

論文の内容の要旨

論文題目 アミノ酸グリシンによる睡眠改善効果の作用機序解明
氏 名 河 合 信 宏

【序論】

不眠症は罹患頻度の高い代表的な睡眠障害の一つであり、入眠困難・中途覚醒・早朝覚醒・熟眠困難のいずれかの不眠症状を有する。不眠症は、長期欠勤や医療費の増加、生産性の低下、産業事故の増加など、様々な人的および社会経済的損失をもたらすことが明らかとなっており、公衆衛生上の大きな課題の一つとなっている。

治療の一環として睡眠導入剤が処方されるが、その主流は抑制性神経伝達物質であるγアミノ酪酸 (GABA) のイオンチャネル型受容体の一つ、GABA_A 受容体を介したベンゾジアゼピン系・非ベンゾジアゼピン系の薬剤であるが、これらは徐波睡眠量を減少させる。また、運動障害・記憶障害・依存性などの有害作用を誘発し、鎮静の持越し効果や反跳性不眠等も問題となっている。これらの有害作用を持たない新たな作用機序の睡眠導入剤、もしくは、不眠症状が重症化する前に摂取できる、安全で効果的な食品成分が求められている。

グリシンは最も簡単な構造を持つアミノ酸であり、脳内にて抑制性神経伝達物質としてグリシン受容体 (GlyR) に、興奮性神経伝達調節物質として NMDA 受容体 (NMDAR) に作用することが知られている。近年、我々はグリシン経口摂取によって睡眠に不満を持つヒトの睡眠が改善されることを発見した。しかし、なぜグリシン摂取により睡眠が改善するか、更には、経口摂取したグリシンがどのような体内動態を示すかも不明であった。

本研究は、グリシンの睡眠改善効果をラット睡眠妨害モデルで検証すること、経口摂取したグリシンの体内動態を明らかにすること、更に睡眠改善効果の作用機序を解明することを目的とした。

【本論】

① ラット睡眠妨害モデルの構築とグリシン経口投与によるラットノンレム睡眠増加作用の検証

自由行動条件下でラット脳波及び深部体温を測定するための手技を施し、通常ラットが休息している明期に通常の睡眠を妨害する新奇環境下に置くことで、睡眠妨害モデルを構築した。この条件下で水またはグリシン 2g/kg を経口投与したところ、投与 0-90 分間でグリシン投与群は水投与群に比べ有意に覚醒時間が減少し、ノンレム睡眠時間が増加した。更に、投与後 90 分間でノンレム睡眠に移行する回数、一エピソードあたりのノンレム睡眠時間は有意に増加し、ノンレム睡眠潜時は有意に短縮した。興味深いことに、睡眠妨害条件下でラットの深部体温は上昇するが、この深部体温上昇はグリシン投与群で投与 20-90 分後に有意に抑制された。深部体温の低下は睡眠に先立ちみられる自然睡眠のプロセスとされている。

以上の結果から、ラットはグリシンの睡眠改善効果の作用機序を解明するモデル動物として有用であることが示唆された。

② 経口投与グリシンの体内動態

グリシンの体内動態を明らかにするため、オートラジオグラフィーを用いて放射性同位体標識 ^{14}C グリシンをラットに尾静脈投与した際の体内および脳内分布を調べた。尾静脈投与 6 分後、 ^{14}C グリシンは速やかに肝臓及び脾臓に分布した。脳組織中では、 ^{14}C グリシンは松果体・脳下垂体・脳室周囲器官・脳室部位に速やかに集積した。血中に分布したグリシンは末梢組織のみならず血液脳関門を通過した上で脳脊髄液及び一部脳実質にも移行することが示された。

詳細なタイムコースを明らかにするため、ラットにグリシン 2 g/kg を経口投与し、投与後 5 分から 24 時間までの血中・脳脊髄液中・脳実質中のグリシン濃度及び関連アミノ酸濃度の推移を観察した。グリシンは経口投与後速やかに血中濃度が上昇し、30 分後に最大濃度を示した。脳脊髄液中のグリシン濃度は血中と同様のタイムコースで最大濃度を示した。脳実質内グリシン濃度は血中・脳脊髄液中に比べ緩やかな濃度推移を示し、投与 4 時間後に最大濃度を示した。一方、グリシンから一段階の酵素変換で生成されるアミノ酸セリンの濃度は、血中では投与 2 時間後に最大、脳脊髄液中で 8 時間後に最大、脳実質中で 8 時間後に最大、と何れもグリシンに比べ緩やかであった。また、グリシン・セリンいずれも投与 24 時間後にはベースラインに戻った。また、グリシン 2g/kg 経口投与後の脳脊髄液中グリシン濃度は、NMDAR の ED_{50} より高く、GlyR の ED_{50} より低い値で推移した。

これらの結果から、グリシンの睡眠改善作用の主成分はグリシンそのものであり、その作用は脳脊髄液中もしくは脳中へのグリシンの分布を介すること、その作用点は GlyR よりも NMDAR の可能性が高いことが示された。

