

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659871

研究課題名（和文） 微小脳領域特異的温度多点測定系の開発

研究課題名（英文） In vivo recording of brain temperatures from multiple site in mice.

研究代表者

中村 渉 (NAKAMURA WATARU)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授

研究者番号：60372257

研究成果の概要（和文）：哺乳類の体温は、末梢皮膚温度と深部体温では機能的に異なるパラメーターである。本研究ではマウス脳温の測定系を開発した。脳深部視床下部および浅部大脳皮質に温度プローブを挿入し、自由に行動するマウスの脳温変化を記録することに成功した。記録は1分刻みの時間解像度で2週間にわたり、その間輪回し行動量を同時に測定した。深部脳音は夜行性行動量の増加に伴って概日変動をみとめた。それに加えて、より短周期のウルトラディアン変動を示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文） The core body temperature and the peripheral one are distinct parameters in physiological function. In this study, circadian variations of deep brain temperature were recorded in freely moving mice. Micro thermistor probes were inserted aiming either into unilateral hypothalamus and the surface in cortex. Brain temperatures were recorded from freely moving mice with wheel running activity. In parallel to nocturnal activity in behavior, circadian variation of brain temperature was clarified. Furthermore, an ultradian variation was obvious as well. :

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：脳温、マウス、in vivo 記録、サーカディアンリズム研究分野：

1. 研究開始当初の背景

1日24時間の時を刻む体内時計機構はその最小単位が単一細胞内に内在する時計遺伝子転写翻訳ネガティブフィードバックループにあることが明らかになっている。単一細胞時計が集まり組織時計を形成し、さらに組織・臓器間の時計が調節されて成体としてのサーカディアンリズムが形成される階層構造のなかで、単一時計神経細胞間のサーカディアンリズムカップリング、及び、中枢時計（視床下部・視交叉上核）と局所脳機能領

域間とのサーカディアンリズムカップリングを中継する要素は未だ明らかにされていない。本研究では、「温度」をユニバーサルに作用するリズム共役要素と仮定する。マウス個体における体温のサーカディアン動態を時間解像度よく記録した例はいまだ報告されていない。そこで本研究では微小脳領域における温度変化を測定する。

2. 研究の目的

In vivo における自由行動下マウスの脳温多点同時連続記録系を確立することにより、恒温動物脳温の変動を明らかにして、リズム共役要素として作用する可能性を検証する。さらに「温度」の神経細胞間カップリングを検証する *in vitro* 実験系を構築するための基礎データ取得を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) マウス個体自発行動リズム測定系

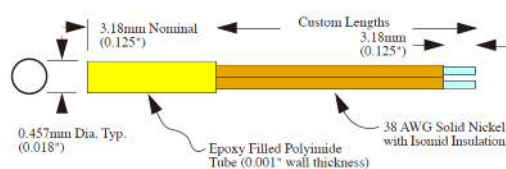
In vivo 測定系の確立にあたり、自発行動モニターの方法として、受動型赤外線センサーによるケージ内移動カウント法と輪回し行動カウント法の2種類を設置した。

(2) 視交叉上核 *in vivo* 多神経活動リズム測定系

Per1^{-/-} 視交叉上核の神経活動リズム出力を計測するため、*in vivo* Multi-unit Neural Activity 系を設置した。

(3) カスタム脳温プローブの作成

Beta Therm 社製マイクロサーミスタチップを使用し微小サーミスタプローブを作成した。プローブ挿入時の脳組織損傷を最小限に抑えるためプローブの先端は $500\ \mu\text{m}$ 以下になるようデザインし、脳の偏側（左側に固定）に複数のプローブを挿入することにより、多点同時計測を達成した。サーミスタチップで検知した電圧変動は、1分毎に既成のデータログに記録した。



