

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20738

研究課題名（和文）中枢概日時計のニューロンタイプ特異的な神経核内シナプス接続と核外投射先の解析

研究課題名（英文）Neuron type-specific synaptic connections and projections of the central circadian clock

研究代表者

松井 綾子（MATSUI, Ayako）

金沢大学・総合技術部（医）・技術職員

研究者番号：20961717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：中枢概日時計・視交叉上核（SCN）は、複数のタイプのニューロンで構築される神経ネットワークである。しかしながら、異なるSCNニューロンタイプ間のSCN内におけるシナプス接続様式や、SCNニューロンタイプ毎の脳内における投射パターンは、ほとんど明らかになっていない。本研究では、各種遺伝子改変マウスとウイルスベクターを組み合わせ、SCN内のシナプス接続パターン、およびSCN外への投射パターンについて、ニューロンタイプ毎に検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠に問題を抱える日本人は5人に1人に上る。シフトワークや生活習慣の乱れは様々な疾患・健康障害のリスクを著しく増大する。本研究により、SCN神経ネットワーク概日リズムを発振するメカニズムや、睡眠など様々な生体機能を制御する神経経路を理解するための、有力な手がかりが得られる。さらには、SCNニューロンを人為操作して中枢時計を整調する技術など、概日リズム変調に関連する疾患・健康障害への効果的な対処法の発明につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：The central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus (SCN) is a neural network constructed of multiple types of neurons. However, the synaptic connection patterns within the SCN between different SCN neuron types and the projection patterns within the brain of each SCN neuron type are largely unknown. In this study, we addressed these issues using a combination of various genetically engineered mice and viral vectors.

研究分野：神経生理学

キーワード：概日リズム 視交叉上核 体内時計 局所神経ネットワーク シナプス

1. 研究開始当初の背景

現代社会では時差や夜間勤務、生活習慣の乱れにより、概日（サーカディアン）リズムの変調は誰にでも起こりうる。睡眠障害のみならず、気分障害、肥満、がん等、様々な疾患・健康障害のリスクを増大する。したがって、概日リズム発振のメカニズムを理解し、概日リズム変調の効果的な予防方法・対処方法を見つけることは、大変重要である。

概日リズム制御中枢・中枢時計である視床下部視交叉上核 (SCN) は、全身に時刻情報を送り様々な生体機能を調節する、約2万のニューロンよりなる神経ネットワークである。全SCNニューロンはGABAを含有するが、共発現するペプチドにより特徴付けられる様々なタイプのニューロンが存在する (図1)。SCN shell (背内側部) に分布するAVP (arginine vasopressin) 産生ニューロンと、core (腹側部) に位置するVIP (vasoactive intestinal polypeptide) 産生ニューロンは2つの主要なニューロンタイプである。個々の細胞内で概日リズムを刻む、時計遺伝子群を中心とした分子機構 (分子時計) については、ほぼ明らかになった。一方で、SCNが強固で安定した概日リズムを自律的に発振するには、分子時計だけでは不十分で、SCN細胞間コミュニケーションが必要だが、詳細なメカニズムは不明である。また、SCNが睡眠など様々な生体機能を制御する神経経路についても、意外なほど明らかになっていない。

2. 研究の目的

様々なタイプのSCNニューロンが、SCN内や脳内においてどのような神経ネットワークを形成しているかを明らかにすることを、本研究の目的とした。

神経ネットワークの機能を理解するためには、ネットワーク内の接続パターンや、入出力経路を明らかにすることがとても重要である。SCNは様々なタイプの多くのニューロンが小さな神経核 (長径~0.7mm) に密集しており、SCN内でのニューロンタイプ間の接続パターンや、ニューロンタイプ毎のSCN外への投射パターンは、これまでにほとんど報告されていない。SCN内の構造については、各種ペプチド産生ニューロンの分布を免疫染色やin situ hybridization法で記述した報告は多いが、異なるタイプ間での接続様式に関する報告はほぼ皆無であった。またSCNから他の脳領域への投射パターンに関しては、古典的な順行性トレーサー色素をSCNに注入して投射先を調べた報告はあるが、この手法では、ニューロンタイプ特異的な投射パターンを明らかにすることは不可能である。そこで本研究では、所属する研究室で研究協力者と共にこれまでに作成してきたニューロンタイプ特異的なCre発現マウス、tTA発現マウスを存分に活用し、また研究代表者が作成・開発してきた組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを組み合わせて、この問題に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) SCNのニューロンタイプ毎の投射パターンを明らかにするために、Cre依存的に順行性軸索トレーサーを発現する組換えAAVベクターを作成し、ニューロンタイプ特異的CreドライバーマウスのSCNに局所投与、トレーサーに融合した蛍光タンパク質の蛍光や蛍光抗体法によりマップした。トレーサーとしては、膜タンパク質Channelrhodopsin 2 (ChR2)-EYFPと神経終末に局在するSynaptophysin-GFP等を検討した。

