

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05036
研究課題名：冬眠様の低代謝状態を誘導する神経機構の解明と応用
研究代表者氏名（ローマ字）：桜井 武（SAKURAI Takeshi）
所属研究機関・部局・職：筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60251055

研究の概要：Qニューロンの神経回路・作用機序を探ることにより冬眠様状態を誘導するメカニズムを探る。QIHが意識・記憶や自律神経系機能、体内時計などの生理機能は低代謝状態においてどのように機能しているのかを明らかにする。またQニューロンを興奮させるための低分子化合物を探索するための分子同定を目指す。

研究分野：神経生理学

キーワード：冬眠、低代謝、視床下部、人工冬眠

1. 研究開始当初の背景

一部の哺乳類は冬季などに飢餓から生き延びるため基礎代謝を低下させるために低体温を維持し、エネルギーを節約する生存戦略として冬眠を行う。冬眠中の動物は非活動状態となり基礎代謝が低下し、種々の生命機能は大幅に低活動になり、その状態が長時間維持され何らの障害なく復温する。一方、重篤な外傷や急性疾患では呼吸・循環動態の不全のため、全身組織に必要な酸素を供給できず、重篤な組織障害を引き起こすことが多い。特に脳は酸素需要が高いため、致命的なダメージを負うことがよくある。もし、冬眠様の状態を誘導し、全身の代謝を下げることができれば、酸素需要自体を減らすことが可能となり、さまざまな臨床医療において、革新的な変革をもたらす可能性がある。われわれは、最近、マウスの視床下部の一部の小領域（前腹側脳室周囲核, AVPe）に存在し、神経ペプチド QRFP 遺伝子を発現する神経を特異的に興奮させるとマウスの体温が数日間に渡って大きく低下し併せて代謝も著しく低下することを明らかにした（Takahashi et al., Nature 2020）。この冬眠様状態の誘導に關与する神経集団をQニューロン（Quiescence-inducing neurons=休眠誘導神経）Qニューロンが興奮することにより生じる低代謝をQIH（Q neuron-induced hypometabolism）と名付けた。QIHでは、冬眠と同様に体温セットポイントも低下しており、復温後なんの機能障害・組織障害もみられなかった。

2. 研究の目的

目標 A 下流ニューロンの性質や、さらに下流のQIH誘導機構の解明をめざす。**目標 B** QIHが生理・神経機能にもたらす影響を詳細に明らかにすることを目指す。そのために、QIH中の記憶、睡眠、体内時計、自律神経系を解析していく。**目標 C** マカクザルを用いて霊長目におけるQIH誘導を試みる（松本）。**目標 D** Qニューロンの網羅的遺伝子発現解析を行い受容体を含めできるだけQニューロンに特異的な分子を見出すとともに、スライス標本を用いて、Qニューロンに特異的に作用する物質の検討を行い、低分子化合物によってQニューロンを操作する方法を見出すことにつなげる知見を見出す。

3. 研究の方法

目標 A: Qニューロンは約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の両方を発現するもの(Qhニューロン)であり、主に背内側核(DMH)のニューロンを興奮させることによってQIHを惹起すると考えられるがQIH誘導機構の詳細を解明する。

新たに開発した光受容体hOPN4ΔCを用いた光遺伝学により効率的にQIHを導入し、FosTRAP2マウスを用いて光刺激後のFos陽性ニューロンをラベル、トレーサーや操作実験により上流下流のニューロンとその機能を明らかにする。

Qe、Qi、Qhのサブタイプの機能を解明するため、Qrfp遺伝子にlox-Flp-loxをノックインしたマウスを使用してそれぞれのサブタイプを選択的に操作し体温への作用を確認し、その機能を明らかにする。Qニューロンが交感神経出力を遮断するメカニズムの解明：交感神経節前線維から逆行性トレーシングを行い、脳幹の交感神経プレモーターニューロンをラベルして上記で同定したQニューロンのターゲットニューロンであるDMHニューロンの投射先との関連を探る。

ファイバーフォトメトリーによってQニューロンの活動の変化を明らかにする。

目標 B QIHが生理・神経機能にもたらす影響を詳細に明らかにする。

QIH中の記憶、睡眠、体内時計、自律神経系を解析していく。(i)QIHの陳述記憶への記憶への影響：海馬依存性の陳述記憶・空間記憶の保持を調べるため文脈を用いた恐怖条件付け課題、モリス水迷路を用いる。QIH導入前に学習を行い、完全に回復後、想起テストを行いQIH未経験のコントロール群と比較する。(ii)光遺伝学によるQIHを用い、oQIH後の睡眠覚醒状態をEEG/EMG記録により解析し、QIHと睡眠の関連を探る。(iii)マウスおよび対照マウスの輪回し行動を測定し、明暗条件および恒暗条件下の行動リズムを測定する。QIHを導入しその後の行動リズムを解析し体内時計のフェーズシフトが起こるか明らかにする。さらにPer2-Luc;Qrfp-iCreマウスをもちい、ファイバーフォトメトリーによって、視交叉上核における発光を検出する。(iv)Qrfp-iCreラットに、AAV-DIO-hM3DqのAVPeへの投与によりQIHを導入する。交感神経機能・迷走神経機能を電気生理学的に検討し、QIH導入による効果を検討する（佐々木）。

