

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15921

研究課題名(和文) 脳内時計細胞を起点とした神経ネットワークの分子・機能的理解

研究課題名(英文) Molecular and functional analysis of neural network of the circadian clock

研究代表者

坪田 有沙(平野有沙)(Hirano, Arisa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60806230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計中枢によって制御される生理リズムの中でも特に、睡眠リズムと体温リズムを生み出す出力経路を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。視索前野へ投射する神経群を特異的に阻害したところ、マウスの睡眠覚醒リズムが消失することを見出した。興味深いことに、このマウスにおいて、輪回し行動リズムは観察された。つまり、睡眠リズムと輪回し行動のようなアクティブな行動リズムは異なる神経回路で制御されると考えられた。さらに同じマウスにおいて睡眠リズムがなくても時計タンパク質の発現リズム、つまり発振系に影響はなかったことから、概日時計の睡眠覚醒リズム出力経路を特異的に同定することができたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究領域では、時計中枢である視交叉上核内における神経カップリングや、神経内の分子振動に関する研究が多い。一方で、神経から他の脳領域に出力して生理リズムを生み出す神経機構には多くの謎が残されている。本研究は、睡眠リズムおよび体温リズムを生み出す出力機構の一端を明らかにしたという意味で先駆的な研究である。これらの出力経路の理解は、概日時計そのものをターゲットとしない睡眠障害に対する介入法の開発に役立つと期待できる

研究成果の概要(英文)：The suprachiasmatic nucleus is known as a master circadian clock regulating the circadian rhythms. In this study, we tried to identify the neuronal circuits generating the sleep-wake cycle and body temperature cycle and their physiological functions. By using virus vectors, we inhibited the neuronal transmission by expression of tetanus toxin light-chain in neurons projecting the preoptic area and found that this pathway is important for generation of sleep-wake pattern in mice. Interestingly, we also found that the mice still exhibited the wheel-running rhythms, suggesting that there are distinct pathways to regulate sleep-wake and wheel-running activity rhythms, although these are closely related. We also found that the oscillation of PER2, one of core clock proteins, was not affected in mice, which lost rhythmicity at the behavioral level. This result indicated that we succeeded to manipulate the output of the clock neuron for sleep-wake cycle rather than the oscillators.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 概日リズム 視交叉上核 SCN

1. 研究開始当初の背景

生物は自律的に時を刻む計時システムを内在しており、外界環境へ適応する。特に約 1 日を周期とした概日時計(サーカディアンクロック)は地球上に存在する生物に普遍的であり、睡眠リズムや代謝リズムなどの約 1 日周期の生理リズムを生み出す原動力となる。24 時間型社会と呼ばれる現代社会では、環境サイクルと体内リズムのズレから生じる概日リズム障害が問題となっており、睡眠障害、癌、メタボリックシンドロームや鬱病などの重篤な病気との強い連関が報告されている。視床下部の視交叉上核(SCN)は概日時計の中核として機能することが知られており、個々の SCN 神経はそれぞれ分子時計を内在して自律的に発振する。発振系の分子的な理解が進む一方で、遺伝子転写の ON と OFF が作る波形情報から睡眠覚醒や代謝などの生理リズムが生み出される過程は依然として不明である。つまり、概日時計システムにおいて、“細胞内の時を刻むメカニズム”の詳細が明らかになる一方、“時刻を読み取る神経基盤”には未だ謎が多く残されている。

2. 研究の目的

視床下部の視交叉上核(SCN)は概日時計システムの中核であり、生体としてうまく調和した様々な生理リズムを制御する。しかし、SCN の時計細胞そのものは単なる分子振動体を内在しているだけであり、時刻情報の出力系こそが生理機能(行動・代謝など)のリズム発現に重要であるが、時計発振制御に比べて SCN 神経からの出力機構の研究は大きく遅れている。本研究計画では生理リズムの中でも特に、睡眠覚醒リズムと体温リズムに着目してこれらの生理リズムを生み出す神経基盤を明らかにする。睡眠リズムは個体の生理リズムの基本となるが、例えば体温リズムはしばしば行動リズムとの乖離が観察され、出力経路が独立していると考えられる。これらの出力経路を同定し、さらにその機能を個体レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

