

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15220

研究課題名（和文）冬眠様状態を誘導する神経回路の描出およびその操作

研究課題名（英文）Elucidation of the neural circuits to induce a hibernation-like state

研究代表者

齊藤 夕貴（Saito, Yuki）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70732436

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：Qニューロンは主に視床下部背内側核（DMH）のニューロンを興奮させることによってQIHを惹起することが明らかになっているが、そのニューロンの性質や、さらに下流においてどのようなメカニズムでQIHを引き起こしているのかを解明する必要があった。本研究ではAAV（アデノ随伴ウイルス）ベクターと改変型の狂犬病ウイルスベクターを用いた神経回路トレーシングにより、AVPeのQニューロンから直接入力を受けているDMHのニューロン群を同定し、さらにDMHのターゲットニューロンをオプトジェネティクスによって操作することでその神経回路を構成するニューロンの性質を組織学的・機能的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によりQニューロンによる体温制御メカニズムが明らかになることで、冬眠様状態の理解につながり、将来的にヒトにおいてQニューロンの活動を人為的に操作させる技術の開発につながる可能性が高まる。重篤な外傷や急性疾患では呼吸・循環動態の不全のため重篤な組織障害をきたすことが多いが、冬眠様状態の誘導により全身代謝を下げる事ができれば、救急医療をはじめとした臨床医療においても革命的な変革をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：It has been established that Q neurons primarily excite neurons in the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) to induce QIH, but it was necessary to elucidate the nature of these neurons and the mechanisms by which they cause QIH downstream. In this study, using AAV (adeno-associated virus) vectors and modified rabies virus vectors for neural circuit tracing, we identified a group of DMH neurons that receive direct inputs from AVPe Q neurons. Furthermore, by manipulating these target neurons in the DMH using optogenetics, we clarified the histological and functional characteristics of the neurons constituting this neural circuit.

研究分野：神経科学

キーワード：QRFP 冬眠 低代謝 体温

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとした恒温動物では体温を一定に保つべく、脳内の視床下部視索前野 (Preoptic area) に体温のセットポイントを定める体温調節機構が存在すると考えられている。この体温調節機構とは異なり、恒温動物である哺乳類の一部は寒冷状態や飢餓状態に陥ると自ら代謝を下げてエネルギー消費を抑えようとする行動をとる(1)。このような低代謝状態で24時間以上にわたるものは『冬眠』と定義されており、冬眠中の動物では長期間にわたって種々の生命機能も低活動となるにもかかわらず、全身組織へ障害もなく回復(復温)することができる。このメカニズムは学問的にも非常に注目されているが、冬眠動物そのものを使用しなければ研究ができないため、研究の進展が妨げられていた。そのような中、2020年に非冬眠動物であるマウスの視床下部に存在する前腹側脳室周囲核 (AVPe) に存在する Qrfp 遺伝子を発現するニューロン群を化学遺伝学的に特異的に興奮させることでマウスの体温および代謝が数日間に渡って大幅に低下することが明らかになった(2)。この操作により体温が非常に低い状態でさまざまな生理機能が大きく低下するという、冬眠に非常に酷似した状態を誘導できることが分かり、この冬眠様状態の誘導に参与する神経集団は Q ニューロン (Quiescence-inducing neurons=休眠誘導神経) と名付けられた。Q ニューロンが興奮することにより生じる低代謝は QIH (Q neuron-induced hypometabolism) と呼ばれているが、Q ニューロンがどのように低体温を誘導しているのかについては未だ明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

QIH では自律的な復温後にも組織障害や機能障害が見られないという冬眠状態に非常に酷似した安定的な状態を誘導できる。しかしながら、この QIH はいわばブラックボックスであり、セットポイント温度をどのように調整して低体温を誘導しているのかは未だ謎に包まれている。そこで本研究では QIH のメカニズムを明らかにするために、Q ニューロンの下流ニューロン群の神経回路を同定することが大きなヒントになるのではないかと考え、Q ニューロンの出力系に着目し、各種ウイルスベクターを用いて QIH を引き起こす神経回路を明らかにすることを目的とした。さらに、明らかとなった下流経路に対して光遺伝学的手法を用いて特異的に操作することで新たな冬眠誘導法の可能性も見いだせるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

Q ニューロンは主に視床下部背内側核 (DMH) のニューロンを興奮させることによって QIH を惹起することが明らかになっているが、そのニューロンの性質や、さらに下流においてどのようなメカニズムで QIH を引き起こしているのかを解明する必要があり、下記の方法にて実験を行った。

【方法】 vGluT2-IRES-Cre および vGAT-IRES-Cre マウスを用いて、DMH の各ニューロン群を入力するニューロン群を標識した。AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターと改変型の狂犬病ウイルス (SADΔG-GFP (EnvA)) ベクターを用いた神経回路トレーシングにより、『Q ニューロン→DMH ニューロン』の神経回路を明らかにした。