目標 C: マカクザルを用いる予定である。Q ニューロンの 80% はグルタミン酸作動性であり、興奮性ニューロンをターゲットとした hM3Dq 発現により、QIH 様の状態を誘導できる。体温や心拍数・脳波・心電図などをモニターする。

目標 D: Q ニューロン核に H2B-GFP を発現させ核単離を行う。トランスクリプトームによりクラスター分類し、その性質をより詳細に解明することに役立てるとともに、Q ニューロンに発現する遺伝子の中で受容体を含めできるだけ Q ニューロンに特異的な分子を見出し低分子化合物によって Q ニューロンを操作する方法を見出すことにつなげる知見を見出す。さらに、Q ニューロンに AAV により GFP を発現させ、スライス標本を作製して GFP 発現ニューロンからホールセルレコーディングを行い、細胞外液に前期の遺伝子解析から想定した様々な物質を投与し、どのような物質が Q ニューロンの活動に影響を与えるか明らかにする。

4. これまでの成果

目標 A Q ニューロンおよび下流ニューロンによる QIH 誘導メカニズムの解明

Q ニューロンサブタイプ (Qe, Qi, Qh) の機能を解明するべく、Qrfp 遺伝子に lox-Flp-lox をノックインしたマウス (Qrfp-flox-Flp) を作成した。さらに、このマウスを vGlut2-ires-Cre や vGAT-ires-Cre マウスと掛け合わせることで、Flp を Qh または Qi ニューロンのみに発現させることが可能となった。

目標 B QIH 中の生理・神経機能の解析を高時間分解能で行うため、光遺伝学により長時間の QIH を誘導する実験系を構築した。OPN4 (メラノプシン) を用いて微弱な光で Gq シグナリングを活性化させることにより神経の興奮を試みた。また感度を上げるために不活性化に関与する C 末端側のリン酸化クラスター領域を欠損させた (hOPN4dC)。hOPN4dC は青色光で活性化し、神経の興奮を誘導することを電気生理学的に確かめた。さらに、in vivo において Q ニューロンに発現させ光照射の体温への影響を観察した。3-10 mW という極めて弱い光で体温の低下を誘導することが可能であった。24 時間という長期間にわたって光照射を持続させても神経の損傷は観察されず、何度も QIH 誘導が可能であった。この系を用いて、Q ニューロンの活性化によって体温の低下に先行して心拍数が急激に低下することを見出しており、Q ニューロンの新しい機能を提唱した。さらに、光照射を終了することで 30 分以内に元のレベルに体温が戻る事が判明した。この研究成果を論文として発表した (Takahashi et al., Cell Reports Methods, 2022)。

一方、概日時計に与える影響を概日時計によって制御される生理リズムを指標に解析し恒暗条件においてマウスの輪回し行動リズムの位相は QIH によって影響を受けないことを見出した。

目標 C 霊長目における QIH 誘導:AVPe への AAV 投与法を確立した (松本)

目標 D AVPe に発現している Q ニューロンの核を抽出し、10xGenomics 社の Chromium にてシングルセル解析を実施した。その結果、Q ニューロンの制御に関わる因子群を複数同定した。この情報をもとに、Q ニューロンに作用する可能性のある因子を数個ピックアップし、スライス標本にてカルシウムイメージングおよび電気生理実験によって Q ニューロンを興奮させる因子を見出した。

5. 今後の計画

1. Q ニューロンのターゲットニューロンの同定を行う。また、Qe, Qi, Qh の Q ニューロンサブタイプの機能を解明する。
2. Q ニューロンの生理機能の解明を行う。Q ニューロンのフォトメトリを用いて、生体内における Q ニューロンの活動をモニターする。Q ニューロンを Caspase 3 発現により除去したマウスを用いて、外気温に対する指向性の変化や、外気温変動に対する自律神経系の動きを明らかにしていく。
3. QIH 誘導法の開発。これまでに、scRNA 解析を用いて Q ニューロンの制御に関わる因子群を複数同定している。特に Q ニューロンに発現する受容体を活性化させる生理活性物に着目して研究を進める。マカクサルへの投与により体温への影響などを明らかにしていく。
3. QIH の生体機能への影響の解明。カルシウムインジケータを用いた in vivo 計測を用いて概日時計中枢の時計ニューロンの神経活動の挙動を解析する。一方、QIH 中に睡眠負債が蓄積するか否かを明らかにする。また、将来的な応用を視野に入れ、高次脳機能のひとつである記憶に対する影響を明らかにする。さらに冬眠中と復温中のシナプス数の脱落と再構築の過程を高解像度顕微鏡を用いて形態学的に解析していく (OIST 田中和正准教授との共同研究)。老化細胞の増加に及ぼす影響も解析していく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Takahashi M T, Hirano A, Kanda T, Saito M V, Ashitomi H, Tanaka Z K, Yokoshiki Y, Masuda K, Yanagisawa M, Vogt E K, Tokuda T, Sakurai T*. Optogenetic Induction of Hibernation-like state with modified Human Opsin4 in Mice. *Cell Reports Methods*, 2, 100336, 2022

1Hasegawa E, Miyasaka A, Sakurai K., Cherasse Y, Li Y, Sakurai T*. Rapid eye movement sleep is initiated by basolateral amygdala dopamine signaling in mice, *Science*, 375, 6584, pp. 994-1000, 2022

櫻井 武 2021年11月 第32回 つくば賞

7. ホームページ等

<https://sakurai-lab.com/>