

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12767

研究課題名(和文) 情動の概日変動メカニズムと情動障害改善の試み

研究課題名(英文) Circadian regulation of mouse anxiety-like behavior and trial of affective disorder improvement

研究代表者

清水 貴美子 (SHIMIZU, Kimiko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：50451828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：地球上のほぼすべての生物が概日時計を持ち、さまざまな生理機能が概日時計によってコントロールされている。近年になって体内時計の異常が情動に強く影響することが明らかになってきた。しかし体内時計が情動を制御するメカニズムは謎に包まれていた。我々は、マウスの不安様行動が一日の時刻によって変化し、この変化は前脳特異的な概日時計破壊によって消失することを見出した。さらに、概日時計の制御を受けて発現量の変化をするSCOP/PHLPP1 という分子が、扁桃体の中でも特に Basolateral amygdalaと呼ばれる脳部位において、不安の日内変化を制御する役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We characterized the time-of-day-dependent regulation of mouse anxiety-like behaviors. We show that anxiety-like behaviors are expressed in a circadian manner in mice and demonstrate that the clock machineries in the forebrain are required for the time-of-day-dependent regulation of anxiety-like behaviors. We identified SCOP/PHLPP1 as an essential intracellular signaling molecule mediating this temporal regulation downstream of the clock. Using viral-mediated, basolateral amygdala (BLA)-specific knockout of Scop, we demonstrate that deletion of Scop in the BLA exerts anxiolytic effects on the elevated plus maze at early subjective night, thereby blunting the circadian variation in the anxiety-like behavior. We conclude that the circadian expression of SCOP in the BLA plays a key role in generating circadian rhythmicity in the anxiety-like behavior. Our results demonstrate SCOP as a regulator of anxiety-like behaviors and reveal its key roles in the anxiogenic functions of the BLA.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：anxiety circadian basolateral amygdala SCOP PHLPP1 elevated plus maze open field test

1. 研究開始当初の背景

地球上のほぼすべての生物が概日時計と呼ばれる体内時計機能を持ち、様々な生理機能を環境の明暗周期に同調させ、コントロールしている。睡眠・覚醒のリズムやホルモン分泌リズムなどはよく知られた概日リズムであるが、近年、体内時計が哺乳類の記憶や情動などの高次脳機能に大きな影響を持つことが示唆されている。しかし、本当に概日時計が記憶や情動を制御するのか、するのであれば、どのようなメカニズムで制御しているのかはわかっていなかった。

2. 研究の目的

我々は、しばしば1日のうちの時刻により気分の違いを感じることもある。感情障害が生体リズム異常を伴うなど概日リズムと情動調節機能との間には機能連関があることが示唆されている。にもかかわらず、真に内因性の時計によって情動が調節されていることを示す証拠は乏しく、まして体内時計と情動を繋ぐための分子的知見はほとんど無い。本研究では、申請者が見いだした K-Ras 制御分子 SCOP (SCN circadian oscillatory protein) を手がかりとして、情動が日周変動するメカニズムの謎に迫る。概日リズムと情動調節とを繋ぐ神経連絡メカニズムおよび分子メカニズムを解明することにより情動障害、精神障害の発症メカニズムと治療の糸口をつかむ。

3. 研究の方法

(1) 不安様行動を測定するために、高架十字テストと open field テストを用いた。高架十字テストでは、十字に交差した壁のない通路 (Open arm) と壁のある通路 (closed arm) を高い位置に設置し、マウスを中央に置く。マウスは壁がある方が安心するため、通常 closed arm に入る割合が高い。不安様傾向が強いほど、open arm へ入る割合がより少なくなり、Open arm に出た割合 (open entries %) が高いほど、不安様傾向が低いと判断される。また、Open field テストでは壁で囲まれた広い空間 (open field) にマウスを置く。マウスは不安様傾向が高いと、壁から離れた中央部 (center) にはなかなか行かない。Center time が長いほど、不安様傾向が低いと判断される。

(2) 内在の概日時計による変化を検討する場合、少なくともテストの24時間前から環境の明暗サイクルを無くし、恒薄明 (4 Lux) 条件下で飼育・実験を行なった。

