

令和元年5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05120

研究課題名(和文) ニューロンタイプ特異的遺伝子操作による中枢概日ペースメーカーの動作原理の解明

研究課題名(英文) Understanding the neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker by neuron type-specific genetic manipulations

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では概日リズム制御中枢・視交叉上核(SCN)神経ネットワークが強固で安定した概日リズムを発振するメカニズムについて、研究代表者らがこれまでに開発した遺伝子改変マウスリソースを活用し、その解明を目指した。

SCNの主要なニューロンタイプの一つ、バソプレシン産生ニューロンが、SCN神経ネットワークによる概日リズム発振やその周期決定に極めて重要であることを明らかにした。また、バソプレシンニューロンや他のタイプのニューロンについて、電気生理学的な性質を明らかにした。これまでバソプレシンニューロンはリズム発振自体には関与しないと考えられており、本研究成果は従来の見解を覆した重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の行動や生理機能の殆どが概日リズムにより調節されるため、その変調により不眠、肥満や気分障害等、様々な健康障害・疾患リスクが増大する。現代社会では、時差や夜間勤務、生活習慣の乱れにより、概日リズムの変調は誰にでも起こりうる。本研究の成果により、SCN神経ネットワークを構成する各ニューロンの役割や、中枢体内時計の神経メカニズムが明らかになれば、概日リズム変調による様々な疾患・健康障害に対し、薬剤投与による概日リズムの調整など、より効果的に対処できる技術の開発を、大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand the neural mechanisms underlying the generation of robust and stable circadian rhythms by the central circadian pacemaker of the suprachiasmatic nucleus (SCN), utilizing genetically-modified mice which we have developed.

We found that vasopressin-producing neurons, one of major neuron types in the SCN, play a critical role in the generation of circadian rhythms and the determination of circadian period by the SCN neural network. In addition, we analyzed the electrophysiological characteristics of vasopressin neurons and other types of neurons in the SCN. Before this study, vasopressin neurons had been considered to be dispensable for the generation per se of circadian rhythms by the SCN network. Thus, our findings reversed the conventional views about the role of vasopressin neurons in the central circadian pacemaker.

研究分野：神経科学

キーワード：サーカディアンリズム 体内時計 神経ネットワーク 視床下部 遺伝子操作マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の中核概日ペースメーカー・視交叉上核 (SCN) は多種・多数のニューロンから成る神経ネットワークである。しかし、SCN が強固で安定した概日振動を発振するために必要な神経ネットワークの動作原理は明らかでなかった。

(2) 研究代表者らは早くから、中核概日時計 SCN の動作原理の理解には、それを構成するニューロンタイプごとの役割を明らかにするアプローチが有効と考え、ニューロンタイプ特異的に遺伝子操作・神経活動操作をするためのツールを開発してきた。特に、これまで概日リズム発振に重要と考えられていなかった SCN のバソプレシン (AVP) ニューロンで特異的に細胞時計を欠損したマウス (AVP ニューロン特異的 *Bmal1* 欠損マウス) を作成・解析し、SCN 神経ネットワークによる概日リズム発振において AVP ニューロンが極めて重要なことを明らかにしていた。

2. 研究の目的

(1) 中核概日ペースメーカー・視交叉上核 (SCN) の神経ネットワークが強固で安定した概日振動を発振するメカニズムについて、研究代表者らがこれまでに開発した遺伝子改変マウスリソースを最大限活用し、ニューロンタイプ特異的に遺伝子操作・神経活動操作のアプローチを用いて、その解明を目指す。

(2) SCN ニューロンの神経活動や電気生理学的特性を、ニューロンタイプ特異的に、正常マウスおよび各種変異マウスにおいて *ex vivo*, *in vivo* で計測し、SCN 神経ネットワークの神経生理学的基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 以前作成した AVP ニューロン特異的 Cre 発現トランスジェニックマウス、本研究課題で作成した血管作動性腸管ペプチド (VIP) 産生ニューロン特異的 Cre 発現トランスジェニックマウスなどを用いて、ニューロンタイプ特異的に細胞時計や神経伝達を操作したマウスを作成し、その概日行動リズムを解析した。また SCN における *in vivo* での時計遺伝子発現リズムを *in situ hybridization* 法で、*ex vivo* での時計遺伝子発現リズムを *Per2::Luc* レポーターマウスを用いた発光イメージングで解析した。