(2) SCN内での2つのニューロンタイプ間のシナプス接続をマッピングするには、mGRASP法を用いた (Kim et al, Nat Methods 2011, doi:10.1038/nmeth.1784)。この方法ではGFPをpre-mGRASPとpost-mGRASPに二分割し、前者をシナプス前細胞、後者をシナプス後細胞にそれぞれ導入することで、両細胞が形成するシナプスでのみmGRASPが再構築されて蛍光が観察される。SCN内の2つのニューロンタイプにpre-mGRASPとpost-mGRASPを導入し分けることになるが、SCNは極小の神経核のため、特異的Cre発現マウスの組み合わせとAAV局所インジェクションのみでは不可能である。この問題を解決するために、一方のニューロンタイプへは特異的Cre発現マウスとCre依存性AAVベクター、他方のニューロンタイプへは特異的tTA発現マウスとtTA依存性 (TRE) AAVベクターを組み合わせた。特に、Avp-CreマウスとVip-tTAマウスの組み合わせを用いて、両ニューロンタイプ間の接続について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 各種AAVベクターを作成、特異的な発現を確認した。具体的には、AAV-EF1 α -DIO-ChR2-EYFP、AAV-EF1 α -DIO-Synaptophysin-GFP、pAAV-TRE-ChR2-EYFP、AAV-CAG-JxON-pre-mGRASP-mCerulean、AAV-CAG-Jx-rev-post-mGRASP-2A-dTomato、AAV-TRE-pre-mGRASP-mCerulean、AAV-TRE-post-mGRASP-2A-dTomatoである。(4)で述べるように、AVPニューロンとVIPニューロンの機能的な接続をin vivoで検証するために、AAV-CAG-FLEX-ChrimsonR-mCherryやAAV-TRE-jGCaMP7s

も作成した。

(2) SCN 内での 2 つのニューロンタイプ間の形態的・機能的接続を調べるためには、両ニューロンタイプで異なる遺伝子を導入し分けることが必要になるが、SCN は極小の神経核のため、特異的 Cre 発現マウスの組み合わせと AAV 局所インジェクションのみでは不可能である。この問題を解決するために、一方のニューロンタイプへは特異的 Cre 発現マウスと Cre 依存的 AAV ベクター、他方のニューロンタイプへは特異的 tTA 発現マウスと tTA 依存的 (TRE) AAV ベクターを組み合わせる方法を用いた。研究室で作成中であった Vip-tTA マウスについて、Avp-Cre マウスと組み合わせる実際にこの方法がうまくいくのか、動作確認を行なった。Avp-Cre;Vip-tTA マウスの SCN に AAV-EF1 α -DIO-mCherry (Cre 依存的) と AAV-TRE-jGCaMP7s (tTA 依存的) の二つの AAV ベクターを混ぜてインジェクションし、AVP、VIP 両ニューロンに mCherry と jGCaMP7s を導入仕分けることに成功した (図 1、Peng et al, 2022)。

(3) 各種特異的 Cre ドライバーマウスの SCN に AAV-EF1 α -DIO-ChR2-EYFP や AAV-EF1 α -DIO-Synaptophysin-GFP をインジェクションし、投射先を検討した。予想通り、ChR2-EYFP に比べ Synaptophysin-GFP を用いた方が明瞭に神経終末をラベルすることができた。特に、SCN shell (背側部) に分布する AVP ニューロンの SCN 内での投射先を Synaptophysin-GFP を用いて詳細に検討し、SCN core (腹側部) の VIP ニューロンへの直接の投射も観察されるが、多くは両ニューロンの分布領域の中間領域に観察された (図 2、Tsunno et al, 2023)。VIP ニューロンの投射は AVP ニューロン上に多く観察された。その他のニューロンタイプ、脳領域についても現在詳細な検討を続けているところである。

(4) (3) で述べた SCN 内での AVP ニューロンから VIP ニューロンへの投射について、機能的な接続であるのか、in vivo で検討を行った。Avp-Cre;Vip-tTA マウスの SCN に AAV-CAG-FLEX-ChrimsonR-mCherry と AAV-TRE-jGCaMP7s を混ぜて感染させ、AVP ニューロンには ChrimsonR (赤色光により開口するカチオンチャネル)、VIP ニューロンには jGCaMP7s (緑色蛍光カルシウムセンサー) を発現させた。外科的に挿入した光ファイバーを通して赤色光を照射して光遺伝学的に AVP ニューロンを活性化した時の、VIP ニューロンの細胞内 Ca²⁺ 応答を自由行動下マウスで計測したところ、明瞭な上昇が観察された (図 3、Tsunno et al, 2023)。現在この応答が、AVP ニューロン→VIP ニューロンの直接の入力によるものなのか、第 3 のニューロンを介した間接的な調節なのか等、詳細な解析を行っている。

