨状皮質にみられる SCOT 免疫陽性反応 (×400) D: 梨状皮質の錐体細胞層の SCOT 免疫陽性細胞 (×400)

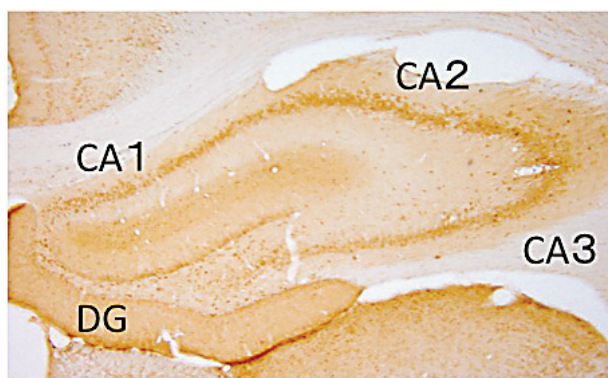


図 2 ラット海馬領域における SCOT 免疫組織化学染色像

ラット海馬領域においても SCOT 免疫陽性反応が確認できる。CA1, CA2 および CA3 の錐体細胞層が SCOT 免疫陽性である。一方網状分子層、放射層などでは SCOT 免疫陽性反応はみられない (×100)。

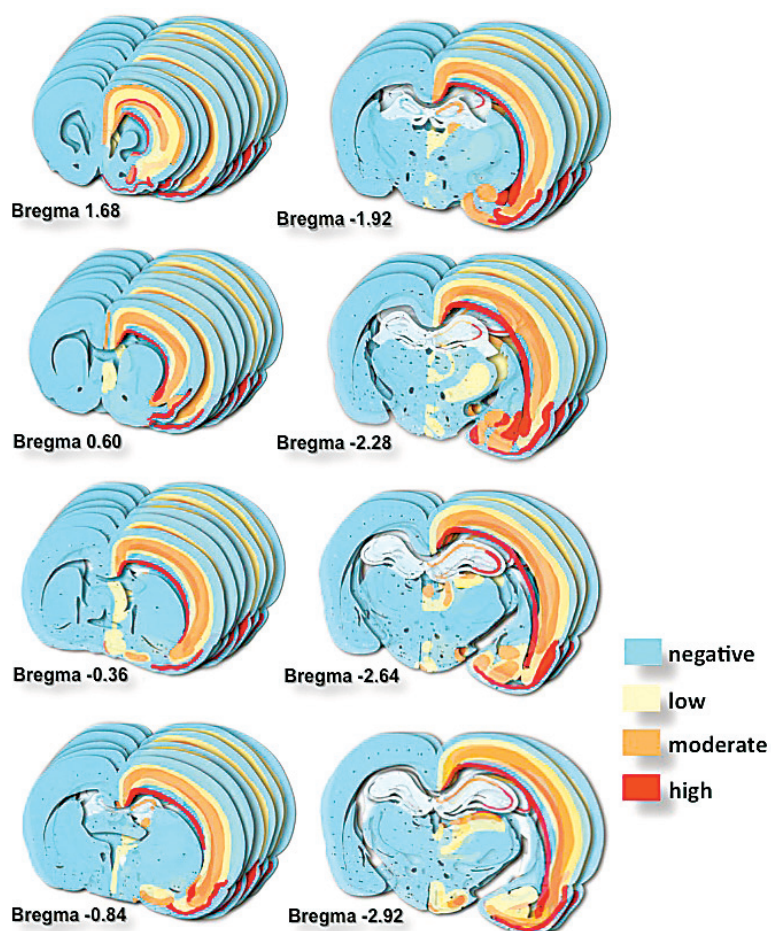


図 3 SCOT のマッピング (ラット脳模式図)

ラット脳内の SCOT の分布域を表した模式図。Bregma1.68 ~-2.92 の範囲内を示す。SCOT の免疫組織化学染色像の染色強度を目視でグレード付けした。SCOT 免疫陽性細胞が分布している脳領域ではケトン体の利用効率が高いと考えられる。SCOT 免疫陽性細胞は皮質領域および大脳辺縁系の一部に集中している一方、大脳基底核などではあまり存在していない。全身のエネルギー代謝や摂食パターンの中樞制御を行っている視床下部腹内側核、背側核、弓状核周辺においても SCOT 免疫陽性細胞が多数存在している。