(3) 扁桃体を含む前脳の時計が機能しないマウスを不安様行動の概日変動解析に用いるため、Emx1^{cre/+} マウスと Bmal1 flox マウスの mating を行い、前脳特異的 Bmal1 ノックアウトマウス (Bmal1 cKO) を作成した。このマウスは扁桃体の垂核である Basolateral Amygdala (BLA) では時計が破壊されているが、扁桃体の別の垂核である Central Amygdala では時計が破壊されていない。扁桃

体以外では、海馬、大脳皮質、嗅球においても概日時計が機能していないと考えられる。また、同様に Emx1^{cre/+} マウスと SCOP flox マウスとの mating により、SCOP の前脳特異的ノックアウトマウス (Scop cKO) を作成した。(4) 扁桃体 BLA での SCOP の機能を明確にするため、Cre を発現する Adeno associated virus (AAV) を SCOP flox マウスの BLA に注入・感染させた (図1)。このマウスを BLA-specific SCOP knockout mouse (BLA-SCOP KO) とした。これらのマウスの不安様行動を測定することにより、BLA の SCOP が介する、不安様行動の概日制御機構を検討した。

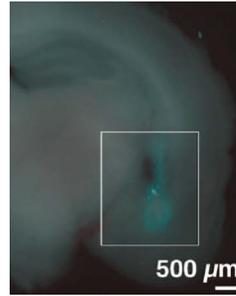


図1 Cre 発現 AAV の扁桃体 BLA への投与により、BLA にもみ感染が認められた。青く見える部分が感染した場所 BLA にあたる。

4. 研究成果

高架十字テストと open field テストの両方のテストにおいて、マウスの不安様行動に概日変動が見られた (図2)。この変動は、明

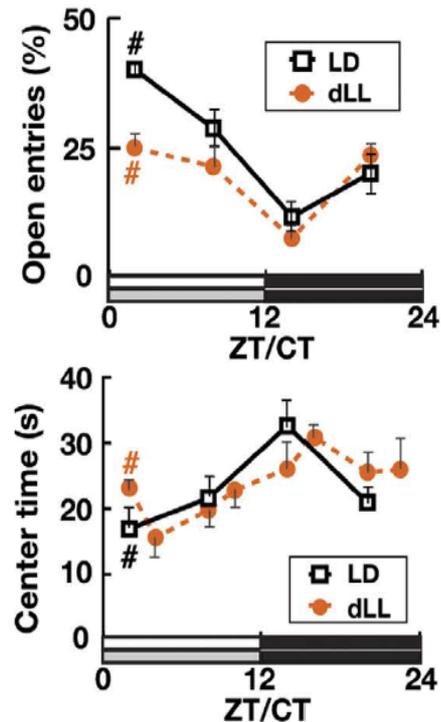


図2 不安様行動の日周変動

上:高架十字テストによる不安様行動の変動。下:Open field テストによる不安様行動の変動。ZT は明暗 (LD) 条件下で飼育した時の実験結果。ZT0-12 が明期、ZT12-24 が暗期。CT は恒薄明条件下 (dLL) で飼育・実験した結果。CT0-12 が主観的明期、CT12-24 が主観的暗期を示す。

暗条件下 (LD) だけでなく恒薄明条件下 (dLL) でも見られることから、不安様行動の変動は概日時計によりコントロールされていると考えられた。ただし、高架十字テストでは、不安のピーク時刻が (主観的) 夜のはじめ (ZT/CT14) に、open field テストではピーク時刻が (主観的) 昼のはじめ (ZT/CT2) になり、不安のピーク時刻が 12 時間異なる結果となっていた (図 2)。高架十字テストと Open field テストはどちらも不安の指標として一般的に用いられているテストであるが、それぞれのテストで異なる側面を観察していることが示された。

不安様行動の概日変動が、概日時計の制御下にあることの確認と、制御している脳部位の特定に向けて、前脳で概日時計が機能しない Bmal1 cKO マウスの不安様行動を測定した。

