

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15524

研究課題名(和文) コリン作動性ニューロンによる情動調節における時計遺伝子Bmal1の役割

研究課題名(英文) The roles of clock gene Bmal1 in affective regulation by cholinergic neuron

研究代表者

大塚 剛司(Otsuka, Tsuyoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：60760395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、時計遺伝子Bmal1がコリン作動性ニューロン(ChAT)特異的にKOされたマウス(ChAT-Bmal1 KOマウス)を作成し、生体リズム異常と気分障害を繋ぐ分子メカニズムの解明に迫った。その結果、ChAT-Bmal1 KOマウスは情動行動に異常を示さなかったが、睡眠覚醒および、オレキシン神経系への影響がみられた。このことから、コリン作動性神経における時計遺伝子Bmal1は、情動機能に影響は示さないものの、アセチルコリン作動性神経およびオレキシン作動性神経の機能調節を介して、覚醒を調節する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでほとんど調べられていなかった、体内時計とコリン作動性ニューロンとの関わりを探るものであった。本研究により、コリン作動性ニューロンにおけるBmal1の発現異常は情動行動には影響せず、睡眠覚醒障害を引き起こす可能性を示した。このことから、コリン作動性ニューロンの時計機能は、いまだ解明されていない睡眠覚醒メカニズムの解明に向けた、新たなターゲットになる可能性がある。本研究の成果は、将来ヒトや家畜動物の睡眠障害における、有用な薬の開発や治療法確立につながることから、社会医学的、睡眠医学的にも大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we approached for an elucidation of the molecular mechanism to connect a circadian rhythm deprivation and mood disorders together using ChAT-Bmal1 KO mice. The results showed that Although ChAT-Bmal1 KO mice did not exhibit the affective behaviors abnormality, the mice indicate malfunction of sleep-wake cycle and orexinergic system. Therefore, it was suggested that Bmal1 expression in cholinergic neuron plays an important role in regulating the sleep-wake system through the orexinergic system though do not have an influence on affective behaviors.

研究分野：生理学

キーワード：時計遺伝子 Bmal1 ChAT 睡眠覚醒

1. 研究開始当初の背景

2017年、WHOが掲げた国際保健に関するテーマが「うつ病」であることからわかるように、近年、気分障害の罹患率増加は社会問題となっている。そのため現在、気分障害の発症メカニズム解明に向けた研究が盛んに行われている。これまで多くの仮説が提唱されてきた一方、未だ不明な点が多く、予防法や完璧な治療法確立には至っていない。近年、体内時計の乱れと情動変化に関連した研究が報告されてきていることから、生体リズムは情動に強く影響することが示唆されるが、正確な制御メカニズムの解明にはまだ至っていない。

申請者はこれまでの研究において、双極性障害の生体リズム異常における分子メカニズムの解明、特に時計遺伝子 *Rev-erba* と双極性障害発症の関わりについて焦点を当てた。これまで、*Rev-erba* を knockout (KO) したマウスでは、行動量の増加などのポジティブな行動異常、およびドーパミン神経系に異常を示すことが報告されており、*Rev-erba* と双極性障害発症は深く関わることを示唆されている。申請者の実験においても、ポジティブな行動異常と共に、脳部位特異的にドーパミン神経系が変化することを確認している。ところがこのマウスは、ポジティブな行動異常と共に、不安様行動などのネガティブな行動異常を示すことを見出した。さらに前頭前皮質においては、アセチルコリンの減少を認め、コリン作動性ニューロンへの影響が示唆された。時計遺伝子とコリン作動性ニューロンの関わりを示す研究はまだ少なく、気分障害発症メカニズム解明の糸口となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、『*Rev-erba* の下流にある時計遺伝子 *Bmal1* は、コリン作動性ニューロンの制御を介して情動調節を行っている』という仮説の元、これを証明するために研究を行った。体内時計とコリン作動性ニューロンの連関を紐解くため、時計遺伝子 *Bmal1* をコリン作動性ニューロン特異的に KO したマウス (*ChAT-Bmal1* KO マウス) を作製した。そしてこのマウスを用いて、コリン作動性ニューロンの *Bmal1* を特異的に KO したマウスは情動行動異常を示すのか、*Bmal1* はコリン作動性ニューロンとどのように関わるのか、の疑問を解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で用いた *ChAT-Bmal1* KO マウスは、Cre-loxP システムを用いて作製された。作製された *ChAT-Bmal1* KO マウスは、*ChAT* プロモーターの下流に発現させた Cre recombinase と floxed *Bmal1* を持つ。Control マウスには floxed *Bmal1* を持つが、Cre recombinase は持たない個体を用いた。