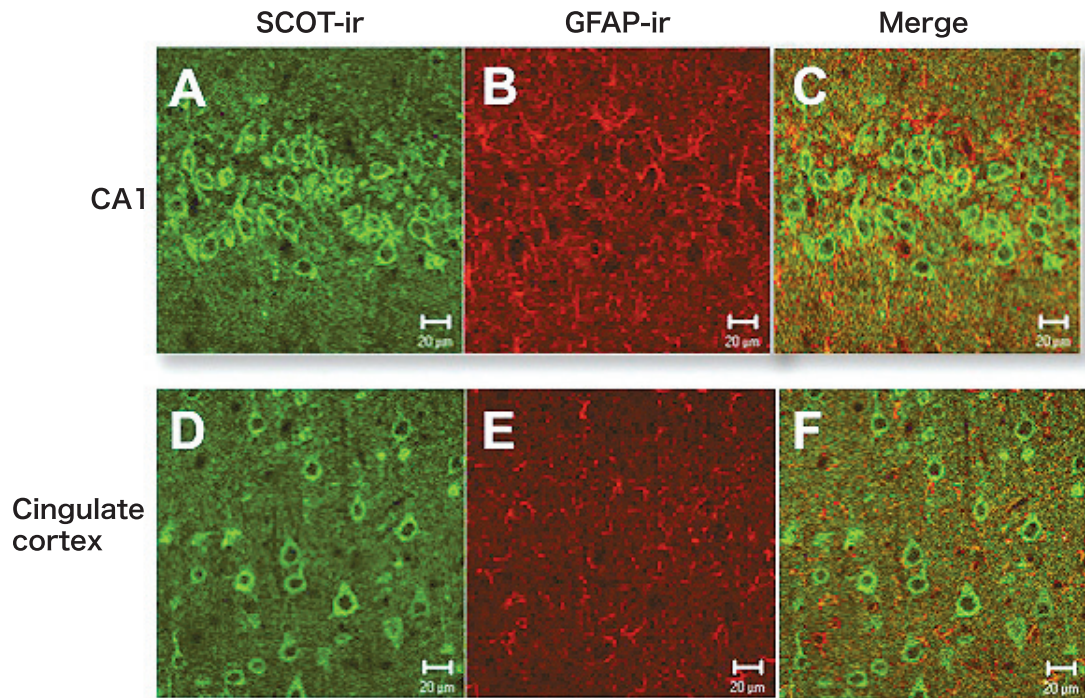


図4 SCOTとGFAPの二重染色像（ラット脳）

ラット脳におけるSCOTとGFAPの二重染色像（共焦点レーザー顕微鏡による観察）。SCOT免疫陽性細胞は、アストロサイトグリアのマーカであるGFAPを発現していない。CA1：海馬アモン角1、Cingulate cortex：歯状回。

#### マウス脳内におけるSCOT免疫陽性細胞の分布

マウス（C57BL/6、雄10週齢）の脳内のSCOT免疫陽性細胞の分布を表2に示す。SCOT免疫陽性細胞は大脳皮質の一次運動野（primary motor nucleus）、体性感覚皮質（somatosensory cortex）、聴覚皮質（auditory cortex）、視覚皮質（visual cortex）、帯状皮質（cingulate cortex）および大脳辺縁系皮質の嗅周皮質（perirhinal cortex）と梨状皮質（piriform cortex）に高密度に分布していた。海馬領域では、CA1、CA2、CA3の錐体細胞層においてSCOT免疫陽性細胞が存在していたほか、歯状回（dentate gyrus）でも陽性反応が見られた。扁桃体（amygdala）の広範囲や視床および視床下部にもSCOT陽性細胞の分布が認められたが、ラットに比べてマウスでは、これらの領域におけるSCOT免疫陽性反応が少ない傾向が見受けられた。