(図1) サーミスタチップの構成

チップの直径は $500\ \mu\text{m}$ 以下であり、複数脳内に挿入しても自発行動に影響を与えない。

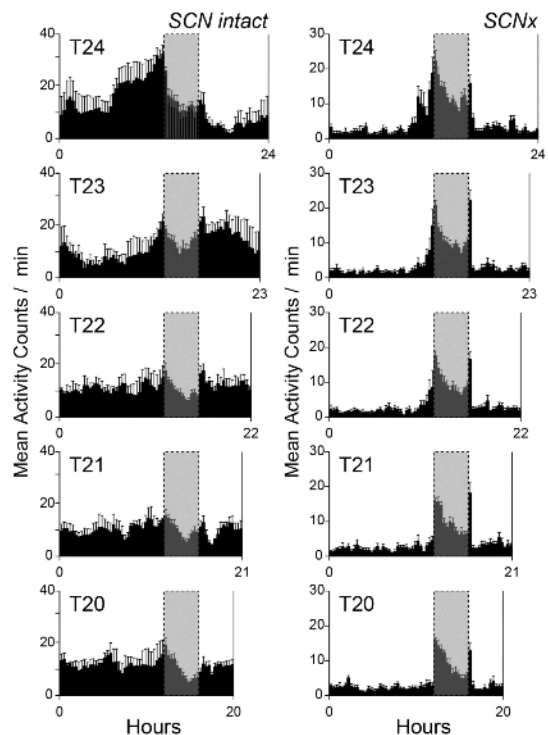
(4) *in vivo* 脳微小領域温度多点測定系

作成したサーミスタプローブ2本を脳内に挿入し、自由行動下マウスより2週間にわたって脳温の変動を連続測定した。

4. 研究成果

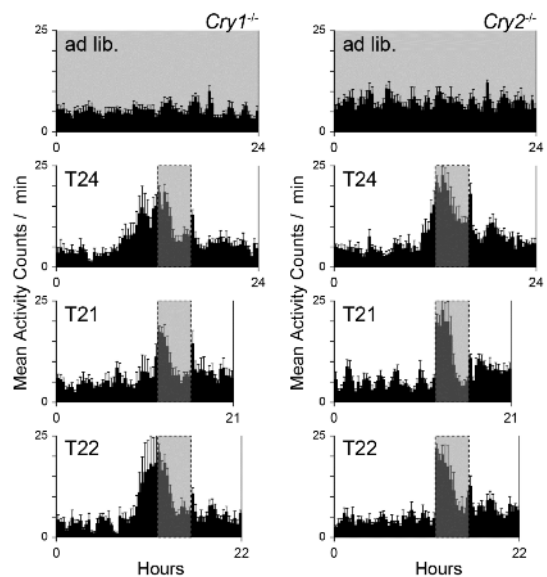
(1) マウス個体自発行動リズム測定系

2種類の自発行動測定系から、受動型赤外線センサーによる行動測定を選択し、視交叉上核に依存しないサーカディアン行動リズム発現機構を解析した。



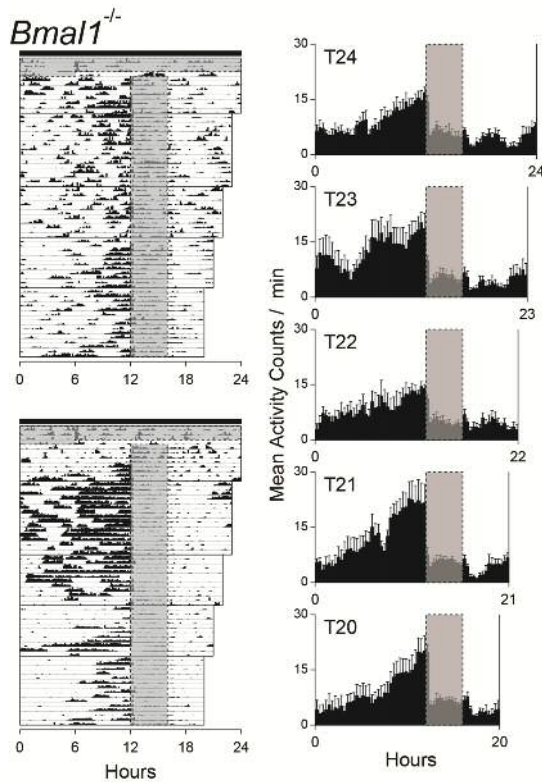
(図2) 時間制限給餌条件下の給餌予知行動の表出 視交叉上核破壊マウスにおいて概日周期依存的に予知行動が出現する。

