

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06340

研究課題名(和文) 視交叉上核による室傍核領域の概日振動制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulation mechanism of circadian oscillation in paraventricular nucleus and subparaventricular zone by the suprachiasmatic nucleus

研究代表者

升本 宏平 (Masumoto, Kohei)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60580529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計の中核である視交叉上核が室傍核領域の概日振動をどのように制御しているか明らかにするために、Per2::lucノックインマウスの脳組織片を用いた組織培養系で室傍核領域と視交叉上核の発光振動測定を行った。その結果、GABAが室傍核領域および視交叉上核の概日振動へ影響を与えること、Cl⁻トランスポーターが概日振動の位相差に影響を与えることがわかった。また、概日振動が回復した移植組織片ではGABAが発現していた。Cl⁻トランスポーターは主観的夜において視交叉上核に発現していた。今後は生体マウスにおいて、細胞内Cl⁻濃度とGABAの興奮性・抑制性および概日振動の関係を明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計の中核である視交叉上核が刻む概日振動が、どのように他の脳領域に伝わり、どのように概日振動を制御しているか明らかにされていない。隣接領域である視交叉上核と室傍核領域間の時刻情報伝達機構を解明することは、この問題を解明するために必須である。

夜行性・昼行性動物の視交叉上核における概日振動の位相は同じであるが、視交叉上核外の概日振動の位相は昼行性・夜行性動物で逆転する。また、GABA受容体の興奮性・抑制性は細胞内Cl⁻濃度により変化する。生体マウスにおいて細胞内Cl⁻濃度とGABAの興奮性・抑制性、概日振動の関係を明らかにすることは、昼行性・夜行性の切り替えの解明に繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The center of the circadian clock is the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus. To clarify how the SCN regulates the circadian oscillation of paraventricular nucleus (PVN) and subparaventricular zone (SPZ), we observed the coherence between the circadian rhythms in the SCN and PVN/SPZ by monitoring bioluminescence emitted using the brain tissue slice from Per2::luc knock-in mice. We revealed that GABA affected the circadian oscillations in the SCN and PVN/SPZ, and that Cl⁻ transporter modulated the phase difference of circadian oscillations in the SCN and PVN/SPZ. In addition, GABA was expressed in the cultured brain slices in which circadian oscillations were restored. The Cl⁻ transporter was expressed in the SCN at subjective night. In the future, we will reveal the relationship between intracellular Cl⁻ concentration, GABA excitability/inhibition and circadian oscillation at in vivo mice.

研究分野：脳神経科学

キーワード：概日時計 視交叉上核 室傍核領域 神経連絡 軸索伸長 GABA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに哺乳類における概日時計の研究を主として行ってきた。哺乳類概日時計の中核である視交叉上核の培養組織系において、概日時計の周期延長化合物の発見や、脳組織片移植培養系での概日振動回復の確立を行った。生体マウスを用いた実験系では、視交叉上核における振動遺伝子の網羅的遺伝子発現解析や光応答遺伝子の網羅的発現解析を行ってきた。またマウス脳 51 領域からサンプルを採取し網羅的遺伝子発現解析を行うことで、脳領域特異的発現遺伝子を明らかにしてきた。これらの研究を通じて研究代表者は、視交叉上核が各脳領域とどのようなネットワークを構築しているのか、そしてどのようなメカニズムによって各脳領域の概日振動を制御しているのかということに疑問を持ち、明らかにすることにした。

視交叉上核による脳領域の概日振動制御機構を解明するために研究代表者は、室傍核領域(室傍核と室傍核下部領域)に着目した。室傍核領域は視交叉上核の背側部に隣接し、視交叉上核から直接の投射が存在する領域である。また視交叉上核の制御は、室傍核領域を経由することで多くの脳領域に及んでいる。そこで視交叉上核による脳領域の概日振動制御機構を解明する手始めとして、視交叉上核がどのように室傍核領域の概日振動を制御しているのかを明らかにすることにした。

研究代表者は、視交叉上核から室傍核領域への時刻情報伝達機構を解明するために、mPer2::Luc ノックインマウスの脳組織片を用いた組織培養系において発光振動の測定を行ってきた。これまでの研究により、視交叉上核と室傍核領域の発光振動は同一組織片においては逆位相であること、室傍核領域組織片のみの培養では発光振動は数日で減衰消滅すること、発光振動が減衰した室傍核領域組織片に新たに視交叉上核組織片を移植し共培養すると室傍核領域の発光振動が回復すること、室傍核領域で回復した発光振動は視交叉上核と逆位相であること、時刻情報伝達には液性因子ではなく物理的結合が重要であること、さらに GABA が組織培養中の視交叉上核および室傍核領域の概日振動へ影響を与えること (Figure 1)、Cl⁻トランスポーターが視交叉上核と室傍核領域間の概日振動の位相差に影響を与えること (Figure 2) を明らかにした。