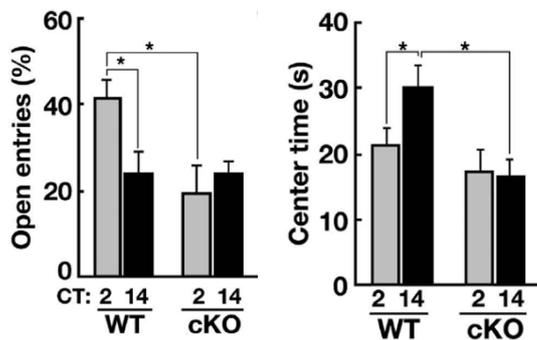


図 3 Bmal1 cKO における不安様行動の概日変化

左: 高架十字テストによる不安様行動。Bmal1 cKO では CT2 も 14 も、WT の不安傾向の高い時刻 (CT14) の値で一定になった。右: Open field テストによる不安様行動。Bmal1 cKO では CT2 も 14 も WT の不安傾向の高い時刻 (CT2) の値で一定になった。

Bmal1 cKO マウスではどちらのテストにおいても不安傾向が高い時刻の値で昼夜一定になった (図 3)。つまり前脳の概日時計が不安様行動の概日変動を生み出していると考えられた。

さらに、不安様行動の概日制御の分子メカニズムに迫るため、概日調節を受け、かつ高次脳機能への関与が明らかになっている分子 SCOP に着目した。前脳特異的に Scop を欠損させた Scop cKO では、どちらのテストでも、不安傾向が低い時刻の値で一定になった (図 4)。Bmal1 cKO マウスの BLA や海馬などにおいて、SCOP 量を検出したところ、Bmal1 がノックアウトされた部位では、SCOP はどの時刻でも過剰発現されていることが確認された。つまり、前脳において Bmal1 が発現しないと SCOP が過剰発現し、結果として不安傾向が上昇すると考えられた。さらに、BLA における SCOP の機能を明らかにするために、BLA-Scop KO を作成した (図 1)。このマウスを用いて高架十字テストを行うと、

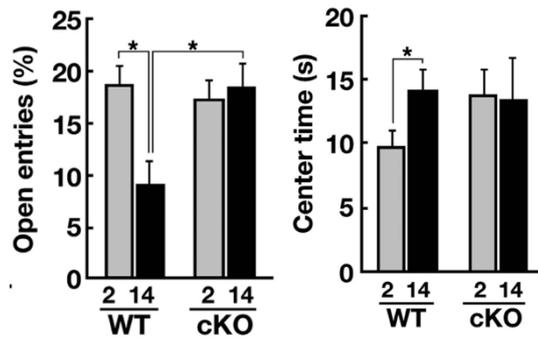


図 4 Scop cKO における不安様行動の概日変化

左: 高架十字テストによる不安様行動。Scop cKO では CT2 も 14 も、WT の不安傾向の低い時刻 (CT2) の値で一定になった。右: Open field テストによる不安様行動。Scop cKO では CT2 も 14 も WT の不安傾向の低い時刻 (CT2) の値で一定になった。

SCOP cKO と同様に不安傾向が低い時刻の値で一定になった (図 5 左)。しかし、open field テストでは、BLA-Scop KO マウスの不安様行動に変化は見られなかった (図 5 右)。Open field テストでみられる不安様行動において、BLA の SCOP の関与は低いと考えられた。

以上の実験を総合すると、BLA の SCOP は、高架十字テストで見られる不安様行動の概日変動を生み出すために必須であることが示された。Open field テストで見られる不安様行動の概日変動は、前脳の中の BLA 以外の部位にある概日時計が関わっていることが示唆された。

