

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15039

研究課題名(和文) 真の概日中枢時計ニューロンの同定

研究課題名(英文) Identification of bona fide circadian pacemaker neurons

研究代表者

三枝 理博 (Mieda, Michihiro)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20296552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類における概日リズム中枢は視交叉上核(SCN)である。SCNは約2万の、多様な種類のニューロンから構成される。本研究では、SCNの主要な二つのニューロンタイプ、AVPニューロンとVIPニューロンのみで概日時計の分子機構が機能すれば、SCN全体や行動の概日リズム発振に十分であるとの可能性を検討したが、否定的な結果が得られた。その他、AVPニューロンやVIPニューロンの電気生理学的性質の日内変動を見出すなどの成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The suprachiasmatic nucleus (SCN), the primary circadian pacemaker in mammals, is a network structure composed of multiple types of neurons. Here, we examined the possibility that functional molecular machinery of the circadian clocks only in AVP neurons and VIP neurons, two major neuron types of the SCN, is sufficient for the generation of circadian rhythms of the SCN and behavior, which was not supported by the experimental results. We also obtained several other results, including the observation of diurnal rhythms in the activity of AVP neurons and VIP neurons in SCN slices.

研究分野：生理学

キーワード：概日リズム 視交叉上核 体内時計 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類における概日リズム中枢は視交叉上核(SCN)である。SCNは約2万の、多様な種類のニューロンから構成される。SCNが概日振動を発振するには、この多種・多数のニューロン間の機能的神経ネットワークの構築が必須であるが、その動作原理はほとんど分かっていない。

SCNニューロンを高密度で分散培養すると、ほとんどの細胞で神経発火頻度や時計遺伝子発現の概日リズムが観察される。一方で、細胞間の相互作用がほとんど無い低密度での分散培養や、SCNニューロン間の同調因子である vasoactive intestinal peptide (VIP) を欠損したマウスの SCN スライスおよび高密度分散培養では、20-30%の細胞でのみ自律的な概日振動が観察される (Aton et al, Nat Neurosci 2005, Webb et al, PNAS 2009)。これらの報告から、多数の SCN ニューロンの中でも、一部の細胞のみが自律的な概日振動を発振し、他の SCN ニューロンの概日振動を引き起こす可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに研究代表者らが開発したツールとノウハウを駆使し、SCNが概日リズムを発振するのに十分な、「真の時計ニューロン」の同定を目指した。

(1) 「SCN内のこの種類のニューロンが概日分子時計を持てば、SCNおよび個体レベルで概日リズムが発生する」と言えるニューロン(真の時計ニューロン)を同定する。

(2) 同定した真の時計ニューロンの概日振動の特性を詳細に解析する。そのために、ニューロンタイプ特異的に時計遺伝子発現リズムをモニターできる新たなレポーターマウスも開発する。

(3) 光遺伝学や化学遺伝学の手法などで同定した真の時計ニューロンの神経発火を再現し、概日リズム発振に十分であることを示す。

3. 研究の方法

研究代表者らはこれまでに、SCN神経ネットワークの動作原理を解明するための遺伝学的ツールとして、SCNの主要なニューロンタイプである AVP (arginine vasopressin)ニューロンや VIP ニューロンに特異的に組換え酵素 Cre を発現する BAC トランスジェニックマウスなどを開発した。

(1) 時計遺伝子 Bmal1 は細胞内で機能する概日時計の分子機構に必須の因子であり、その全身欠損マウス (Bmal1^{-/-}マウス) は概日リズムを示さない。AVPニューロンあるいはVIPニューロン特異的 Cre 発現アレルを持つ Bmal1^{-/-}マウス (Avp-Cre;Bmal1^{-/-}、Vip-Cre;Bmal1^{-/-}マウス) を作製する。これらのSCNに、DIO (double-flxed inverse open reading frame)/FLEX(Flip excision)スイッチを用いて Cre 発現細胞のみで Bmal1 プロモ

ーター制御下で Bmal1 を発現する組換え AAVベクターを局所感染させ、SCNのAVPあるいはVIPニューロンのみで Bmal1 が発現し分子時計が機能するマウスを作製した。これらマウスの自発活動概日リズムを、受動型赤外線センサーを用いて明暗、恒暗下で測定した。

(2) SCNニューロンの発火頻度にも概日変動がある。スライスを用いた SCNニューロンの電気生理学的解析は数多いが、いずれもニューロンタイプを同定せず様々な種類のニューロンを一まとめにして解析している。本研究ではそれぞれのニューロンタイプの神経活動を測定した。

前述のニューロンタイプ特異的 Cre 発現マウスと、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するレポーターマウス (Ai14マウス) を交配し、各ニューロンタイプをラベルしたマウスを作成した。これらのマウスから SCN スライスを様々な時刻に作製し、パッチクランプ法により発火頻度、静止膜電位、膜抵抗などを測定した。