概日時計中核である SCN からの時刻情報出力機構を神経回路レベルで理解するために、Cre リコンビナーゼとウイルスベクターを用いて目的の神経細胞特異的な遺伝子操作を行う。イヌ科アデノウイルス 2(CAV2)ウイルスは軸索末端より取り込まれ、目的遺伝子を発現する。そこで、SCN の主要な投射先に CAV2 を投与して Cre を発現させ、SCN に Cre 特異的アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を投与することで特定の領域に投射した神経のみに遺伝子操作を行うことが可能である。この技術を用いて、視索前野に投射している神経をラベルしてその操作を行った。神経の阻害には、AAV を用いて SCN 神経に破傷風毒素(テタヌス毒素)軽鎖を発現させることで神経小胞を阻害した。マウスの行動リズムの評価には、赤外線センサーによる自発行動測定、EEG/EMG 測定および輪回し行動測定を行った。さらに、SCN 内の分子リズムへの影響を調べるために、PER2 タンパク質にルシフェラーゼを融合させたタンパク質を発現するノックインマウスを用いた細胞時計の可視化を行った。マウス脳から SCN を含む切片を作成し、培養しながらルシフェラーゼの発光を経時的に測定した。

一方、体温リズムに関してはこれまでに視床下部前腹側脳室周囲核(AVPe)に存在する QRFP 産生神経が体温リズム形成に関与することを見出している。QRFP 産生神経の体温リズム形成への関与をさらに詳細に明らかにするため、Qrfp-iCre ドライバーマウスを用いて AVPe の QRFP 産生神経に破傷風毒素軽鎖を発現させて体温リズムが恒暗条件で失われるかどうかを解析した。体温の解析には DSI テレメトリーシステムを用いてマウス腹腔内に温度センサーチップを埋め込み、体温を経時的にモニターした。また、SCN から体温リズム制御領域に至る神経回路が同定されていなかったため、経シナプス性逆行性ウイルスベクターである狂犬病ウイルスを用いた神経トレーシングを行った。改変型狂犬病ウイルスは TVA 受容体の発現している細胞にのみ感染する。さらに糖タンパク質 G の存在下ではシナプス結合している上流の神経に逆行性に移行し、目的タンパク質(GFP)を発現する。つまり、TVA と糖タンパク質 G の発現を Cre 依存的に制御することにより、目的の神経細胞の 1 つ上流の神経群をラベルすることが可能である。そこで QRFP 神経に投射している SCN 下流領域のインプット神経に SCN の神経が含まれるかどうかを解析した。

4. 研究成果

本研究は、まず睡眠リズムを生み出す神経回路の機能的な性状解析を行った。神経毒素を用いて

睡眠中枢へ神経投射する神経を特異的に抑制し、マウスの行動リズムへの影響を解析した。脳波測定により、睡眠覚醒リズムを調べたところ、マウスの睡眠覚醒リズムが大きく減弱することが明らかになった(図1)。これは、これまでの研究で明らかになっていた自発行動量のリズムの結果と一致する。興味深いことに、睡眠覚醒リズムが見られないマウスにおいて輪回し行動を調べたところ、恒暗条件においても長周期の行動リズムが観察された。つまり、このマウスにおいては睡眠リズムはないものの、輪回し行動のようなアクティブな行動にはリズムが残っており、視交叉上核から少なくともふたつの経路が生理リズムの形成に関与していると考えられた。これらの知見は、様々な生理リズムが視交叉上核を起点とした複数の神経回路網によって制御されている、という本研究の作業仮説を支持する。さらに、このときの時計機能を調べるために細胞時計の可視化を行った。その結果、睡眠リズムがなくても時計タンパク質の発現リズムに影響はなく、さらに視交叉上核の細胞同士の同調にも影響はなかった(図2)。このことは、時計機能ではなく、時計の出力系のみが阻害されていることを示唆する。

さらに、睡眠覚醒リズムを制御する神経回路に加え、体温リズム形成メカニズムの同定を試みた。破傷風毒素を **QRFP** 産生神経に発現させ、恒暗条件におけるマウスの体温リズムを調べた。その結果、**QRFP** 産生神経の神経連絡を阻害すると、体温リズムが著しく減弱することが判明した。さらに **QRFP** 産生神経を阻害すると体温リズムだけではなく行動リズムが大きく影響を受けることが判明した。現在、マウス脳波を測定し、睡眠覚醒サイクルへの影響を詳細に解析しているところである。次に、**SCN** と **QRFP** 神経を繋ぐ神経回路の同定を試みた。改変型狂犬病ウイルスベクターを用いて **QRFP** 産生神経の逆行性トレーシングを行うと **SCN** の投射先として知られる室傍核 (**PVN**) および視索前野 (**POA**) の神経がラベルされる。一方、**SCN** の神経は **QRFP** 産生神経に直接的な投射はしていないことも判明した。そこで、**SCN** からのシグナルが **PVN** または **POA** の神経を介して **QRFP** 産生神経に入力している可能性を検証した。**TVA** と糖タンパク質 **G** を発現するアデノ随伴ウイルス (**AAV**) を **PVN** または **POA** に導入し、2週間後に改変型狂犬病ウイルスを **QRFP** 産生神経の多く存在する **AVPe** にインジェクションした。改変型狂犬病ウイルスは神経の軸索からも取り込まれるため、**AVPe** に注射した **PVN** または **POA** の神経の1つ上流の神経を蛍光ラベルすることが可能となる。しかしながら、上流の神経群 (**input neuron**) の中に **SCN** の神経は含まれておらず、**SCN** が **PVN** または **POA** の神経を介して **QRFP** 産生神経に入力している可能性は低いと考えられた。現在、**QRFP** 産生神経の下流で **SCN** からの時刻シグナルが合流している可能性を検証している。

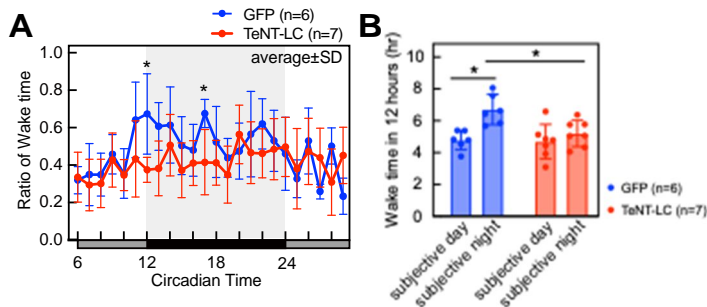


図1. 睡眠覚醒リズム
(A) 視索前野に注射する **SCN** 神経に破傷風毒素 (**TeNT-LC**) を発現させたときの睡眠覚醒リズム。**GFP** はコントロールを示している
(B) 主観的昼と主観的夜における平均覚醒時間。

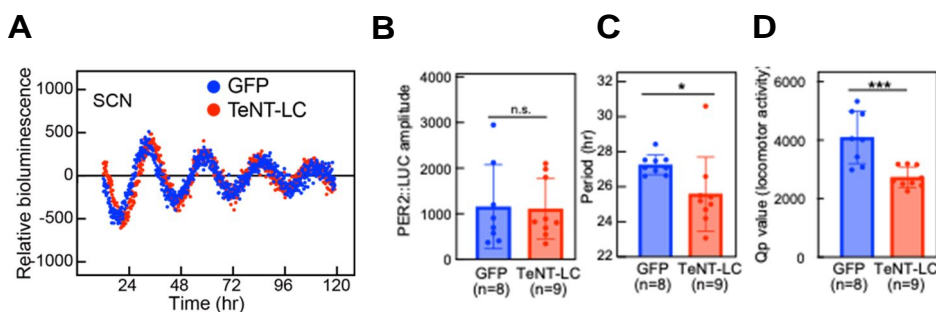


図2. **PER2** 発現リズム

(A) 視索前野に注射する **SCN** 神経に破傷風毒素 (**TeNT-LC**) を発現させたマウスから脳切片を作成し、**PER2::LUC** の発光を測定した。コントロールとして **GFP** 発現マウスを用いた。発光値を24時間平均でデトレンドし、プロットした。(B) **PER2::LUC** 発光リズムの振幅 (C) **PER2::LUC** 発光リズム周期 (D) 解析に用いたマウスの行動リズムをピリオドグラムで解析して算出した **Qp** 値。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shuntaro Uchida, Shingo Soya, Yuki C Saito, Arisa Hirano, Keisuke Koga, Makoto Tsuda, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Takeshi Sakurai	4. 巻 41
2. 論文標題 A Discrete Glycinergic Neuronal Population in the Ventromedial Medulla That Induces Muscle Atonia during REM Sleep and Cataplexy in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 journal of neuroscience	6. 最初と最後の頁 1582-1596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0688-20.2020.	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 Tsuji no Natsuko, Ikeda Masayuki, Hirano Arisa, Sakurai Takeshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Editorial: The Role of Neuropeptides in Sleep/Wakefulness States and the Circadian Clock	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 913371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.913371	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Arisa Hirano
2. 発表標題 Function of CRY in photo-sensing in mouse retina
3. 学会等名 Society for research on biological rhythms, 2020 meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arisa Hirano, Yuki Saito, Takeshi Sakurai
2. 発表標題 Neural circuit of circadian sleep regulation in mice
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arisa Hirano, Yuki Saito, Takeshi Sakurai
2. 発表標題 Projection mapping of SCN neurons and its functional analysis
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arisa Hirano
2. 発表標題 Functional analysis of neural network regulating circadian sleep-wake rhythms.
3. 学会等名 The third congress of Asian society of sleep medicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野有沙
2. 発表標題 概日時計中心から睡眠覚醒リズムを生み出す神経基盤の解析
3. 学会等名 第46回日本睡眠学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------