

平成 20 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790183
 研究課題名 (和文) ラット視交叉上核でのバゾプレッシン合成・分泌と生体リズム連関の
 解明
 研究課題名 (英文) The relationship between vasopressin and circadian rhythm in the rat
 suprachiasmatic nucleus
 研究代表者
 藤原 広明 (FUJIHARA HIROAKI)
 産業医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10369051

研究成果の概要：

バゾプレッシン (AVP) -eGFP トランスジェニックラットの視交叉上核において遺伝子発現のサーカディアンリズムを測定し、時差ぼけ (位相変化) および光刺激に対する遺伝子発現の反応性を検討した。eGFP 遺伝子発現はサーカディアンリズムを有しており、位相変化および光刺激に対して鋭敏に反応することを明らかにした。また、その反応性は AVP mRNA の変動より大きい可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：eGFP、視交叉上核、バゾプレッシン、サーカディアンリズム

1. 研究開始当初の背景

睡眠-覚醒に関わる大きな要因の一つにサーカディアンリズムがある。このリズムの崩壊は、非 24 時間睡眠覚醒症候群、睡眠相遅延症候群などにつながる。日本人成人の 5 人に 1 人がこのような何らかの睡眠障害があると言われている。睡眠-覚醒サイクルを制御するサーカディアンリズムについて研究することは非常に重要なことである。これまでの研究により当教室において、バゾプレッシン (AVP) 遺伝子に緑色蛍光蛋白 (enhanced

Green Fluorescent Protein: eGFP) 遺伝子を挿入した AVP-eGFP トランスジェニック (Tg) ラットの作出に成功した。この Tg ラットは AVP 産生ニューロンに AVP と共に eGFP が特異的に発現する。サーカディアンリズムの中核である視交叉上核には、AVP 産生ニューロンが存在しており、本 Tg ラットでも視交叉上核に eGFP が発現している。視交叉上核で産生される AVP は浸透圧刺激などには影響を受けず、視交叉上核からのサーカディアンリズムを制御する出力系の 1 つとして AVP

が作用している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では AVP-eGFP Tg ラットを用いて経時的に eGFP の緑色蛍光を観察できる *in vivo* eGFP モニタリングシステムを開発することにより、視交叉上核の AVP 産生を指標とした長期的なサーカディアンリズムの測定法の確立とその応用を目的とした。具体的には、本 Tg ラットで明暗サイクルの位相をずらした時差ぼけモデルを作成し、時差ぼけの視交叉上核での AVP-eGFP 融合遺伝子の発現への影響を調べることにより、位相変化が AVP 産生とサーカディアンリズムの関連にどのような影響を及ぼすかを検討した。本研究の成果は視交叉上核で産生される AVP が関わる睡眠障害の病態生理の解明の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

平成 19 年度

(1) *in vivo* eGFP モニタリングシステムの開発・セットアップを行う。

in vivo eGFP モニタリングシステムは eGFP 励起光をレーザーより光ファイバーを通して AVP-eGFP 発現細胞に照射し、励起された蛍光をもう一方のファイバーを通して光電管に入力し、光情報を電気的信号に変換して経時的に記録するシステムである。実験セットはほぼ完成しているが、分解能やゲインの調節等の微調整を行い、長時間の測定を可能にするシステムの構築を行う。

(2) 下垂体後葉における eGFP 分泌の測定を行い、(1) のシステムを用いてその動態を解明する。

ペントバルビタールで麻酔を施した Tg ラットから下垂体を摘出し 37°C に保温した灌流装置内に設置する。下垂体後葉に光ファイバーを挿入し、励起光を照射し、*in vitro* で下垂体に浸透圧刺激(灌流液内に種々のペプチドを加える)を与え、下垂体からの AVP の分泌を eGFP の変化を指標として観察する。

平成 20 年度

(3) 正常明暗サイクルおよび時差ぼけモデルにおいて AVP-eGFP を指標とした視交叉上核におけるサーカディアンリズムの測定を行い、比較検討する。

ウレタン麻酔下の Tg ラットを定位脳固定装置に固定し、骨ドリルで頭蓋骨に穴を

空けて、視交叉上核に光ファイバーを挿入、励起光を照射し eGFP 蛍光の経時的測定を行う。正常明暗サイクル群および明暗サイクルの位相をずらした時差ぼけモデルと比較し、時差ぼけの視交叉上核への影響を検討する。