#### 考 察

糖を経口摂取している状況下では、脳は糖を主なエネルギー源として活動しているが、睡眠時、空腹時あるいは短期～長期飢餓時には脳はケトン体を主なエネルギー源へとシフトして活動することが知られている。この時ケ

トン体は、グルコースが枯渇した栄養状況下において脳が必要とするエネルギー量の3分の2から4分の3を供給すると言われているが、脳の各領域によってこのケトン体の利用効率に違いがあるのかは分かっていない。

本研究では、ケトン体利用酵素であるSCOTに対する免疫組織化学染色法を用いて、ラット及びマウスの脳内でのケトン体利用部位の詳細なマッピングを行った。その結果、脳内におけるケトン体利用酵素、SCOTの発現量には領域特異性があることが分かった。ラット、マウス共にSCOTは大脳皮質および大脳辺縁系皮質に広く分布しており、とりわけ錐体細胞層において顕著であった。海馬領域においても錐体細胞で著しいSCOT免疫陽性反応を確認した。一方大脳基底核、外側膝状核、視床核（外側腹側核、内側腹側核、後外側腹側核、後内腹側核等）には免疫陽性細胞が見られなかった。SCOTの分布が領域ごとに異なる、あるいは細胞種によって異なることから、エネルギー代謝におけるケトン体への趣向性が脳領域で異なると考えられた。SCOT免疫陽性反応が確認できた皮質、海馬領域や大脳辺縁系の扁桃体は記憶や高次脳機能の維持に必要な脳領域であることから、これらの脳部位での神経活動における脂質系エネルギー基

表 2 マウス脳の各領域における SCOT 免疫陽性反応

Region	Density	Region	Density
Cerebral cortex		Hypothalamus	
Primary motor cortex	+++	Periventricular nucleus	-
Somatosensory cortex	+++	Vascular organ of lamina terminals	-
Auditory cortex	+++	Medial Preoptic nucleus	++
Visual cortex	+++	Anteroventral periventricular nucleus	+
Cingulate cortex	+++	Medial preoptic area	++
Agranular nucleus	-	Medial Preoptic nucleus	++
Retrosplenial cortex	-	Parastrial nucleus	++
Perirhinal cortex	+++	Lateral preoptic nucleus	-
Piriform cortex	++	Magnocellular preoptic nucleus	++
Hippocampal formation		Ventrolateral preoptic nucleus	++
CA1 field of Ammon's horn	++	Suprachiasmatic nucleus	-
CA2 field of Ammon's horn	++	Anterior hypothalamic area	-
CA3 field of Ammon's horn	+++	Anterior Area anterior part	-
Dentate gyrus	++	Anterior Area central part	-
Septum		Anterior Area posterior part	-
Lateral septal nucleus	+++	Lateral hypothalamic area	+++
Medial septal nucleus	++	Supraoptic nucleus	++
Nucleus of diagonal band	-	Arcuate nucleus	+++
Basal ganglia		Ventromedial nucleus	++
Nucleus accumbens	-	Dorsomedial nucleus	++
Caudate putamen	-	Medial tuberal nucleus	+++
Olfactory tubercle	-	Magnocellular nucleus	++
Globus pallidus ext.	-	Posterior hypothalamic area	++
Globus pallidus int.	-	Mammillary body	
Island of Calleja	-	Premammillary nucleus	-
Substantia innominata	-	Medial mammillary nucleus	-
Subthalamic nucleus	-	Lateral mammillary nucleus	-
Amygdala		Supramammillary nucleus	++
Medial amygdala dorsal	++		
Medial amygdala ventral	++		
Cortical amygdala	++		
Central amygdala medial	+++		
Central amygdala lateral	++		
Basolateral amygdala	++++		
Thalamus			
Dorsolateral geniculate nucleus	+++		
Ventral posterolateral nucleus	++		
Ventral posteromedial nucleus	++++		
Posterior nuclear group	+++		
Ventrolateral nucleus	++		
Ventromedial nucleus	-		
Mediodorsal nucleus	+++		
Anterodorsal nucleus	++		
Anteroventral nucleus	++		
Anteromedial nucleus	++		
Lateral posterior nucleus	-		
Laterodorsal nucleus	-		
Paraventricular nucleus	+++		
Paratenial nucleus	++++		
Intermediodorsal nucleus	+++		
Central nucleus	+++		
Central medial nucleus	-		
Paracentral nucleus	++		
Parafascicular nucleus	-		
Reuniens nucleus	-		
Rhomboid nucleus	-		