サーカディアン短周期変異 *Cry1KO* マウスと長周期変異 *Cry2KO* マウスにおいて予知行動サーカディアンリズムは同調範囲が異なり、*Cry1KO* マウスは *Cry2KO* マウスよりも短いサーカディアンサイクル制限給餌に対して予知行動を表出した。



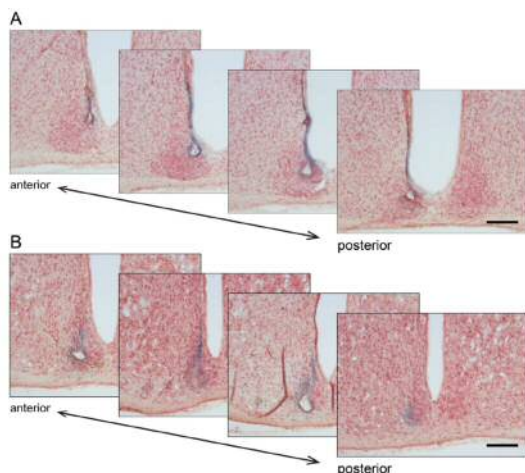
(図3) *Cry1KO* マウスと *Cry2KO* マウスの給餌予知行動の表出 視交叉上核破壊 *CryKO*

マウスにおいて予知行動が出現する周期が異なる。

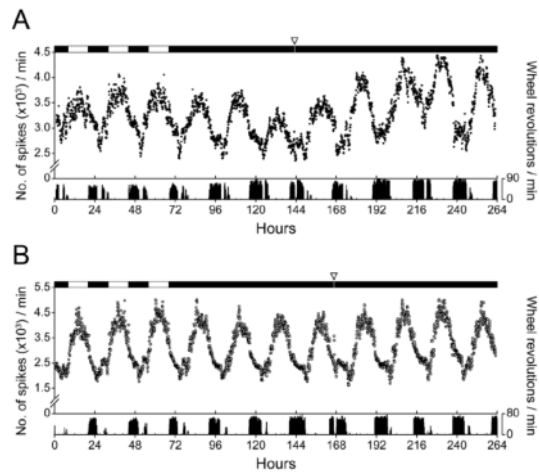


(図4) *Bmal1*KO マウスの給餌予知行動の表出 *Bmal1*KO マウスは24~20時間の周期的制限給餌に予知行動を表出した。

(2) 視交叉上核 *in vivo* 多神経活動リズム測定系



(図5) MUA 測定電極が挿入された視交叉上核組織像 吻側から尾側にかけて、背側から腹側にかけて、電極先端のトレースが視交叉上核全体に及んでいる。



(図6) *Per1*^{-/-} 視交叉上核の神経活動リズム出力 野生型 (A) と遜色ないサーカディアン MUA リズムを表出した。

(3) *in vivo* 脳微小領域温度多点測定系

行動測定と神経活動記録系を応用し、カスタムサーミスタープローブを用いた *in vivo* 脳微小領域温度多点測定を行った。脳深部視床下部および浅部大脳皮質に温度プローブを挿入し、自由に行動するマウスの脳温変化を記録することに成功した。記録は1分刻みの時間解像度で2週間にわたり、その間輪回し行動量を同時に測定した。深部脳温は夜行性行動量の増加に伴う概日変動をみとめた。それに加えて、より短周期のウルトラディアン変動を示すことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

