

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19005

研究課題名(和文) 中枢概日時計のニューロンタイプ特異的な神経生理学的解析

研究課題名(英文) The neurophysiological analysis of neuronal type selective in the circadian clock

研究代表者

長谷川 恵美 (HASEGAWA, Emi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：40765955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：正常マウスとニューロンタイプ特異的変異マウスを用いて、中枢概日時計・視交叉上核(SCN)の脳スライスにおけるAVP(arginine vasopressin)産生ニューロン、VIP(vasoactive intestinal peptide)産生ニューロンの神経活動や電気生理学的特性およびその日内変動を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。本研究課題にて、SCN内の神経活動の日内変動にGABA受容体が大きく関与しているということを確認できた。また、GABA受容体の応答性に対するAVP産生ニューロン、VIP産生ニューロンの神経活動の変化は、それぞれ異なっており大変興味深い結果を得られた。

研究成果の概要(英文)：We have researched to clarify neuronal activity and electrophysiological characteristics, diurnal variation of AVP (arginine vasopressin) neurons, VIP (vasoactive intestinal peptide) neurons in the circadian clock / suprachiasmatic nucleus (SCN) by using the brain slice of normal mouse and neuron type specific mutant mouse. In this research project, we found that the GABA receptor is involved in the diurnal variation of neural activity in SCN. In addition, the change in neuronal activity by the responsiveness of GABA receptor was different depending on each neuron.

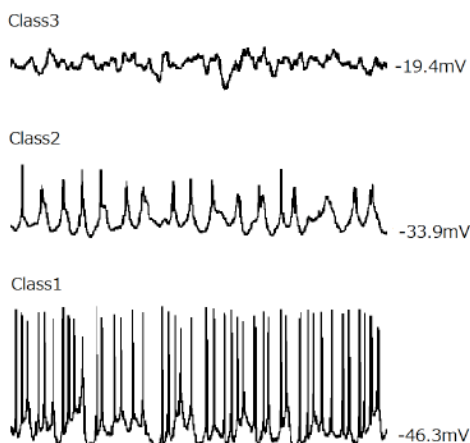
研究分野：神経科学

キーワード：中枢概日時計 視交叉上核(SCN) 電気生理学的特性 GABA受容体

1. 研究開始当初の背景

我々は、体内時計のリズムを持っているため、乱れると様々な疾患・健康障害が発症するリスクが高まることが知られている。しかしながら、**中枢概日時計の神経メカニズムの詳細は、ほとんど未解明のままである。**本研究課題にて、この神経メカニズムを解明できれば、生活習慣の乱れによって生じる健康障害に対する画期的な治療法や新薬の開発の提案につながるのではないかと考えた。

概日リズム中枢として知られている視床下部・視交叉上核 (SCN) は、強固で安定した概日リズムを発振している。SCN の各細胞内で概日リズムを刻む時計遺伝子を中心とした分子メカニズムについては、ほぼ解明されている。しかしながら、多数・多様な種類のニューロンから構成されている SCN 内におけるニューロンネットワークの作動メカニズムは未解明である。SCN の一部は特定の神経ペプチドを発現しているが、ほぼ全てのニューロンは GABA 作動性である。背内側に分布する AVP (arginine vasopressin) 産生ニューロンと腹側部に分布する VIP (vasoactive intestinal peptide) 産生ニューロンがあり、SCN 内にて主要なニューロンタイプの 2 つである。VIP は、SCN ニューロン間の同調に重要な因子であることが多く報告されているが、その作用機序の詳細は明らかではない。AVP に関しては、VIP から直接の入力を受け、そのシグナルを SCN から出力するために重要な役割を担っていると考えられていた。しかしながら、**これまでに申請者らは AVP ニューロンが SCN の概日リズム発振に重要な役割を果たすことを明らかにした。**そこで、本研究課題にて、SCN・AVP ニューロン、VIP ニューロンの神経活動や電気生理学的特性とその日内変動を、スライスおよび in vivo でのマルチユニット・シングルユニット記録を行うことで、SCN 内における作用機序の解明に試