(2) *Avp-Cre* マウスや *Vip-Cre* マウスと Cre 依存的 *tdTomato* 発現レポーターマウスを交配することで、AVP ニューロンや VIP ニューロンを赤色蛍光タンパク質 *tdTomato* でラベルしたマウスより SCN スライスを作成し、パッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) AVP ニューロン特異的 casein kinase (CK) 1 δ 欠損マウス (AVP ニューロン特異的に細胞時計の周期を延長したマウス) は、概日行動リズムの周期が約 1 時間延長した (図 1)。反対に、組換え AAV ベクターを用いて SCN・AVP ニューロンで CK1 δ を過剰発現したマウスでは概日周期が約 30 分短縮した。したがって、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ので、AVP ニューロンが概日周期を決定するペースメーカー細胞 (の少なくとも一部) として機能することが示唆された。In situ hybridization 法による *in vivo* (図 2) および *Per2::Luc* レポーターマウスの SCN スライスを用いた *ex vivo* 発光イメージングによる時計遺伝子発現解析より、特異的 CK1 δ 欠損により AVP ニューロンが多く存在する SCN 外殻部細胞の細胞時計周期が延長していることが確認できた。興味深いことに、コントロールマウスでは時計遺伝子発現リズムの位相は SCN 背内側部が

腹側部に対して先行するが、AVP ニューロン特異的 CK1 δ 欠損マウスではこの時空間パターンが逆転していた。にもかかわらず、概日行動リズムは周期が延長しているものの振幅は正常で安定していた。したがって、正常マウスの SCN で観察される時計遺伝子発現の時空間パターンは、少なくとも生体内での概日リズム発振自体には必要ないことが示唆された。さらに AVP ニューロン特異的 CK1 δ 欠損マウスで見られる時計遺伝子発現パターンの逆転は、スライスにおいては培養当初は観察されるものの、数サイクル後には消失した。このことから、正常な SCN 神経ネットワーク、あるいは SCN と他の脳領域とのネットワークが、*in vivo* での SCN による概日リズム発振に重要である