ラット脳の領域ごとの SCOT 免疫陽性細胞の密度を示す。0.1 mm<sup>2</sup>内のニッスル染色陽性細胞に対する SCOT 免疫陽性細胞の割合 (%) で算出し、割合に応じてスコア化した。-: 陰性、±: < 10、+: 10 - 25%、++: 26-50%、+++: 51-75%、++++: > 75%

質の重要性が推察された。また、全身のエネルギー代謝や摂食行動制御に関わる視床下部内腹側核、背側核や弓状核にも SCOT 免疫陽性細胞が多数存在しており、これら調節機構におけるケトン体利用の関与の可能性を見出した。一方、本研究で SCOT 免疫反応陰性であった脳領域では、グルコースが枯渇した状況下でもケトン体は利用せず、肝臓での糖新生で得たグルコースあるいは、アストロサイトグリアでの解糖系を経て獲得した乳酸のいずれかを利用して活動している可能性があり、これらの領域におけるエネルギー基質の選択については今後のさらなる研究が必要である。ケトン体は神経細胞の栄養源であるだけでなく、神経保護作用を発揮し、神経ネットワークの維持に関与しているとの報告がある<sup>8)</sup>。実際全脳の 60% 以上は脂質で構成されており、全身の中でも特に脂質と親和性のある組織であることから、脳内における脂質代謝系の重要性に注目すべきである。本研究

によって、ケトン体利用に関わる部位が推定され、脳内の脂質系エネルギー基質の利用に関する形態学的識見を得た。現在、通常の給餌パターン（普通食自由摂取）で飼育した動物のみならず、絶食時や糖質制限高脂肪食給餌時における脳のエネルギー代謝の様相を観察し、その機能面への理解を深めるために研究を継続中である。

## 謝 辞

本研究にご支援賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝申し上げます。また、本研究遂行にあたり、ケトン体代謝研究に対する貴重なご助言、ご助力をいただきました江部洋一郎先生、江部康二先生、ならびに実験動物の飼育・管理にご協力いただきました技官の皆様へ深く感謝いたします。なお、本研究で得られた成果につきましては、現在論文を執筆・投稿準備中であることを申し添えます。

## 文 献

- 1) S. Sharma, L.S. Roberts, R.H. Lustig and S.E. Fleming, Carbohydrate intake and cardiometabolic risk factors in high BMI African American children, *Nutrition & metabolism* 7 (2010) , p. 10.
- 2) M. Hession, C. Rolland, U. Kulkarni, A. Wise and J. Broom, Systematic review of randomized controlled trials

of low-carbohydrate vs. low-fat/low-calorie diets in the management of obesity and its comorbidities, *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 10 (2009) , pp. 36-50.

- 3) I. Shai, D. Schwarzfuchs, Y. Henkin, et al., Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet, *The New England journal of medicine* 359 (2008) , pp. 229-241.

- 4) B.V. Howard, J.E. Manson, M.L. Stefanick, et al., Low-fat dietary pattern and weight change over 7 years: the Women's Health Initiative Dietary Modification Trial, *JAMA : the journal of the American Medical Association* 295 (2006) , pp. 39-49.

- 5) T.L. Halton, W.C. Willett, S. Liu, et al., Low-carbohydrate-diet score and the risk of coronary heart disease in women, *The New England journal of medicine* 355 (2006) , pp. 1991-2002.

- 6) G.F. Cahill, Jr., Fuel metabolism in starvation, *Annual review of nutrition* 26 (2006) , pp. 1-22.

- 7) K.B.J.F. George Paxinos, *The mouse brain*, Academic Press (1982) .

- 8) Y. Kashiwaya, T. Takeshima, N. Mori, K. Nakashima, K. Clarke and R.L. Veech, D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000) , pp. 5440-5444.