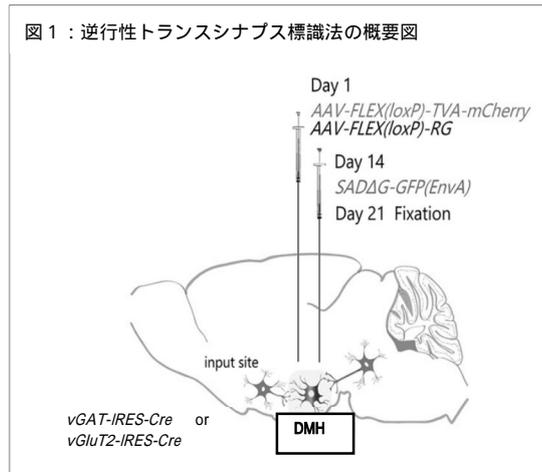
【方法】 組織学的な観点から DMH のターゲットニューロンを同定する一方、DMH から核を調整し単核 RNAseq 解析を行い、QIH により興奮する DMH のターゲットニューロン群を明らかにするべく、Qrfp-iCre;TRAP2 マウスを用いて QIH を誘導により興奮したニューロンをラベルしたマウスの脳をサンプリングし、切り出した DMH から核を抽出し、単核 RNAseq 解析を行い、Fos 発現ニューロン群において共産生されている mRNA を探索した。

【方法】 方法 で明らかになった DMH のニューロン群に対して、そのニューロン群の Cre マウスの DMH ターゲットニューロンにと非視覚型光受容体である hOPN4 を発現させ、軸索末端に対して 450nm~473nm レーザーによる光刺激を行った。光遺伝学的手法によって選択的に操作した際の体温への作用を確認し、体温調節に関する機能を検討した。体温測定の際には 赤外線サーモグラフィカメラによる体表温度の測定、腹腔内に小型機器を埋め込みテレメトリーによる深部体温測定により確認した。

4. 研究成果

【結果】 DMH にはグルタミン酸作動性ニューロンや GABA 作動性ニューロンが存在することが明らかになっている。そこで、逆行性トランスシナプス標識法により vGluT2-IRES-Cre および vGAT-IRES-Cre マウスを用いて、DMH の各ニューロン群に入力するニューロン群を標識した。

図 1 のように AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターとさらに改変型の狂犬病ウイルス (SADΔG-GFP (EnvA)) ベクターをターゲット領域である DMH に投与し、直接入力するニューロン群を GFP によりラベリングした。SAD G ベクター投与から 1 週間後に固定した脳サンプルから切片を作製し、レーザー共焦点顕微鏡を用いて出力先に応じたインプットニューロンの分布を網羅的に観察した。vGluT2-IRES-Cre および vGAT-IRES-Cre マウスでの結果の比較を行った。SAD G-GFP (EnvA) によって一次上流のニューロンが描出され、AVPe の Q ニューロンから直接入力を受けている DMH のニューロン群を同定した。



【結果】 Q ニューロンには 3 つのサブタイプが存在することが分かっており、約 80% がグルタミン酸作動性 (Qe ニューロン)、5% 強が GABA (Qi ニューロン)、残りは vGluT2 と vGAT の両方を発現するハイブリッドタイプ (Qh ニューロン) である。先行研究の結果から、【結果】で明らかとなったインプット Q ニューロンを免疫組織染色や in situ hybridization 法を用いて vGat と vGluT2 の発現を確認し、DMH に投射する Q ニューロンのサブタイプを同定した。

【結果】 QIH 中に DMH で活性されるニューロン群の単核 RNAseq 解析を行うべく、Qrfp-iCre;TRAP2 マウスを用意した。単核 RNAseq を行う事前検討として、このマウスを用いて Fos 発現によりラベルされたニューロンを確認したが、DMH 周囲にも Q ニューロン由来の iCre 発現ニューロンが存在しているため、分離することに技術的な限界が生じた。代わりに、Qrfp-Flp マウスを作製し、Qrfp-Flp;TRAP2 マウスを用いることに方針を変更することとなった。

現在、Qrfp-Flp マウスでの Flp の発現確認や QIH 誘導方法の条件検討および解析を進めている。

【結果】結果 で明らかになった DMH のニューロン群に対して、そのニューロン群特異的に Cre を発現するマウスを用いて、DMH に非視覚型光受容体である hOPN4 を発現させる AAV-FLEX-hOPN4dC-mCherry を投与した。DMH に光ファイバーを埋め込み、450nm~473nm レーザーによる光刺激を行うことで体温の変動を認めた。

上記の結果 ~ により、AVPe に存在する Q ニューロン - DMH の神経回路を構成するニューロンが組織学的および機能的に示唆された。今後、これらの神経回路のさらに上流・下流のニューロン群をターゲットとしたさらなる研究が望まれる。

引用文献

1. Geiser, Curr Biol. 2013
2. Takahashi et al., Nature 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------