(5) SCN 内での AVP ニューロンと VIP ニューロン間のシナプス接続をマッピングするために、Avp-Cre;Vip-tTA マウスの SCN に適切な組み合わせの AAV ベクターをインジェクションし、mGRASP 法を行った。AVP ニューロン: pre-mGRASP、VIP ニューロン: post-mGRASP、VIP ニューロン: pre-mGRASP、AVP ニューロン: post-mGRASP、の両方の組み合わせを検討した。さまざまな条件を検討したが、明瞭なシナプス接続は検出できなかった。SCN における神経ペプチド性神経伝達は、シナプス伝達ではなくボリューム伝達が主要なメカニズムの可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

図 1 SCN 内で AVP (マゼンタ)、VIP (緑) ニューロンに異なる遺伝子を導入

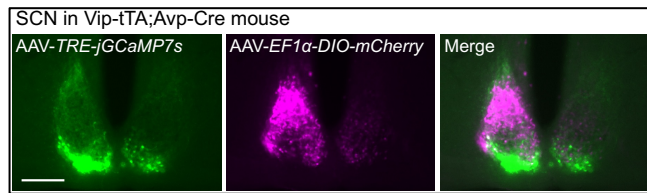


図 2 VIP ニューロン (マゼンタ) 上の AVP ニューロン終末 (緑) の分布

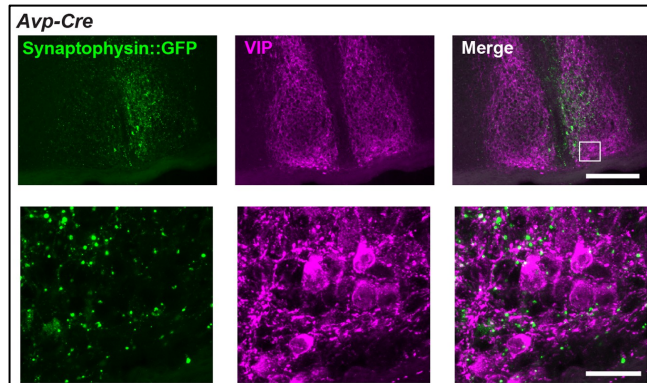
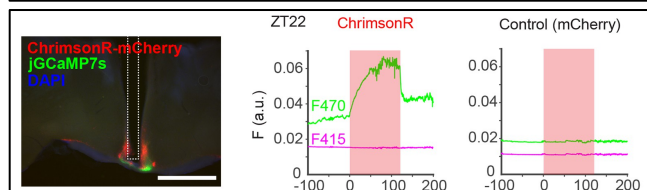


図 3 AVP ニューロン (赤) を光遺伝学刺激した時の VIP ニューロン (緑) の Ca²⁺ 応答



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Peng Y, Tsuno Y, Matsui A, Hiraoka Y, Tanaka K, Horike SI, Daikoku T, Mieda M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell Type-Specific Genetic Manipulation and Impaired Circadian Rhythms in Vip-tTA Knock-In Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Physiol	6. 最初と最後の頁 895633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.895633	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 MT, Maejima T, Matsui A, Mieda M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Paraventricular hypothalamic vasopressin neurons induce self-grooming in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-022-00932-9	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 MT, Rumpf F, Tsuno Y, Kodani S, Sakurai T, Matsui A, Maejima T, Mieda M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Vasopressin neurons in the paraventricular hypothalamus promote wakefulness via lateral hypothalamic orexin neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3871-3885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.07.020	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 該当する

1. 著者名 Tsuno Yusuke, Peng Yubo, Horike Shin-ichi, Wang Mohan, Matsui Ayako, Yamagata Kanato, Sugiyama Mizuki, Nakamura Takahiro J., Daikoku Takiko, Maejima Takashi, Mieda Michihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 In vivo recording of suprachiasmatic nucleus dynamics reveals a dominant role of arginine vasopressin neurons in circadian pacesetting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3002281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3002281	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Peng Y, Tsuno Y, Matsui A, Hiraoka Y, Tanaka K, Horike SI, Daikoku T, Mieda M.
2. 発表標題 Histological and behavioral characterization of Vip-tTA knock-in mice
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津野 祐輔、彭 雨波、堀家 慎一、王 墨涵、松井 綾子、山形 要人、杉山 瑞輝、中村 孝博、大黒 多希子、前島 隆司、三枝 理博
2. 発表標題 神経細胞種特異的ノックアウトマウスを用いた視交叉上核概日リズムのin vivo解析
3. 学会等名 日本睡眠学会 / 日本時間生物学会
4. 発表年 2023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
---------	---------