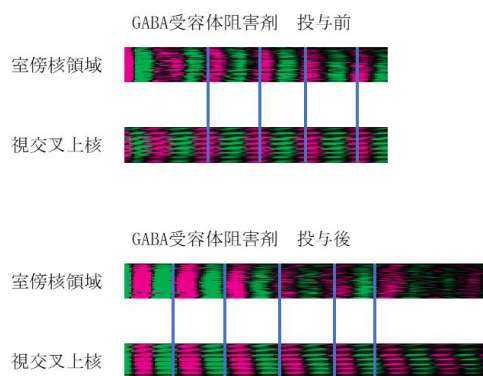


Figure 1 GABA受容体阻害剤による概日振動への影響

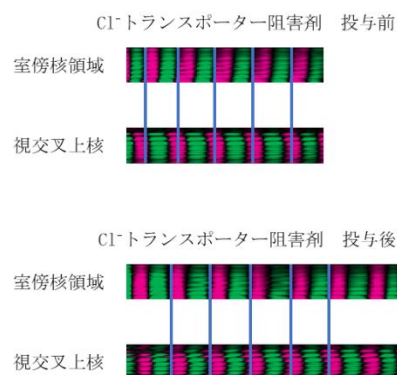


Figure 2 Cl⁻トランスポーター阻害剤による位相差の減少

2. 研究の目的

視交叉上核がどのように脳領域の概日振動を制御しているか明らかにするためには、視交叉上核が隣接領域である室傍核領域における概日振動をどのように制御しているか明らかにすることが必須である。

これまでに研究代表者は自らが開発した実験系である「脳組織片移植培養系での概日振動回復」を用いることで、視交叉上核と室傍核領域間に存在する概日振動における関係性を見出してきた。さらに時刻情報を伝達する物質の探索を進め、GABA 受容体への振動により室傍核領域における振動の位相がばらけることを確認した。

これらの成果を受け、本研究では視交叉上核が GABA を介することでどのように室傍核領域の概日振動を制御するか明らかにすることにした。

3. 研究の方法

(1) 視交叉上核組織片と室傍核領域組織片の共培養

時計遺伝子 Per2 のプロモータにルシフェラーゼを結合させた mPer2::Luc ノックインマウスおよび C57BL/6 マウスを用いた。発光振動の測定は高感度 CCD カメラ及び微弱発光測定装置を用いた。

新生仔 (7 日齢) のマウスから脳を採取し、ティッシュチョッパーを用いて脳切片 (厚さ 300 μm) を作製した。室傍核領域を切り出し、メンブレン上で組織培養を行った。組織培養 10~20 日後、新たに切り出した視交叉上核組織片または組織培養後 3 週間経過した視交叉上核組織片を培養中の室傍核に隣接させ、さらに 1 週間以上の共培養を行った。

(2) 培養組織片を用いた蛍光免疫染色

室傍核領域組織片と視交叉上核組織片の共培養を開始してから 1 週間以上経過したのち、組織片ごとメンブレンを切り抜き、4%PFA に浸漬し固定を行った。DAB 合成酵素抗体および DAB 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った後、組織片からメンブレンを取り除き、封入し観察を行った。

(3) RI *in situ* ハイブリダイゼーション法

新生仔(7日齢)のマウスを主観的昼および主観的夜においてサンプリングし、4%PFA で固定を行った。20%シュウクロースで脱水後、凍結切片を作製した(厚さ 40 μm)。³⁵S で標識された cRNA プローブを用いて Cl⁻トランスポーターの染色を行った。

4. 研究成果

(1) 移植培養系における概日振動の回復・未回復時における GABA 合成酵素と GABA

室傍核領域と視交叉上核の概日振動に GABA が関与している。また、「脳組織片移植培養系での概日振動回復」を行う際、移植に新鮮な視交叉上核組織片を用いて共培養を行うと概日振動は回復するが、培養後数週間経過した視交叉上核組織片では回復しない(Figure 3)。この概日振動の回復・未回復と GABA の発現の間に相関があるのではないかと考え、GABA 合成酵素抗体および GABA 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、新鮮な視交叉上核組織片を移植した場合は室傍核領域組織片と視交叉上核組織片の境界周辺において、GABA 合成酵素および GABA の発現を確認することができた。一方、培養数週間経過した視交叉上核組織片を移植した場合は、室傍核領域組織片と視交叉上核組織片の境界周辺において GABA 合成酵素はほとんど発現しておらず、また GABA の発現も新鮮な視交叉上核組織片を移植した場合よりも少なかった(Figure 4)。