③ グリシンは脳内の NMDA 受容体を介し表面血流量増加作用を示す

深部体温低下の原因は熱放散増加と仮説を立て、ラットの主な熱放散部位である足底部の表面

血流量をレーザードップラー法により測定した結果、グリシン 2 g/kg 経口投与 30-45 分後の表面血流量は水投与群に比べ有意に増加した。更に、作用点は脳中であると仮説を立て、脳室内に薬物投与可能なカニューレを事前留置し、グリシンを脳室内投与したところ、経口投与時と同等の表面血流量の増加が認められた。NMDAR グリシン結合部位アゴニストの単独脳室内投与で、グリシン投与時と同等の表面血流量増加作用が見られた。さらに、GlyR アンタゴニストで、NMDAR アンタゴニスト、NMDAR グリシン結合部位アンタゴニストをグリシンと共に脳室内投与したところ、グリシンの表面血流量増加作用は GlyR アンタゴニストでは抑制されず、NMDAR 関連アンタゴニストにより抑制された。

以上の結果から、ラットに対するグリシンの睡眠改善作用は表面血流量増加による熱放散の増加が主たる原因であると考え、更にそれが脳内の NMDA 受容体を介することが示唆された。

④ 免疫組織化学染色および脳内直接投与法によるグリシン作用部位の同定

中枢の睡眠関連部位は主に視床下部に集中している。これまでの結果から、主に体内時計を司る部位とされる視交叉上核・体温調節を司る部位とされる内側視索前野・その他の脳室周囲器官を対象を絞り、暗期活動中のラットに対し、水もしくはグリシンを投与した 30 分後に脳組織を摘出、固定し、c-Fos に対する免疫組織化学染色を行った。その結果、グリシン経口投与により視交叉上核と内側視索前野中の c-Fos 発現細胞数が増加した。

グリシンの直接の作用部位は視交叉上核もしくは内側視索前野であると仮説を立て、両部位にカニューレを留置する手技を施した後にグリシンを微量投与したところ、視交叉上核にグリシンを投与した場合にのみ表面血流増加作用が認められた。更に、NMDAR グリシン結合部位特異的アンタゴニストを共に投与したところ、この表面血流増加作用は消失した。

これらの結果から、グリシンは視交叉上核の NMDAR を直接の作用点とし、内側視索前野への投射を介して表面血流量を増加させ、その結果深部体温が速やかに低下し、睡眠改善作用が発現することが示唆された。

⑤ 視交叉上核破壊によりグリシンのノンレム睡眠増加作用・深部体温低下作用は消失する

グリシンは視交叉上核の NMDAR の調節を介し、表面血流を増加させ、深部体温低下・ノンレム睡眠量を増加させることが示唆された。これを追認するため、視交叉上核に電極を刺し、熱破壊を行うことにより、グリシン経口投与の影響が消失するか否かを検討した。視交叉上核を熱破壊したところ、グリシン経口投与によるノンレム睡眠量の増加作用、ノンレム睡眠のエピソード数増加作用、一エピソードあたりのノンレム睡眠時間の増加作用、ノンレム睡眠潜時の短縮作用、深部体温の低下作用はいずれも消失した。

この結果から、グリシンは視交叉上核を介して深部体温低下作用・睡眠改善作用を示すことが強く示唆された。

⑥ その他のグリシンの睡眠関連因子に対する影響の検討

グリシンは松果体に集積することから、松果体で合成される睡眠関連物質の一つであるメラトニンに対する影響が考えられた。そこで、ラットにグリシン 2 g/kg を経口投与した後の血中メラトニン濃度をラジオイムノアッセイ法により測定したが、明期・暗期共にグリシン投与による有意な変化は見られなかった。

また、グリシン経口投与が視交叉上核内の時計遺伝子及び機能調節ペプチドの mRNA 発現に与える影響が考えられた。そこで、RT-PCR 法によりこれらの mRNA 発現量を測定したところ、時計遺伝子 *Per2*, *Bmal1* mRNA 発現量はグリシン投与による影響は見られなかったが、*VIP*, *AVP* mRNA 発現量はグリシン投与により明期に有意に増加した。この結果は、グリシンが視交叉上核を介して明期に深部体温低下作用・睡眠改善作用を示すことと合致している。

【総括】

食成分の一つであるアミノ酸グリシンを経口投与することにより、脳脊髄液中及び脳中のグリシン濃度が上昇することが確認された。このグリシン濃度上昇下に於いて、視交叉上核の NMDAR を介する表面血流増加作用に伴う深部体温低下が起こること、その結果、ラット睡眠妨害モデルに対する睡眠改善効果が示されることが示唆された。

本研究は、アミノ酸の一つであるグリシンを摂取した際に中枢神経系に及ぼす生理作用を初めて示したと共に、自然な眠りのプロセスとされる表面血流増加・深部体温低下・ノンレム睡眠量増加を包括して確認した初めての研究である。これまでの睡眠導入剤の主作用部位である GABA_A 受容体を介した抑制性神経伝達の増強ではなく、NMDAR を介した興奮性神経伝達を正に調節することでラット睡眠妨害モデルの睡眠を改善させることは興味深い。今後の不眠症治療の新たな戦略として期待される。