(4) 視索上核および室傍核における eGFP 産生を (1) のシステムにより測定する。

ウレタン麻酔下にて Tg ラットの下顎を除去後、脳底部を切開し、視索上核および室傍核に *in vivo* eGFP モニタリングシステムの光ファイバーを挿入、励起光を照射し eGFP 蛍光の経時的測定を行う。Tg ラットに浸透圧刺激を行い、eGFP 産生量の変化をコントロール群と比較する。

(5) (3) のモデルにおいて AVP hnRNA、AVP mRNA、eGFP mRNA、Per mRNA、AVP および eGFP を測定し、比較検討する。

AVP hnRNA、AVP mRNA、eGFP mRNA、Per mRNA (時計遺伝子) を *in situ* ハイブリダイゼーション法で、AVP、eGFP はラットをペントバルビタール麻酔下で灌流固定して AVP を免疫組織化学的染色法で、eGFP を蛍光顕微鏡で測定し、定量化する。それぞれの遺伝子発現について経時的に、視交叉上核と視索上核および室傍核において比較検討する。

4. 研究成果

平成 19 年度は AVP-eGFP Tg ラットを用い、時差ぼけモデルを作成し、視床下部の遺伝子発現への影響を検討した。Tg ラットは明期 12 時間 (7:00-19:00)、暗期 12 時間 (19:00-7:00) の環境下で飼育した。明期開始時刻を ZT0 とし、ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17、ZT21 の 6 点で Tg ラットの脳を採取し、視交叉上核において eGFP mRNA、AVP hnRNA、AVP mRNA、Per1 mRNA、Per2 mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法で定量化し、各遺伝子発現のサーカディアンリズムを測定した。また、ZT16 に 8 時間明期開始時刻を前進させた時差群を作成し、12 時間後 (d1)、3 日後 (d3)、7 日後 (d7) の暗期開始時刻 (ZT4) に脳を採取し、上記の遺伝子発現を視交叉上核、視索上核および室傍核において、galanin mRNA を腹外側視索前核において同様の方法で定量化し、コントロール群 (d0) と比較した。その結果、Tg ラットの視交叉上核の各遺伝子発現は明確なサーカディアンリズムを示した (図 1、2)。また、時差群では視交叉上核で eGFP mRNA、AVP hnRNA、Per1 mRNA、Per2 mRNA レベルが有意に減少し、特に eGFP

mRNA (図 3)、AVP hnRNA、Per1 mRNA レベルはその減少が 7 日後でも観察された。腹外側視索前核での galanin mRNA レベルは 12 時間後にのみ有意に上昇した。時差群において AVP mRNA レベルはほとんど変化しないにも関わらず、eGFP mRNA レベルの低下が観察された。したがって、eGFP mRNA の変動は AVP mRNA の変動より大きい可能性が考えられる。また、VLPO での galanin mRNA の変化は明暗サイクルの変化により睡眠量が変化したことを示唆する。AVP-eGFP Tg ラットにおいて視交叉上核の eGFP 遺伝子発現はサーカディアンリズムを有しており、リズムの変動を見る上で有用な指標になると考えられる。