1) *ChAT-Bmal1* KO マウスの行動解析

ChAT-Bmal1 KO マウスがどのような行動異常を示すのかを確認するため、様々な行動テストを実施した。*ChAT-Bmal1* KO マウスを 12 時間明期：12 時間暗期で、9～12 週齢になるまで飼育し、その後各種行動テストによりマウスの情動行動を Control マウスと比較、評価した。実施した行動テストは赤外線センサーによる活動量、オープンフィールドテスト、物体認知テスト、高架式十字迷路、強制水泳テストである。

2) ペントバルビタール誘発睡眠試験

ChAT-Bmal1 KO マウスの睡眠覚醒異常を確認するため、ペントバルビタール誘発睡眠試験を行った。9～12 週齢の雄マウス (にペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し、投与から入眠までの時間を睡眠潜時、入眠から覚醒までの時間を睡眠持続時間とし、記録した。

3) *ChAT-Bmal1* KO マウスの分子生物学的解析

9～12 週齢の *ChAT-Bmal1* KO マウスの脳サンプルを用いて、分子生物学的な検討を行った。サンプリング部位はアセチルコリン合成部位であるマイネルト基底核、脚橋被蓋核、背外側被蓋核およびその投射先である前頭前皮質である。これらの部位から、コリン作動性ニューロンおよびオレキシン作動性ニューロンと関わる遺伝子の mRNA の発現量を Realtime PCR により測定し、Control マウスと比較した。

4. 研究成果

まず、*ChAT-Bmal1* KO マウスの情動行動異常を確認するために行った行動テストにおいて、オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路による不安様行動、強制水泳テストによるうつ様行動には明確な差を確認することができなかった。このことから、コリン作動性ニューロン特異的な *Bmal1* の発現異常は、情動行動に影響しないことが考えられた。そこで体内時計研究の原点に立ち返り、赤外線センサーによる活動量を用いて、行動のサーカディアンリズムに *Bmal1* KO の影響がそもそもあるのかを確認した。その結果、行動のリズム減弱を示したことに加えて、活動期 (暗期) における活動量の減少という興味深い行動アクトグラムが得られた (図.

1)。これまでの報告で、オレキシン合成酵素を KO したマウスでは行動量の低下と共に、睡眠覚醒障害を示すことが知られている。そのため、簡易的に睡眠覚醒の変化を確認できるペントバルビタール誘発睡眠試験を実施した。その結果、睡眠の指標である睡眠潜時に有意差はみられなかったものの、覚醒の指標である睡眠持続時間は、*ChAT-Bmal1* KO マウスで有意に延長された。このことから、*ChAT-Bmal1* KO マウスは覚醒機能に異常がある可能性が示唆された。

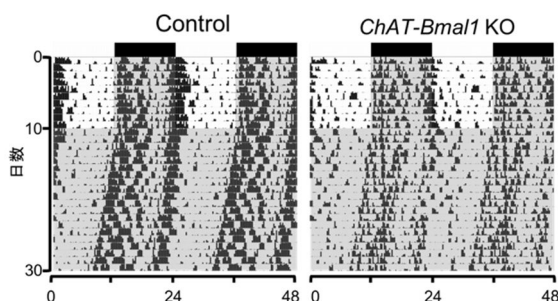


図.1 行動リズムのアクトグラム

Control および *ChAT-Bmal1* KO の 10 日間の明暗環境下(LD) および 20 日間の恒暗環境下(DD) のアクトグラム。黒い部分がマウスの行動の有無。図中のグレーは暗期を示す。

次に覚醒異常を引き起こしているターゲット部位を特定するため、アセチルコリン合成部位と、その投射先におけるコリン作動性ニューロンおよびオレキシン作動性ニューロンと関わる遺伝子の発現量を測定した。その結果、コリン作動性ニューロンに関わる遺伝子発現は多少の変化がみられるものはあるものの、目立った動きはほとんど見られなかった。一方、オレキシン作動性ニューロンに関わる遺伝子に関しては、オレキシン受容体に関わる遺伝子 (*Hcrtr1*、*Hcrtr2*) の発現量がマイネルト基底核で有意に増加し、前頭前皮質では増加傾向がみられた (図. 2)。これらのことから、*ChAT-Bmal1* KO マウスは、オレキシン作動性ニューロンとの情報伝達機能に異常を示し、このことが覚醒機能異常につながる可能性が示唆された。今後は *ChAT-Bmal1* KO マウスの覚醒調節メカニズムの解明に向けて、検討を進めていく予定である。