(3) Avp-Cre あるいは Vip-Cre マウスの SCN に、興奮性の DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) である hm3Dq-mCherry を Cre 依存的に発現する AAV ベクターを感染させ、CNO (clozapine-N-oxide, hm3Dq の特異的リガンド) を腹腔内に投与し、AVPニューロン、VIPニューロンを特異的に活性化する。

4. 研究成果

(1) 約 2kb の Bmal1 遺伝子プロモーターに FLEX スイッチに挟んだ Bmal1 cDNA をつなげて、Cre 依存的に Bmal1 を発現する組換え AAVベクター (AAV-Bmal1-FLEX-Bmal1) を作成した。この AAV ベクターを、Avp-Cre;Bmal1^{-/-}マウスの SCN に局所感染させ、SCN スライスの抗体染色を行うことで、実際に BMAL1 が発現することを確認した。

(2) 次に、Avp-Cre;Bmal1^{-/-}あるいは Vip-Cre;Bmal1^{-/-}マウスの SCN に AAV-Bmal1-FLEX-Bmal1 を感染させ、SCNのAVPあるいはVIPニューロンのみで Bmal1 が発現し分子時計が機能するマウスを作製した。これらマウスの自発活動概日リズムを、受動型赤外線センサーを用いて測定したが、自発活動概日リズムは復活しなかった。

(3) (2)の結果を受けて、AVPニューロン、VIPニューロンのいずれかではなく、両方のニューロンに Bmal1 が発現して細胞時計が機能すれば、SCN が概日リズムを発振できる可能性を検討した。そのために、Avp-Cre;Bmal1^{-/-};Vip-Cre;Bmal1^{-/-}マウスを作成し、SCNにAAV-Bmal1-FLEX-Bmal1を感染させた。残念ながらこのマウスについても、自発活動概日リズムは復活しなかった。

概日リズムが復活しなかった原因としては、①AVP、VIPニューロン以外のニューロン

タイプも概日リズム発振に關与する、② Bmal1^{-/-}マウスの SCN では、発生期の障害により神経ネットワークが正常に発達しておらず、成獣になってから Bmal1 発現を回復しても中枢概日時計としての機能は回復しない、等の可能性が考えられた。

(4) SCN スライスにおいて、AVP ニューロン、VIP ニューロンの電気生理学的解析を行った。AVP ニューロン、VIP ニューロンともに、発火頻度、静止膜電位などに、日内変動が観察された。

(5) ニューロンタイプ特異的に時計遺伝子発現リズムをモニターできる、新たなレポーターAAV を開発した。具体的には、約 2kb の Bmal1 遺伝子プロモーターに FLEX スイッチに挟んだ luciferase cDNA をつなげて、Cre 依存的に Bmal1 を発現する組換え AAV ベクター (AAV-Bmal1-FLEX-Luc) を作成した。この AAV ベクターを、Avp-Cre マウスの SCN に局所感染させ、SCN スライスにおいて発光イメージングを行うと、微弱ではあるが、発光強度の概日リズムが観測された。

(6) AVP ニューロン、VIP ニューロンに特異的に hM3Dq を発現させ、様々な時刻において CNO を投与し、自発活動概日リズムの位相が変化するか、検討した。VIP ニューロンに hM3Dq を発現したマウスにおいて、ZT14 に CNO を投与すると、概日行動リズムの位相が約 3 時間後退した。逆に、ZT22 に CNO を投与すると、概日リズムの位相が約 1 時間前進した。AVP ニューロンについても同様の検討を行ったが、大きな変化は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, Mieda M, Herzog ED. Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Current Biology*, 2017, 27(7):1055-1061, 10.1016/j.cub.2017.02.037. 査読有
- ② Takarada T, Xu C, Ochi H, Nakazato R, Yamada D, Nakamura S, Kodama A, Shimba S, Mieda M, Fukasawa K, Ozaki K, Iezaki T, Fujikawa K, Yoneda Y, Numano R, Hida A, Tei H, Takeda S, Hinoi E. Bone Resorption Is Regulated by Circadian Clock in Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2017, 32(4):872-881, 10.1002/jbmr.3053. 査読有
- ③ Enoki R, Oda Y, Mieda M, Ono D, Honma S, Honma KI. Synchronous circadian

voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(12):E2476-E2485, 10.1073/pnas.1616815114. 査読有