① Takasu NN, Pendergast JS, Olivas CS, Yamazaki S, Nakamura W. *In vivo* monitoring of multi-unit neural activity in the suprachiasmatic nucleus reveals robust circadian rhythms in *period1*^{-/-} mice. *PLoS ONE* 8(5): e64333 (2013) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0064333

② Takasu NN, Kurosawa G, Tokuda IT, Mochizuki A, Todo T, Nakamura W. Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock-deficient mice. *PLoS ONE*. 7(11): e48892 (2012) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0048892

③ Tanaka M, Yamaguchi E, Takahashi M, Hashimura K, Shibata T, Nakamura W, Nakamura TJ. Effects of age-related dopaminergic neuron loss in the substantia nigra on the circadian rhythms of locomotor activity in mice. *Neurosci. Res.* 74(3-4): 210-215 (2012) 査読有

doi: 10.1016/j.neures.2012.09.005

④Honma S, Ono D, Suzuki Y, Inagaki N, Yoshikawa T, Nakamura W, Honma K. Suprachiasmatic nucleus: cellular clocks and networks. *Prog Brain Res.* 199:129-41. (2012) 査読有
doi: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00029-0.

⑤中村 渉: 概日時計による生体制御と消化器機能 *Gastrointestinal Research.* 20:389-394 (2012) 査読なし

⑥中村 渉: 睡眠・覚醒・摂食行動の概日リズム制御. *BRAIN and NERVE.* 64(6):647-656, (2012) 査読なし

⑦中村 渉: 食事前行動のサーカディアンリズム制御機構. *自律神経.* 49(2):59-62 (2012) 査読なし

⑧Takasu NN, Toichi M, Nakamura W. Importance of regular lifestyle with daytime bright light exposure on circadian rhythm sleep-wake disorders in pervasive developmental disorders. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 47(2):141-149 (2011) 査読有
doi.org/10.1016/j.jdsr.2011.04.001

⑨Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, Block GD. Age-Related Decline in Circadian Output. *J Neurosci.* 31(28):10201-10205 (2011) 査読有
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0451-11.2011

〔学会発表〕(計 17 件)

①中村 渉: 時計遺伝子 K0 マウスの給餌予知行動サーカディアンリズム制御機構, 第 35 回日本分子生物学会ワークショップ『概日リズムの発振と制御の分子ネットワーク』(2012 年 12 月 11-14 日, 福岡) (2012 年 12 月 14 日発表)

②中村 渉: げっ歯類の食事サイクル同調の特徴と性質, 第 19 回日本時間生物学会『末梢臓器振動体の臓器特異性、同調、相互作用』(2012 年 9 月 15-16 日, 北海道) (2012 年 9 月 15 日発表)

③中村 渉: 体内時計神経回路の加齢変化, 第 5 回東京アンチエイジングアカデミー(2012 年 6 月 21 日, 東京)

④中村 渉: 体内時計中枢・視交叉上核の機

能的入出力と概日行動リズム制御機構, 第 117 回日本解剖学会 (2012 年 3 月 26-28 日, 山梨) (2012 年 3 月 26 日発表)

⑤中村 渉: 食事前行動のサーカディアンリズム制御機構, 第 64 回日本自律神経学会総会 (2011 年 10 月 27-28 日, 秋田) (2011 年 10 月 27 日発表)

〔その他〕
ホームページ等
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~chrono/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 渉 (NAKAMURA WATARU)
大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授
研究者番号: 60372257

(2) 研究協力者

中村 孝博 (NAKAMURA TAKAHIRO)
帝京平成大学・薬学部・講師
研究者番号: 00581985

高須 奈々 (TAKASU NANA)
京都大学・医学系研究院・日本学術振興会
特別研究員 (PD)
研究者番号: 30467394

内田 仁司 (UCHIDA HITOSI)
大阪大学・大学院歯学研究科・特別研究員
(DC2)