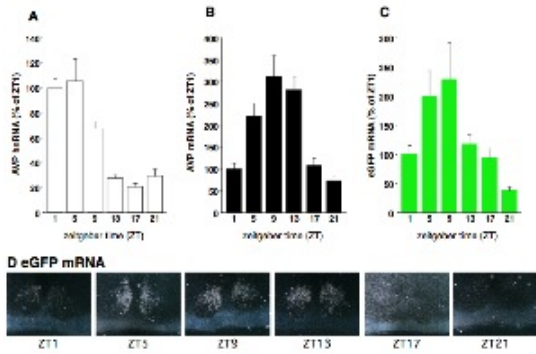


図 1 視交叉上核における AVP hnRNA、AVP mRNA、eGFP mRNA のサーカディアンリズム

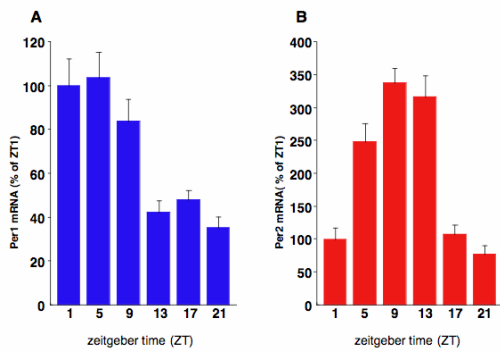


図 2 視交叉上核における Per1 mRNA、Per2 mRNA のサーカディアンリズム

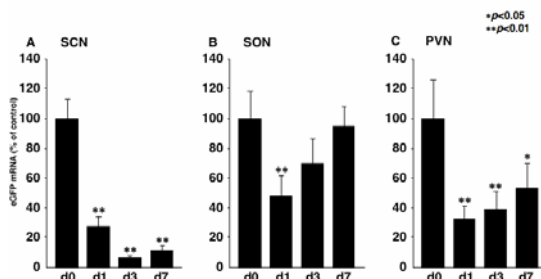


図 3 視交叉上核における時差ぼけによる eGFP mRNA の変化

平成 20 年度は AVP-eGFP Tg ラットを用い、

暗期における光刺激に対する視床下部の遺伝子発現の反応性を検討した。また、蛍光観察による eGFP 蛋白発現のサーカディアンリズムを測定した。Tg ラットは明期 12 時間 (7:00~19:00)、暗期 12 時間 (19:00~7:00) の環境下で飼育した。明期開始時刻を ZT0 とし、ZT15 に光暴露(600Lux, 30min)を行い 90 分後に脳を採取した。脳の薄切切片を作成し視交叉上核において eGFP mRNA、AVP mRNA、Per1 mRNA、Per2 mRNA および AVP hnRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法で定量化し、光暴露を行わないコントロール群と比較した。その結果、光暴露により AVP hnRNA および GFP mRNA の発現は抑制され、Per1 mRNA および Per2 mRNA の発現は増強された (図 4)。AVP mRNA の発現に変化は見られなかった。また、ZT1、ZT9、ZT17 において灌流固定を行い、視交叉上核の eGFP 蛍光観察を行ったところ、サーカディアンリズムを示す蛍光強度の変化が観察された (図 5)。これらのことから AVP-eGFP Tg ラットにおいて視交叉上核の eGFP 遺伝子発現は光刺激によって位相が変化する可能性があることを明らかにした。また、eGFP 蛋白発現はサーカディアンリズムを有しており、リズムの変動を見る上で有用な指標になると考えられる。

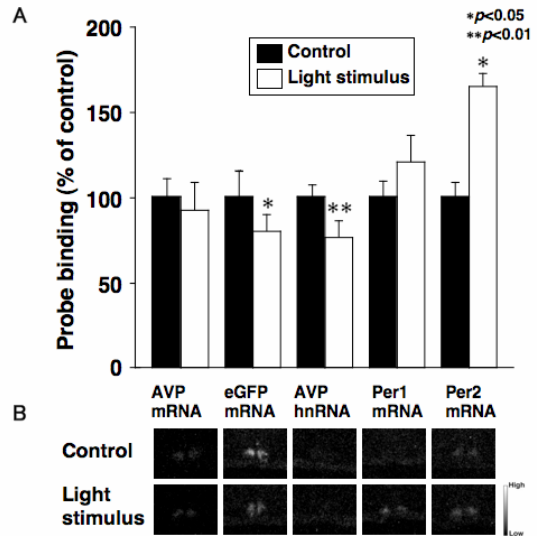


図 4 視交叉上核における光刺激に対する各遺伝子発現の反応性

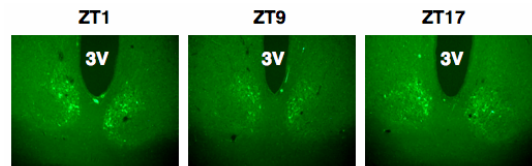


図 5 視交叉上核における eGFP 蛋白のサーカディアンリズム

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 6 件)

①Suzuki H, Onaka T, Kasai M, Kawasaki M, Ohnishi H, Otsubo H, Saito T, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Dayanithi G, Murphy D, Nakamura T, Ueta Y.