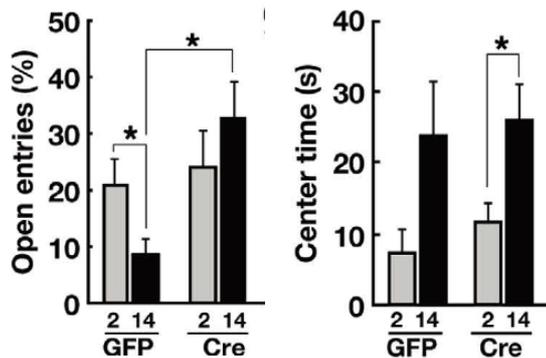


図 5 BLA-Scop KO における不安様行動の概日変化

左: 高架十字テストによる不安様行動。BLA-Scop KO (Cre) では CT2 も 14 も、コントロール (GFP) の不安傾向の低い時刻 (CT2) の値で一定になった。右: Open field テストによる不安様行動。BLA-Scop KO でもコントロールと同様に概日変化が観察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件) (全て査読有り)

(1) Jun Nakano, Kimiko Shimizu, Shigeki Shimba, Yoshitaka Fukada
SCOP/PHLPP1 β in the basolateral amygdala regulates circadian expression of mouse anxiety-like behavior. Scientific reports 6, 33500 doi:10.1038/srep33500 (2016)

(2) Kimiko Shimizu, Yodai Kobayashi, Erika Nakatsuji, Maya Yamazaki, Shigeki Shimba, Kenji Sakimura, Yoshitaka Fukada
SCOP/PHLPP1 β mediates circadian regulation of long-term recognition memory. Nature Communications 7, 12926 doi:10.1038/ncomms12926 (2016)

[学会発表] (計 6 件)

(1) 清水貴美子 Molecular mechanism of circadian regulation of recognition memory
第 94 回日本生理学会大会 シンポジウム [概日時計システムの脳内機構] (2017. 3. 28-30, アクトシティ浜松, 静岡県浜松市)

(2) 清水貴美子 長期記憶の概日リズムを生み出す分子メカニズム 第 39 回 日本分子生物学会 シンポジウム [環境適応戦略の神経基盤] (2016. 11. 30 - 12. 2, パシフィコ横浜, 神奈川県 横浜市)

(3) Kimiko Shimizu, Erika Nakatsuji, Yodai Kobayashi, and Yoshitaka Fukada
SCOP-dependent circadian regulation of memory formation for novel object. Society for Neuroscience annual meeting (2016. 11. 12-16, San Diego, CA, USA)

(4) 清水貴美子 Molecular mechanism of circadian regulation of memory for novel objects 第 89 回 日本生化学会 シンポジウム [環境ストレス応答と内部環境のサーカディアンリズム] (2016. 9. 25-27, 東北大学, 宮城県 仙台市)

(5) 清水貴美子 Molecular mechanism of circadian memory formation for object recognition
物体認識記憶の概日制御を担う分子メカニズム 第 22 回 時間生物学会 シンポジウム [生物時計活用戦略] (2015. 11. 21-22, 東京大学, 東京都 文京区)

(6) Kimiko Shimizu, Yodai Kobayashi, Erika Nakatsuji, and Yoshitaka Fukada
SCOP mediated circadian regulation of recognition memory. Society for Neuroscience annual meeting (2015. 10. 17-21, Chicago, IL, USA)

[その他]

(1) Media での掲載実績

① 2016 年 9 月 20 日 Yahoo News, Livedoor news 等の web news が「気分の浮き沈みは体内時計が制御～マウス不安様行動が一日の中で変化するメカニズム～」と紹介

② 2016 年 9 月 30 日 時事通信がプレスリリース記事配信 「体内時計、長期記憶に影響＝活動開始直後が効果的一東大」

③ 2016 年 10 月 1 日 日本経済新聞にプレスリリース記事掲載 「起床直後学習 記憶長く続く」

④ 2016 年 10 月 1 日 毎日新聞 「朝の勉強、記憶長続き 時間帯で差 東大研究」

⑤ 2016 年 10 月 1 日 朝日デジタル 「ヒトの記憶効率高まるのは午前？東大がマウスで実験」

⑥ 2016 年 10 月 3 日 日経産業新聞 「起きた直後記憶しやすく」

⑦ 2016 年 11 月 19 日 読売新聞

⑧ 2017 年 1 月 7 日 中日こどもウィークリー

(2) ホームページ

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/research-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 貴美子 (SHIMIZU, Kimiko)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：50451828

(2) 研究協力者

中野 純 (NAKANO, Jun)