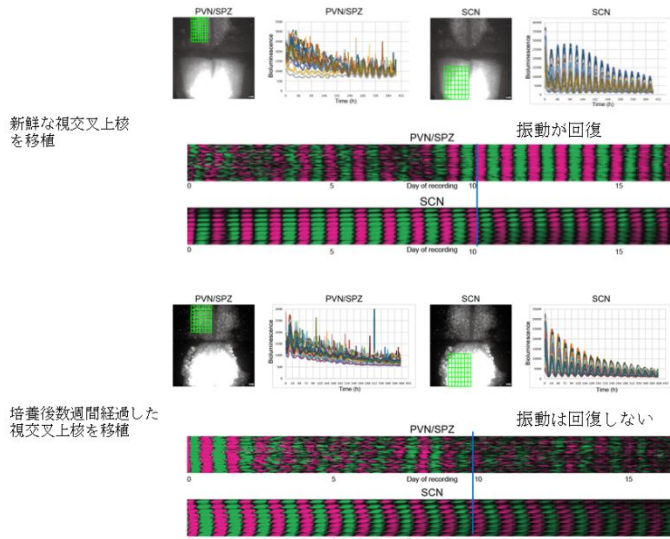


Figure 3 視交叉上核との共培養による室傍核領域振動の回復、未回復

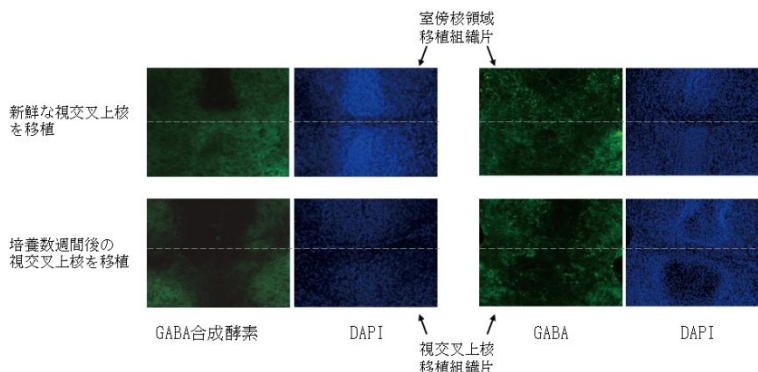


Figure 4 共培養後のGABA合成酵素とGABAの免疫染色

(2) 新生仔期視交叉上核における Cl⁻トランスポーターの発現

細胞内 Cl⁻濃度により GABA の興奮性・抑制性は変化することが知られており、Cl⁻トランスポーターを培養組織片に投与することで視交叉上核と室傍核の概日振動の位相差に影響を与える(Figure 2)。また視交叉上核における Cl⁻トランスポーターによる GABA の興奮性・抑制性の制御についての報告も近年なされている。そこで移植培養系における概日振動の回復・未回復と、Cl⁻トランスポーターとの関係を明らかにするために、RI *in situ* ハイブリダイゼーション法を行った。しかしながら、移植組織片に対する、RI *in situ* ハイブリダイゼーションは非特異的なシグナルが多く、特異的なシグナルを検出することが出来なかった。そこで、組織培養に用いる新生仔期(7日齢)のマウス脳において、Cl⁻トランスポーターが発現しているか、また発現しているなら発現に振動があるか確認することにした。その結果、主観的夜において視交叉上核に Cl⁻トランスポーターの弱い発現を確認することが出来た。一方、主観的昼においては Cl⁻トランスポーターの発現を確認することが出来なかった(Figure 5)。

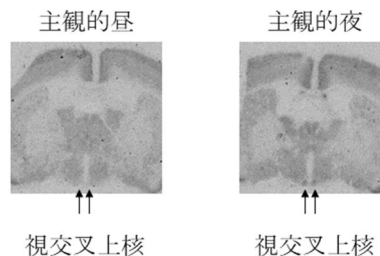


Figure 5 Cl⁻トランスポーターの発現

本研究の成果から、移植培養系における概日振動の回復・未回復と GABA の発現の間に相関があることが示唆された。今後はウエスタンブロッティング法により GABA の定量化を行い、振動回復と GABA の相関についてより詳細を明らかにする。また本研究により、Cl⁻トランスポーター

が新生仔期の視交叉上核において振動していることが明らかとなった。Cl⁻トランスポーターの振動と GABA の興奮性・抑制性および概日振動回復との相関を明らかにするために、今後は移植組織片に対して免疫染色法を用いることによって検証する予定である。

<引用文献>

Yasushi Isojima et al. CKI / -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 106, No. 37, 2009, pp.15744-9.