論文名 Response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the hypothalamus of adjuvant-induced arthritic rats.

掲載誌名 Journal of Neuroendocrinology

巻、最初と最後の頁 21(3), 183-190

発行年 2009

査読 有

② Ohbuchi T, Yokoyama T, Saito T, Hashimoto H, Suzuki H, Otsubo H, Fujihara H, Suzuki H, Ueta Y.

論文名 Brain-derived neurotrophic factor inhibits spontaneous inhibitory postsynaptic currents in the rat supraoptic nucleus.

掲載誌名 Brain Research

巻、最初と最後の頁 3, 34-42

発行年 2008

査読 有

③Ueta Y, Fujihara H, Dayanithi G, Kawata M, Murphy D.

論文名 Specific expression of optically active reporter gene in arginine vasopressin-secreting neurosecretory cells in the hypothalamic-neurohypophyseal system.

掲載誌名 Journal of Neuroendocrinology

巻、最初と最後の頁 20(6), 660-664

発行年 2008

査読 有

④Shibata M, Fujihara H, Suzuki H, Ozawa H, Kawata M, Dayanithi G, Murphy D, Ueta Y.

論文名 Physiological studies of stress responses in the hypothalamus of vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgenic rat.

掲載誌名 Journal of Neuroendocrinology

巻、最初と最後の頁 19(4), 285-292

発行年 2007

査読 有

⑤ Hashimoto H, Hyodo S, Kawasaki M, Shibata M, Saito T, Suzuki H, Otsubo H, Yokoyama T, Fujihara H, Higuchi T, Takei Y, Ueta Y.

論文名 Adrenomedullin 2 (AM2)/intermedin is a more potent activator of

hypothalamic oxytocin-secreting neurons than AM possibly through an unidentified receptor in rats.

掲載誌名 Peptides

巻、最初と最後の頁 28(5), 1104-1112

発行年 2007

査読 有

⑥ Hashimoto H, Fujihara H, Kawasaki M, Saito T, Shibata M, Otsubo H, Takei Y, Ueta Y.

論文名 Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats.

掲載誌名 Endocrinology

巻、最初と最後の頁 148(4), 1638-1647

発行年 2007

査読 有

[学会発表] (計 5 件)

①発表者名 丸山崇、藤原広明

発表標題 バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの視交叉上核における遺伝子発現の概日リズム観察と光刺激に対する反応性の検討

学会等名 第35回日本神経内分泌学会

発表年月日 2008年8月30日

発表場所 東京・政策研究大学院大学

②発表者名 藤原広明

発表標題 明期開始時刻の前進がトランスジェニックラットの視床下部におけるバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子と時計遺伝子発現に及ぼす影響

学会等名 第85回日本生理学会大会

発表年月日 2008年3月25日

発表場所 東京・京王プラザホテル

③発表者名 藤原広明

発表標題 AVP-eGFP トランスジェニックラットを用いた時差ぼけモデルにおける視床下部遺伝子発現の検討

学会等名 第18回日本病態生理学会

発表年月日 2008年1月26日

発表場所 神戸・神戸学院大学

④発表者名 藤原広明

発表標題 Effects of acute phase advance on the circadian gene expressions of galanin, arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein, Per 1 and Per 2 in the rat hypothalamus

学会等名 Neuroscience Meeting 2007

発表年月日 2007年11月7日

発表場所 アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ

⑤発表者名 藤原広明

発表標題 GFP monitoring *in vitro* in the posterior pituitary of arginine vasopressin-eGFP transgenic rat.

学会等名 Satellite Symposium of the 5th

Congress of the International Society for
Autonomic Neuroscience

発表年月日 2007年10月3日

発表場所 和歌山・ホテルグランヴィア

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

なし

○取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 広明 (FUJIHARA HIROAKI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10369051

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし