

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02526

研究課題名（和文）概日時計による体温調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of thermoregulation by the circadian clock

研究代表者

小野 大輔 (Daisuke, Ono)

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：30634224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウスを用い、概日時計による体温調節メカニズムを神経回路レベルで明らかにする事を目的とした。マウスを低温環境下で24時間の絶食を行うと体温が30度以下に低下する事、そしてその低体温状態は概日時計による調節を受ける事を明らかにした。さらに、光遺伝学や光イメージング技術を用い、概日時計中枢である視交叉上核からの出力経路のうち、低体温状態の誘導に関連する回路とそれに関連する分子についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冬眠や休眠は、動物が厳しい環境を生き抜くために代謝を能動的に低下させるシステムである。この分子・神経メカニズムの解明には、多くの医学的および社会的意義がある。例えば、低酸素症や心停止後の治療、臓器移植時の臓器保存など、救急医療の発展に繋がる。特に、心臓手術や脳外科手術中の低体温療法の改善により、患者の予後が大幅に向上する可能性がある。また、長期間の宇宙旅行における宇宙飛行士の健康維持や、災害時の生命維持技術の開発にも役立つ可能性がある。さらに、代謝をコントロールする技術により、老化の遅延や生活習慣病の予防にも貢献する。本研究成果は、医学的進歩と社会的福祉の向上に大きく寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of thermoregulation by the circadian clock at the neural circuit level using mice. We found that 24 hours of fasting in a low-temperature environment causes a decrease in body temperature below 30 degrees Celsius, and that this hypothermic state is regulated by the circadian clock. Using optogenetics and optical imaging techniques, we also revealed the circuits and molecules associated with the output pathway from the suprachiasmatic nucleus, the central circadian clock, that are involved in inducing hypothermia.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 神経回路 視床下部 視交叉上核 休眠 代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類における概日時計の中核は、視床下部に位置する「視交叉上核」に存在し、時計遺伝子群の転写・翻訳を介したフィードバックループにより 24 時間のリズムが生成される。そのリズムは外界の明暗環境に同調し、最終的に睡眠・覚醒や体温リズムなど様々な生理機能の時間的調節を行う。これまでの多くの研究から、現象的に概日時計がこれらの生理機能を調節している事が示されてきたが、実際どの神経回路がどの生理機能の時間調節に関与するののかは、ほとんど明らかにされてこなかった。このような背景から、申請者は数年前から視交叉上核からの出力神経回路の探索を進め、最近睡眠・覚醒調節に関わる視床下部内の新しい神経回路を発見し報告した (Ono et al., 2020 Science Advances, 責任著者)。さらにこの一連の研究の中で、申請者は体温調節に関連する神経回路同定につながる重要な手がかりを得た。概日時計は睡眠・覚醒のリズムのみならず、体温リズムも調節している。重要な点は、現代の時間生物学の基盤を創ったユルゲン・アショフが、睡眠・覚醒と体温リズムは異なるメカニズムで調節されている事を示した点にある (Aschoff Science 1965)。つまり、睡眠・覚醒を調節する神経回路と、体温を調節する神経回路は独立に存在する事が示唆されている。さらに申請者の予備実験結果から、体温調節の観点においても、概日時計は、“24 時間の体温リズム”だけでなく、“休眠による低体温誘導”も調節している事に気が付いた。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウスを用い、概日時計による体温調節メカニズムを神経回路レベルで明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子改変マウスを用いた体温調節

マウスを低温条件下で絶食を行うと体温が 30 度以下に低下する事が知られている。これを休眠と呼ぶ。この休眠と概日時計との関連性を明らかにするため、時計遺伝子欠損マウスを用い環境温度 16 度で Cry 欠損マウスおよび野生型マウスを飼育し、絶食を 24 時間行った。マウスの体温は腹腔内に埋め込んだロガーを用いて経時的に計測した。

#### (2) 視交叉上核と休眠調節

視交叉上核の神経活動は、昼間に高く夜に低い明瞭な概日リズムを示す。視交叉上核の神経活動と休眠の関連性を明らかにするため、視交叉上核に電極を挿入し、自発発火頻度を経時的に計測し、休眠導入のタイミングと視交叉上核の神経活動の相関関係を検証した。また、視交叉上核に光誘導性陽イオンチャネル、ChR2、発現させ、光ファイバーを視交叉上核に挿入し、通常休眠がみられる時間帯に青色光を照射し、休眠が抑制されるかどうかを検証した。

#### (3) 休眠のタイミングを調節する神経経路の探索

視交叉上核に ChR2 を発現させ、光照射を行い休眠を抑制したマウスと、光照射を行わず休眠を誘導させたマウスの脳をサンプリングし、神経活動マーカーである c-fos の免疫染色を全脳レベルで検証した。

### 4. 研究成果

野生型および時計遺伝子欠損マウスを用い、休眠の出現頻度が一日のうちどこに多く見られるかを検証した。その結果、休眠のタイミングは絶食を開始する大道具ではなく、内因性の時間に依存したタイミングで誘導される事が分かった。この結果は、休眠のタイミングが概日時計により調節している事を示す。また、視交叉上核の神経活動を計測したところ、神経発火が最も低い時間帯に日内休眠が始まる事が分かってきた。さらに視交叉上核特異的に ChR2 を発現させ、神経活動を操作したところ、視交叉上核の神経活動の上昇により、日内休眠が抑制されることを見出した。これらの結果は、視交叉上核の神経活動が休眠を抑制している可能性を示唆する。

これまでの研究結果から、マウスを低温環境下で絶食を行うと主観的夜間の中心から休眠が誘導されること、そしてその時間帯は、概日時計中核の視交叉上核の神経発火が最も低い時間であることが明らかになってきた。さらに、視交叉上核特異的に ChR2 を発現させ、神経活動を捜査したところ、視交叉上核の神経活動の上昇により、休眠が抑制されることを見出した。さらに視交叉上核の出力経路を探索し、休眠のタイミングを担う神経経路の同定を進めた。初めに、プレシナプスのマーカーであるシナプトファイジンに GFP を結合させたタンパク質を、アデノ随伴ウイルスを用いて視交叉上核に発現させ、視交叉上核のプレシナプスの所在を確認した。その結果、視交叉上核の神経細胞は複数の脳領域に投射をしていることが明らかになった。次に、ChR2 を視交叉上核に発現させ、光照射により休眠を抑制したマウスと、光照射を行わず休眠が誘導されたマウスの脳をサンプリングし、神経活動のマーカーである c-fos 発現を全脳レベルで検証

した。この二つの実験から、POA, PVN, LSV が睡眠誘導に関連する、視交叉上核の出力先候補として挙がってきた。この情報をもとに、機能的神経回路の探索を進めた。上記同様に、視交叉上核に ChR2 を発現させ、光ファイバーを出力候補領域に挿入し、軸索終末を光照射にて活性化させ、睡眠が抑制されるかどうかを検証した。その結果、POA に存在する視交叉上核の軸索終末を活性化させた時のみ、睡眠の抑制が観察された。この結果は、視交叉上核から POA の経路が睡眠誘導に関与することを示唆する。今後、この経路に関連する分子および細胞の同定を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 9件）

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Ono, D., Wang, H., Hung, J.C., Wang, T.H., Kon, N., Yamanaka, A., Li, Y., and Sugiyama, T.   | 4. 巻<br>9(1)           |
| 2. 論文標題<br>Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus   | 5. 発行年<br>2023年        |
| 3. 雑誌名<br>Science Advances   | 6. 最初と最後の頁<br>eabq7032 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1126/sciadv.abq7032  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する           |
| 1. 著者名<br>Natsubori, A., Hirai, S., Kwon, S., Ono, D., Deng, F., Wan, J., Miyazawa, M., Kojima, T., Okado, H., Karashima, A., Li, Y., Tanaka, F. K., and Honda, M. | 4. 巻<br>1(20)          |
| 2. 論文標題<br>Serotonergic neurons control cortical neuronal intracellular energy dynamics by modulating astrocyte-neuron lactate shuttle                             | 5. 発行年<br>2023年        |
| 3. 雑誌名<br>iScience   | 6. 最初と最後の頁<br>105830   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.isci.2022.105830  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する           |
| 1. 著者名<br>Padlom, A., Ono, D., Hamashima, R., Furukawa, Y., Yoshimura, T., and Nishiwaki-Ohkawa, T   | 4. 巻<br>12             |
| 2. 論文標題<br>Level of constitutively expressed BMAL1 affects the robustness of circadian oscillations  | 5. 発行年<br>2022年        |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>19519    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-022-24188-4  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |
| 1. 著者名<br>Ono, D.  | 4. 巻<br>182            |
| 2. 論文標題<br>Neural circuits in the central circadian clock and their regulation of sleep and wakefulness in mammals   | 5. 発行年<br>2022年        |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience Research  | 6. 最初と最後の頁<br>44932    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neures.2022.05.005  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Rahaman, S.M., Chowdhury, S., Mukai, Y., Ono, D., Yamaguchi, H. and Yamanaka, A.   | 4. 巻<br>15           |
| 2. 論文標題<br>Functional interaction between GABAergic neurons in the ventral tegmental area and serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>808754 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fnins.2022.877054  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Hung, J.C., Yamanaka, A., and Ono, D.   | 4. 巻<br>15:808754    |
| 2. 論文標題<br>Conditional knockout of Bmal1 in corticotropin-releasing factor neurons does not alter sleep/wake rhythm in mice | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Neuroscience   | 6. 最初と最後の頁<br>808754 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fnins.2021.808754   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nishide, S., Suzuki, Y., Ono, D., Honma, S., and Honma, K.  | 4. 巻<br>36(6)         |
| 2. 論文標題<br>The food-entrainable oscillator is a complex of non-SCN activity bout oscillators uncoupled from the SCN circadian pacemaker | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Rhythms   | 6. 最初と最後の頁<br>575-588 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/07487304211047937   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Ono, D., Honma, K., Schmal, C., Takumi, T., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., and Honma S.   | 4. 巻<br>11:19240    |
| 2. 論文標題<br>CHRONO and DEC1/DEC2 compensate for lack of CRY1/CRY2 in expression of coherent circadian rhythm but not in generation of circadian oscillation in the neonatal mouse SCN | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>19240 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-021-98532-5   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Myung, J., Nakamura, T.J., Jones, R.J., Silver, R., and Ono, D. | 4. 巻<br>15:735007    |
| 2. 論文標題<br>Editorial: Development of Circadian Clock Functions            | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Neuroscience                                       | 6. 最初と最後の頁<br>735007 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fnins.2021.735007                     | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Kolarski, D., Mir-Vinyals, C., Sugiyama, A., Srivastava, A., Ono, D., Nagai, Y., Iida, M., Itami, K., Tama, F., Szymanski, W., Hirota, H., and Feringa, L. B. | 4. 巻<br>2.697222222 |
| 2. 論文標題<br>Reversible modulation of circadian time with chronopharmacology  | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>3164  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-021-23301-x  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Ono, D., Honma, K., and Honma S.   | 4. 巻<br>15:650154    |
| 2. 論文標題<br>Roles of Neuropeptides, VIP and AVP, in the Mammalian Central Circadian Clock | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>650154 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fnins.2021.650154                                    | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ono, D.   |
| 2. 発表標題<br>The central circadian clock regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus |
| 3. 学会等名<br>Journal of Neurochemistry Mini-meet (招待講演) (国際学会)                                     |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ono, D., Wang, H., Hung, J.C., Wang, T.H., Kon, N., Yamanaka, A., Li, Y., and Sugiyama, T.      |
| 2. 発表標題<br>Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in mouse suprachiasmatic nucleus |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on Chronogenesis (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ono, D.   |
| 2. 発表標題<br>Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in mouse suprachiasmatic nucleus |
| 3. 学会等名<br>第29回日本時間生物学会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ono, D., Hung, J.C., Yamanaka, A., and Sugiyama, T.                       |
| 2. 発表標題<br>Network driven circadian cAMP rhythm in the mouse suprachiasmatic nucleus |
| 3. 学会等名<br>NEURO2022   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小野大輔, Huan Wang, Chi Jung Hung, Hsin-tzu Wang, 山中章弘, Yulong Li, 杉山崇                           |
| 2. 発表標題<br>Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus |
| 3. 学会等名<br>第100回日本生理学会   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ono, D.   |
| 2. 発表標題<br>Circadian output pathways from the suprachiasmatic nucleus that control sleep and wakefulness |
| 3. 学会等名<br>第99回日本生理学会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>小野大輔                    |
| 2. 発表標題<br>中枢概日時計細胞の同期・非同期状態と生後発達  |
| 3. 学会等名<br>第72回コロナおよび界面化学討論会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2021年                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ono, D., Mukai, Y., Hung, C. J., Chowdury, S., Sugiyama, T., and Yamanaka A.          |
| 2. 発表標題<br>The central circadian clock regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus |
| 3. 学会等名<br>第44回日本神経科学大会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小野大輔, Chi Jung Hung, 杉山崇, 山中章弘   |
| 2. 発表標題<br>Optical recording of intracellular cAMP rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus |
| 3. 学会等名<br>第28回日本時間生物学会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ono, D.   |
| 2. 発表標題<br>The suprachiasmatic nucleus regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus |
| 3. 学会等名<br>5th Asian forum on chronobiology (招待講演) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| <p>体内時計中枢における細胞内 cAMP の機能を解明<br/> <a href="https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Sci_230105.pdf">https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Sci_230105.pdf</a><br/> My home page<br/> <a href="https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm">https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm</a><br/> 研究ユニットHP<br/> <a href="https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm">https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm</a></p> |
|---|

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 中村 孝博<br><br>(Nakamura Takahiro)<br><br>(00581985) | 明治大学・農学部・専任教授<br><br><br>(32682)      |    |
| 研究分担者 | 山口 裕嗣<br><br>(Yamaguchi Hiroshi)<br><br>(10542970) | 名古屋大学・環境医学研究所・特任助教<br><br><br>(13901) |    |

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 |  |  |  |
|---------|---------|--|--|--|
| 中国      | 北京大学    |  |  |  |