- ④ Mieda M, Hasegawa E, Kessaris N, Sakurai T. Fine-Tuning Circadian Rhythms: The Importance of Bmal1 Expression in the Ventral Forebrain. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, 11:55, 10.3389/fnins.2017.00055. 査読有
- ⑤ Nakazato R, Hotta S, Yamada D, Kou M, Nakamura S, Takahata Y, Tei H, Numano R, Hida A, Shimba S, Mieda M, Hinoi E, Yoneda Y, Takarada T. The intrinsic microglial clock system regulates interleukin-6 expression. *Glia*, 2017, 65(1):198-208, 10.1002/glia.23087. 査読有
- ⑥ Okamoto K, Yamasaki M, Takao K, Soya S, Iwasaki M, Sasaki K, Magoori K, Sakakibara I, Miyakawa T, Mieda M, Watanabe M, Sakai J, Yanagisawa M, Sakurai T. QRFP-Deficient Mice Are Hypophagic, Lean, Hypoactive and Exhibit Increased Anxiety-Like Behavior. *PLoS One*, 2016, 11(11):e0164716, 10.1371/journal.pone.0164716 査読有
- ⑦ Mieda M, Okamoto H, Sakurai T. Manipulating the Cellular Circadian Period of Arginine Vasopressin Neurons Alters the Behavioral Circadian Period. *Current Biology*, 2016, 26(18):2535-42. 10.1016/j.cub.2016.07.022 査読有
- ⑧ 三枝理博, 視交叉上核のバソプレシン産生ニューロンの細胞時計はニューロンのあいだの連絡の制御をとおり行動の概日リズムを制御する, *ライフサイエンス新着論文レビュー*, 2015, 10.7875/first.author.2015.034. 査読無
- ⑨ 三枝理博, 概日時計による睡眠の調節, *実験医学*, 2015, 33(13):2071-76 査読無
- ⑩ Mieda M, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma K, Honma S, Sakurai T. Genetic dissection of neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker. *Circadian Clocks, The proceeding volume of Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2014*, 2015, 141-150. 査読無

[学会発表] (計 20 件)

- ① 三枝理博, バソプレシン産生ニューロンは視交叉上核のペースメーカー機能に重要な役割を果たす、AVP neurons play a critical role in the circadian

- pacemaking of SCN. 第 94 回日本生理学会大会、2017/3/30、アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)
- ② 三枝理博、オレキシンによる睡眠・覚醒調節におけるモノアミンニューロンの役割、第 23 回 日本時間生物学会学術大会、2016/11/13、名古屋大学 豊田講堂 (愛知県・名古屋市)
- ③ Mieda M, AVP neurons play a critical role in the circadian pacemaking of the SCN、Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2016、2016/11/10、Special Conference Room, Hokkaido University School of Medicine. (北海道・札幌市)
- ④ Mieda M, Roles of monoamine neurons in sleep-wake regulation by orexin neurons in Brain mechanisms of sleep-wake cycle. ISC 2016, The 29th Conference of the International Society for Chronobiology、2016/10/24-28、Suzhou (People's Republic of China)
- ⑤ Mieda M, Okamoto H, & Sakurai T、Manipulating the cellular circadian period of AVP neurons alters the behavioral circadian period. AVP ニューロンの細胞時計の周期に応じて概日行動リズムの周期も変化する、Neuroscience 2016、2016/7/20、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑥ Mieda M, Okamoto H, & Sakurai T、Manipulating the cellular circadian period of AVP neurons alters the behavioral circadian period. SRBR 2016、2016/5/23、Palm Harbor, Florida (United States of America)
- ⑦ 三枝理博、中枢概日ペースメーカーにおけるバソプレシン産生ニューロンの役割、第 121 回日本解剖学会 総会 全国学術集会、2016/3/28、ビッグパレットふくしま (福島県・郡山市)
- ⑧ Mieda M、Genetic dissection of neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker. 第 93 回日本生理学会大会、2016/3/22、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- ⑨ 三枝理博、中枢概日時計におけるバソプレシン産生ニューロンの役割、Roles of vasopressin-producing neurons in the central circadian pacemaker. BMB2012、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015/12/4、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ⑩ 三枝理博、小野大輔、長谷川恵美、岡本仁、本間研一、本間さと、& 櫻井武、中枢概日時計におけるバソプレシン産生ニューロンの役割。第 22 回日本時間生物学会学術大会、2015/11/21、東京大

学本郷キャンパス 伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)

- ⑪ Mieda M、Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. Asian Forum on Chronobiology、2015/9/8、Conference Hall of Hokkaido University (北海道・札幌市)
- ⑫ Mieda M、Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. XIV European Biological Rhythms Society Congress (EBRS)、IV World Congress of Chronobiology (WCC)、2015/8/4、Manchester (The United Kingdom)
- ⑬ 三枝理博、オレキシンニューロンの下流でナルコレプシーを抑制する神経回路、第 40 回日本睡眠学会定期学術集会、2015/7/3、栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 理博 (MIEDA, Michihiro)
金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授
研究者番号：20296552

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

桜井 武 (SAKURAI, Takeshi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60251055

(4) 研究協力者

()