みた。さらに、これまでに申請者らが開発してきた遺伝子組換えマウスリソースを最大限活用することで、SCN 内におけるニューロンタイプ特異的に測定・解析することにも挑戦した。

すでに、パッチクランプ法によるスライスでの正常マウスの AVP ニューロンのホールセル記録は開始しており、AVP ニューロンは**静止膜電位の異なる以下の3グループに分類できる**という大変興味深い予備データを得ていた。Na⁺電流と Ca²⁺電流の混合したスパイクを発生するグループ (Class1)、やや脱分極しており、主に Ca²⁺スパイクを発生するグループ (Class2)、極度に脱分極しており、低振幅の膜電位変動のみを示すグループ (Class3)。すなわち、AVP ニューロンには**異なる神経活動パターンを持っている細胞体が共存していることが示唆される。**しかしながら、**この現象の仕組みは解明されていないため、電気生理学的特性の差異が生じる分子メカニズムの追求を試みた。**

2. 研究の目的

中枢概日時計・視交叉上核 (SCN) ニューロンネットワークの作動メカニズムを理解することを目的とした。さらに、概日リズム異常をもつニューロンタイプ特異的変異マウスを用いて、同様の解析を行うことで、細胞・神経回路レベルの異常と行動レベルの異常を結びつけることにも挑戦した。本研究課題を進め、SCN のニューロンタイプ別の役割を見出すことで、概日リズム障害の病態生理の新たな知見や、特定の標的分子を狙った新薬の開発の提案へつなげることを目指した。

3. 研究の方法

SCN スライスを作成し、AVP ニューロンと VIP ニューロンの神経活動や電気生理学的特性の日内変動を測定・解析した。さらに、正常マウスとニューロンタイプ特異的変異マウスを比較することで、ニューロンネットワークの作動メカニズムの解明を試みた。

AVP ニューロンのみ赤色蛍光でラベルされた脳スライスを作成するために、AVP ニューロン特異的 Cre ドライバーマウス (AVP-Cre マウス) と、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するレポーターマウス (Ai14 マウス、Jackson Laboratory) を交配

させた。昼間と夜間における神経活動を比較するために、様々なパッチクランプ法（セルアタッチ法やホールセル法、グラミシジン穿孔パッチ法）を使い分けて解析を行った。また、ニューロンタイプ特異的変異マウスとして、*Avp-Bmal1^{-/-}*マウス（AVPニューロンのみで細胞時計を破壊）や *Avp-Vgat^{-/-}*マウス（AVPニューロンのみで GABA のシナプス小胞放出ができない）を用いた。これらのマウスを用いた先行研究にて、すでに AVP ニューロンが SCN の概日リズム発振に極めて重要であることを見出している。そのため、これらのニューロンタイプ特異的変異マウスを用いて電気生理学的特性と概日リズム行動解析を比較することで、細胞・ネットワークレベルのどのような異常が行動レベルの異常を生じるのか、明らかにしようとした。

VIP ニューロンに関しても、同様の手法を用いて実験を行った。

4. 研究成果

SCN スライスにおけるニューロンタイプ別の電気生理学的特性の解析

正常マウスにおける AVP ニューロンと VIP ニューロンの神経活動を様々な時刻にて記録した。SCN スライスを昼間、夜間、真夜中でそれぞれ作製することで、日内変動をニューロンタイプ別に明らかにすることを試みた。発火頻度や静止膜電位、膜抵抗、各種イオン電流に特に注目した。

発火頻度と静止膜電位においては、AVP ニューロンも VIP ニューロンも日内変動の変化を観察することができた。**暗期 (Night) に比べ、明期 (Day) の神経活動が活発であった。**現在は、より詳細な解析を行うために、多様な時刻帯での SCN スライスの作製を行い、記録を行っている。その他の電気生理学的特性においては、日内変動の変化を観察することはできなかった。