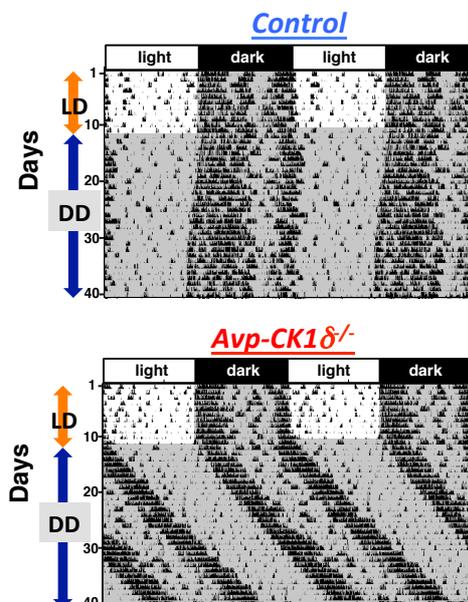


図1 AVPニューロン特異的CK1 δ 欠損マウスの概日行動リズム

ことが示唆された。AVPニューロンが、SCN神経ネットワークの発振する概日リズムの周期決定に関わるペースメーカー細胞として機能するという事実は、従来

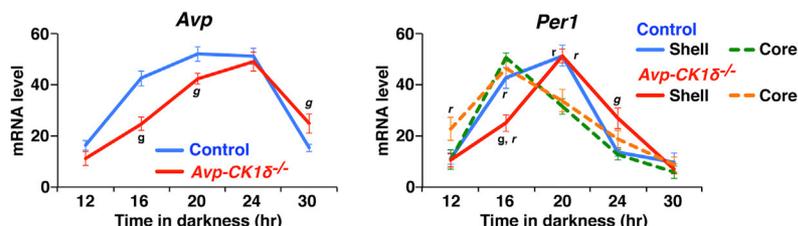


図2 AVPニューロン特異的CK1δ欠損マウスのSCNにおける遺伝子発現リズム

の見解を覆すものであり、重要である。成果をまとめ、論文発表した (Mieda et al, Curr Biol 2016)。

(2) VIP産生ニューロン特異的に Cre 組換え酵素を発現する BAC トランスジェニックマウスを作成した (Vip-Cre)。このマウスを用い、VIPニューロン特異的 Bmal1 欠損マウス、CK1δ欠損マウス、Vgat 欠損マウスを作成したが、同様の AVPニューロン特異的欠損マウスとは対照的に、概日行動リズムに有意な異常は観察されなかった。他グループによって作成された Vip-ires-Cre マウスも導入して同様の実験を行ったが、同様の結果が得られた。AVPニューロン、VIPニューロン両方で Bmal1 を欠損したマウスも作成したが、AVPニューロン単独の欠損マウスと比べてフェノタイプが有意に重篤になることもなかった。以上の結果から、VIPはSCNニューロン群の重要な同調因子として報告されているが、VIPニューロンが持つ細胞時計やVIPニューロンによる GABA 作動性神経伝達は、SCN神経ネットワークによる概日リズム発振には重要でないことが示唆された。

(3) SCN スライスにおける AVPニューロンやVIPニューロンの電気生理学的性質を、パッチクランプ法により解析した。AVPニューロンでは、常に脱分極した状態にあるために、Na⁺依存的な活動電位は発生せず Ca²⁺依存的な膜電位の振動のみ観察される細胞が、多く観察された。VIPニューロンではそのような細胞は見られなかった。この脱分極状態を作り出すイオンチャネルの候補を同定にした。さらにその機能を明らかにするために、当該チャネル遺伝子を AVPニューロンで特異的にノックアウトしたマウスを作成し、概日行動リズムの解析を開始した。GABAは一般的に抑制性の神経伝達物質だが、SCN内にはGABAが興奮性に作用するニューロンが存在することが知られている。そこで、AVPニューロンやVIPニューロンのGABAに対する応答性を調べたところ、どちらについても、抑制性に応答する細胞も興奮性に応答する細胞もあることが明らかになった。また AVPニューロンおよび非 AVPニューロンで記録される GPSC (GABA-mediated postsynaptic current) について詳しい解析を行い、その振幅や頻度に日内変動があることを見いだした。

(4) 培養 SCN スライスにおける細胞内 Ca²⁺および膜電位のニューロンタイプ特異的な蛍光イメージングを共同研究で行い、膜電位リズムの位相はSCN全体で揃っている一方で、細胞内 Ca²⁺リズムは AVPニューロンがVIPニューロンより先行することが明らかになった (Enoki et al, PNAS 2017)。

(5) Cre 発現細胞のみで概日遺伝子発現リズムをモニターするレポーターAAVを作成した。このレポーターを提供して共同研究を行い、アストロサイトにおける細胞時計の重要性を示す論文を発表した (Tso et al, Curr Biol 2017)。

(6) SCNのAVPニューロンやVIPニューロンに Cre 依存的組換え AAV 発現ベクターを用いて蛍光 Ca²⁺プローブ jRCaMP7s をニューロンタイプ特異的に発現させ、その神経活動リズムを、ファイバーフォトメトリーを用いて in vivo で測定することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. The Network Mechanism of the Central Circadian Pacemaker of the SCN: Do AVP Neurons Play a More Critical Role Than Expected? **Mieda M.** *Front Neurosci.* 2019, 13:139. doi: 10.3389/fnins.2019.00139. 査読有
2. Glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex mediate the formation and retrieval of cocaine-associated memories in mice. Zhang T, Yanagida J, Kamii H, Wada S, Domoto M, Sasase H, Deyama S, Takarada T, Hinoi E, Sakimura K, Yamanaka A, Maejima T, **Mieda M.** Sakurai T, Nishitani N, Nagayasu K, Kaneko S, Minami M, Kaneda K. *Addict Biol.* 2019, doi: 10.1111/adb.12723. [Epub ahead of print] 査読有
3. Sexually Dimorphic Vasopressin Cells Modulate Social Investigation and Communication in Sex-Specific Ways. Rigney N, Whylings J, **Mieda M.** de Vries G, Petrulis A. *eNeuro.* 2019, 6: ENEURO.0415-18.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0415-18.2019. 査読有