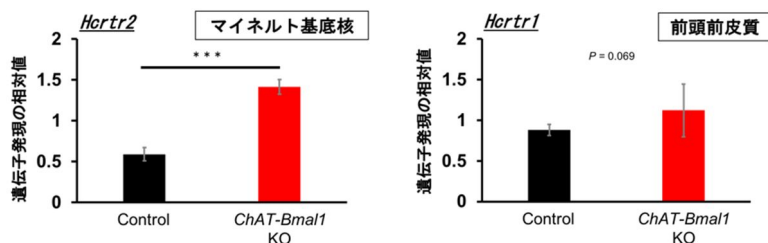


図.2 マイネルト基底核および前頭前皮質におけるオレキシン受容体遺伝子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Otsuka. T, Le. HT, Kohsaka. A, Sato. F, Ihara. H, Nakao. T, Maeda. M	4. 巻 432
2. 論文標題 Adverse Effects of Circadian Disorganization on Mood and Molecular Rhythms in the Prefrontal Cortex of Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 44-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.02.013	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 -

1. 著者名 Sato. F, Otsuka. T, Kohsaka. A, Le. HT, Bhawal. UK, Muragaki. Y	4. 巻 189
2. 論文標題 Smad3 suppresses epithelial cell migration and proliferation via the clock gene Dec1, which negatively regulates the expression of clock genes Dec2 and Per1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 773-783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.01.006	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三ツ石裕貴、大塚剛司、中辻幸信、八代田真人
2. 発表標題 分娩前後の -カロテンの給与が分娩後の黒毛和種繁殖牛の卵巣機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西裕貴、鈴木茉央、丸澤茉実、大塚剛司
2. 発表標題 去勢による熱産生関連遺伝子Ucp1の発現異常と生体リズム変化の関連性
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三ツ石裕貴、夏堀恵利、中辻幸信、大塚剛司、八代田真人
2. 発表標題 -カロテンの給与が肉用繁殖雌牛の非妊娠期における卵巣機能および発情に及ぼす影響
3. 学会等名 2020東海畜産学会学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西裕貴、鈴木茉央、丸澤茉実、大塚剛司
2. 発表標題 去勢に伴うテストステロン合成阻害は脂肪細胞の体内時計とUcp1発現に影響しない
3. 学会等名 2020東海畜産学会学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西裕貴、鈴木茉央、丸澤茉実、大塚剛司
2. 発表標題 Castration alters the circadian clock and the expression of Ucp1 in subcutaneous white adipose tissue of mice
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Otsuka, H. Mitsuishi, H. Onishi, M. Yayota
2. 発表標題 The circadian rhythm of plasma progesterone concentration under constant lights in Japanese black cows
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Otsuka, H. Mitsuishi, H. Onishi, M. Yayota
2. 発表標題 Constant light exposure leads to the down-regulation of clock genes expression with circadian clock disorganization in pregnant beef cows
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚剛司、三ツ石裕貴、大西裕貴、八代田真人
2. 発表標題 黒毛和種繁殖牛は妊娠期特有の時計遺伝子発現リズムを示す
3. 学会等名 2019東海畜産学会学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Otsuka, H. Mitsuishi, H. Onishi, M. Yayota
2. 発表標題 Evaluation of circadian clock using follicle cells in Japanese black cattle.
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Otsuka, H. Mitsuishi, H. Onishi, M. Yayota
2. 発表標題 Evaluation of circadian clock using follicle cells in Japanese black cattle
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 F. Sato, T. Otsuka, A. Kohsaka, H. T. Le, B. K. Bhawal, Y. Muragaki
2. 発表標題 Smad3 suppress epithelial cells migration and proliferation via the clock gene Dec1, which negatively regulates the clock genes Dec2 and Per1
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向坂 彰、大塚剛司、レティフォエ、中田正範
2. 発表標題 生体リズムの乱れは情動行動および前頭前皮質の時計遺伝子機能に影響する
3. 学会等名 第86回和歌山医学会総会
4. 発表年 2019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
---------	---------