ホールセル記録により、AVP ニューロンには静止膜電位が異なる 3 グループが存在することが明らかになっていた。そのため、各 Class において関与しているイオンメカニズムを同定するため、様々なチャネルブロッカー（TTX：Na⁺チャネル特異的ブロッカー、CNQX：非 NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニスト、D-AP5：NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニスト、CdCl₂：非特異的カルシウムチャネルブロッカー、GABA_A：GABA 受容体アンタゴニスト）の投与実験を行った。

Class1 は TTX と CdCl₂ の両方を、Class2 は CdCl₂ のみの投与にて発火頻度を抑制することができた。すなわち、Na スパイクと Ca スパイクが AVP ニューロンの神経発火の主成分であることが分かった。また、SCN 内のほぼ全てのニューロンは GABA 作動性であることから、GABA_A 受容体の作動薬である Muscimol の投与実験も行った。**全 Class において、静止膜電位が下がる（過分極）という予想外の結果を得た。**しかしながら、ホールセル記録による細胞内の環境変化が、このような結果を見出した可能性があった。そこで、細胞内 Cl⁻濃度を正常に保った状態にて記録を行うことができるグラミシジン穿孔パッチ法を用いることで、この問題を解決した。グラミシジン穿孔パッチ法を用いて同様の実験を行ったが、得られた結果は同じであった。**AVP ニューロンの GABA 応答性は、過分極であるという結果が明らかになった。**現在は、GABA 平衡電位の測定・解析を行っている。

同様に、VIP ニューロンの検討を行ったところ、**TTX の投与のみにて、VIP ニューロンの発火頻度を抑制することができた。**また、Muscimol の投与実験においては、**静止膜電位が上がる（脱分極）という結果を得た。**グラミシジン穿孔パッチ法を用いても、同様の結果を得た。

これらの結果より、AVP ニューロンと VIP ニューロンでは、異なるイオンメカニズムが働いている可能性が高いことが示唆された。また、SCN 内におけるニューロンネットワークの構築の解明には、ニューロンタイプ別の解析が重要であることも分かった。

ニューロンタイプ特異的変異マウスを用いた SCN スライスにおけるニューロンタイプ別の電気生理学的特性の解析

概日リズム行動解析にて、それぞれ異なる異常が確認できた *AVP-Bmal1^{-/-}*、*AVP-Vgat^{-/-}*、*VIP-Bmal1^{-/-}*、*VIP-Vgat^{-/-}*マウスを用いた。実験手法としては、と同様のプロトコールを用いて、正常マウスにて得られた結果と比較検討を行った。

全てのマウスにおいて、正常マウスとは異なる実験結果を得た。また、GABA に対する応答性も異なっていた。すなわち、これらのニューロンタイプ特異的変異マウスでは、電気生理学的特性においても異常が生じていることが示唆される。それぞれのマウスにおいて、異なる異常を確認できているため、どの細胞の分子メカニズムの異常が、どの行動レベルの異常を生じているのかを解明するこ

とができる可能性がある。現在、より詳細な解析を進めている。

AVP ニューロンや VIP ニューロンには、Bmal1やVgat以外にも注目すべき分子があるため、それらについても検討していく必要があると考えた。現在、それらのマウスについても準備中である。また、概日リズムの乱れは、AVP ニューロンとVIP ニューロンの両方を標的にした方が、より顕著な概日リズム行動異常を観察できる。したがって、今後は両ニューロンにて特定の分子を標的にしたマウスを作製し、電気生理学的特性の測定も必要になってくると考える。これらを一つずつ解明していくことで、SCN 内で構築されているニューロンネットワークのメカニズムを解明でき、その破綻にて生じる疾患・健康障害の病態生理の解明に役立つ可能性があると考ええる。

「引用文献」

なし

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 恵美 (HASEGAWA Emi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号: 40765955