4. Time Restriction of Food Intake During the Circadian Cycle Is a Possible Regulator of Reproductive Function in Postadolescent Female Rats. Fujiwara T, Nakata R, Ono M, **Mieda M**, Ando H, Daikoku T, Fujiwara H. *Curr Dev Nutr*. 2018, 3:nzy093. doi: 10.1093/cdn/nzy093. 査読有
5. Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons. Saito YC, Maejima T, Nishitani M, Hasegawa E, Yanagawa Y, **Mieda M**, Sakurai T. *J Neurosci*. 2018, 38:6366-6378. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2835-17.2018. 査読有
6. Disruption of Bmal1 Impairs Blood-Brain Barrier Integrity via Pericyte Dysfunction. Nakazato R, Kawabe K, Yamada D, Ikeno S, **Mieda M**, Shimba S, Hinoi E, Yoneda Y, Takarada T. *J Neurosci*. 2017, 37:10052-10062. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3639-16.2017. 査読有
7. The roles of orexins in sleep/wake regulation. **Mieda M**. *Neurosci Res*. 2017, 118:56-65. doi: 10.1016/j.neures.2017.03.015. 査読有
8. Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Maseck OA, Herlitze S, Yoshioka M, Sakurai T, **Mieda M**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017, 114:E3526-E3535. doi: 10.1073/pnas.1614552114. 査読有
9. Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, **Mieda M**, Herzog ED. *Curr Biol*. 2017, 27:1055-1061. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.037. 査読有
10. Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. Enoki R, Oda Y, **Mieda M**, Ono D, Honma S, Honma KI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017, 114:E2476-E2485. doi: 10.1073/pnas.1616815114. 査読有
11. Fine-Tuning Circadian Rhythms: The Importance of Bmal1 Expression in the Ventral Forebrain. **Mieda M**, Hasegawa E, Kessaris N, Sakurai T. *Front Neurosci*. 2017, 11:55. doi: 10.3389/fnins.2017.00055. 査読有
12. Bone Resorption Is Regulated by Circadian Clock in Osteoblasts. 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. *J Bone Miner Res*. 2017, 32:872-881. doi: 10.1002/jbmr.3053. 査読有
13. The intrinsic microglial clock system regulates interleukin-6 expression. 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. *Glia*. 2017, 65:198-208. doi: 10.1002/glia.23087. 査読有
14. QRFP-Deficient Mice Are Hypophagic, Lean, Hypoactive and Exhibit Increased Anxiety-Like Behavior. 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. *PLoS One*. 2016, 11:e0164716. doi: 10.1371/journal.pone.0164716. 査読有
15. Manipulating the Cellular Circadian Period of Arginine Vasopressin Neurons Alters the Behavioral Circadian Period. **Mieda M**, Okamoto H, Sakurai T. *Curr Biol*. 2016, 26:2535-2542. doi: 10.1016/j.cub.2016.07.022. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 三枝理博, 中枢概日時計におけるバソプレシンニューロンの機能, 第 43 回日本睡眠学会定期学術集会, 2018
2. 三枝理博, Genetic dissection of neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker, Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018, 2018
3. 三枝理博, Neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker of the SCN, 第 4 1 回日本神経科学大会, 2018
4. **Mieda M**, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma S, Honma K, akurai T. Genetic manipulation of AVP neurons to uncover their roles in the circadian pacemaking of the SCN. Gordon Research Conference-Chronobiology, 2017
5. 三枝理博, 中枢概日時計の神経メカニズムの解析, 中部日本生理学会, 2017
6. 三枝理博, 岡本仁, 櫻井武, 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, 日本時間生物学会, 2017
7. 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, 日本生理学会, 2017
8. **Mieda M**, Okamoto H, Sakurai T. Manipulating the cellular circadian period of AVP neurons alters the behavioral circadian period. Society for Research on Biological Rhythms (SRBR), 2016
9. 三枝理博, 岡本仁, 櫻井武, 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, 日本神経科学学会, 2016
10. **Mieda M**. AVP neurons play a critical role in the circadian pacemaking of the SCN. Sapporo Symposium on Biological Rhythm, 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。