Takeya Kasukawa, Koh-hei masumoto et al. Quantitative Expression Profile of Distinct Functional Regions in the Adult Mouse Brain, PLoS one, Vol. 6, No. 8, 2011, e23228.

Olde Engberink AHO, Meijer JH, and Michel S. Chloride cotransporter KCC2 is essential for GABAergic inhibition in the SCN, Neuropharmacology, Vol. 138, 2018, pp.80-86.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yanai Akie, Islam Md Nabiul, Hayashi-Okada Maki, Jahan Mir Rubayet, Tarif Abu Md Mamun, Nozaki Kanako, Masumoto Koh-hei, Shinoda Koh	4. 巻 122
2. 論文標題 Immunohistochemical relationships of huntingtin-associated protein 1 with enteroendocrine cells in the pyloric mucosa of the rat stomach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151650 ~ 151650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.acthis.2020.151650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Islam Md Nabiul, Maeda Naoki, Miyasato Emi, Jahan Mir Rubayet, Tarif Abu Md Mamun, Ishino Taiga, Nozaki Kanako, Masumoto Koh-hei, Yanai Akie, Shinoda Koh	4. 巻 9
2. 論文標題 Expression of huntingtin-associated protein 1 in adult mouse dorsal root ganglia and its neurochemical characterization in reference to sensory neuron subpopulations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 258 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibror.2020.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Islam Md Nabiul, Sakimoto Yuya, Jahan Mir Rubayet, Ishida Mako, Tarif Abu Md Mamun, Nozaki Kanako, Masumoto Koh-hei, Yanai Akie, Mitsushima Dai, Shinoda Koh	4. 巻 440
2. 論文標題 Androgen Affects the Dynamics of Intrinsic Plasticity of Pyramidal Neurons in the CA1 Hippocampal Subfield in Adolescent Male Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 15 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.05.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wroblewski Gregory, Islam Md. Nabiul, Yanai Akie, Jahan Mir Rubayet, Masumoto Koh-hei, Shinoda Koh	4. 巻 394
2. 論文標題 Distribution of HAP1-immunoreactive Cells in the Retrosplenial-retrohippocampal Area of Adult Rat Brain and Its Application to a Refined Neuroanatomical Understanding of the Region	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 109 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.10.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niwa Yasutaka, Kanda Genki N., Yamada Rikuhiko G., Shi Shoi, Sunagawa Genshiro A., Ukai-Tadenuma Maki, Fujishima Hiroshi, Matsumoto Naomi, Masumoto Koh-hei, Nagano Mamoru, Kasukawa Takeya, Galloway James, Perrin Dimitri, Shigeyoshi Yasufumi, Ukai Hideki, Kiyonari Hiroshi, Sumiyama Kenta, Ueda Hiroki R.	4. 巻 24
2. 論文標題 Muscarinic Acetylcholine Receptors Chrm1 and Chrm3 Are Essential for REM Sleep	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2231~2247.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.07.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sujino Mitsugu, Asakawa Takeshi, Nagano Mamoru, Koinuma Satoshi, Masumoto Koh-Hei, Shigeyoshi Yasufumi	4. 巻 8
2. 論文標題 CLOCK 19 mutation modifies the manner of synchrony among oscillation neurons in the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19224-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Koh-hei Masumoto, Kosei Yonezawa, Maho Iida, Kenji Nakajima, Md Nabiul Islam, Akie Yanai, Kanako Nozaki and Koh Shinoda
2. 発表標題 Immunohistochemical relationship between HOME cells, Calbindin-positive neurons and GnRH-positive neurons in the mouse accessory olfactory system during pre- and neonatal stages.
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 升本 宏平、米澤 恒成、ナビユール イスラム、柳井 章江、野崎 香菜子、篠田 晃
2. 発表標題 HOME cellsの胎生期脳内移動とHAP1-KOマウスにおけるGnRH陽性細胞の脳内移動
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 升本宏平, 米澤恒成, ナビュール・イスラム, 柳井章江, 飯田真帆, 中河友里, 濱崎楓子, 篠田晃
2. 発表標題 マウスHAP1陽性臭覚遊走性胎生細胞の胎生期脳内移動形態とHAP1欠損マウスにおけるGnRH陽性細胞脳内移動
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	篠田 晃 (Shinoda Koh)		
研究協力者	柳井 章江 (Yanai Akie)		
研究協力者	イスラム エムディノビウル (Islam Md Nabiul)		
研究協力者	野崎 香菜子 (Nozaki Kanako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------