

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03399

研究課題名(和文)バソプレシン産生ニューロンを基軸とする中枢時計神経メカニズムの解明

研究課題名(英文)Understanding the roles of vasopressin neurons in the neural network of the central circadian clock

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、視交叉上核(SCN)の中枢時計機能にバソプレシン(AVP)産生ニューロンが極めて重要なことを明らかにしてきた。本研究ではさらにAVPニューロンを中心に機能解析を進めた。その結果、SCN AVPニューロンから放出されるGABAにより、SCNの分子時計上の適切な時間枠にSCNの神経活動が限定され、マウスの行動が適切な時間帯に起きること、AVPニューロンはVIPニューロンや他のSCNニューロンのリズム周期を制御して、SCN神経ネットワークの主要なペースメーカー細胞として機能すること、視床下部室傍核のAVPニューロンは強力な覚醒亢進作用を持つこと、等が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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(サーカディアン)リズムの変調は誰にでも起こりうる問題である。睡眠障害のみならず、気分障害、肥満・メタボリックシンドローム、がん等、様々な疾患・健康障害のリスクを増大する。したがって、概日リズム発振のメカニズムを理解し、概日リズム変調の効果的な予防方法・対処方法を見つけることは、大変重要である。本研究によりSCNが発振する概日リズムの振幅、周期、位相を決定する神経ネットワークレベルでのメカニズムが明らかになれば、特定のニューロンを操作することで中枢時計を自在に制御する技術にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that vasopressin (AVP)-producing neurons are crucial for the central clock function of the suprachiasmatic nucleus (SCN). In this study, we further analyzed the function of AVP neurons. The results showed that (1) GABA released from SCN AVP neurons limits the neural activity of the SCN to the appropriate time frame on the SCN molecular clock so that mouse behavior occurs at the appropriate time, (2) AVP neurons regulate the period of rhythms of VIP and other SCN neurons to function as the primary pacemaker cells of the SCN neural network, and (3) AVP neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus prominently promote wakefulness.

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 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

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（サーカディアン）リズムの変調は誰にでも起こりうる問題である。睡眠障害のみならず、気分障害、肥満・メタボリックシンドローム、がん等、様々な疾患・健康障害のリスクを増大する。したがって、概日リズム発振のメカニズムを理解し、概日リズム変調の効果的な予防方法・対処方法を見つけることは、大変重要である。

哺乳類の概日リズム制御中枢は視床下部・視交叉上核 (SCN) であり、中枢時計として機能して全身に時刻の情報を送り、様々な生体機能を調節する。SCN は約 2 万のニューロンよりなる神経ネットワークである。個々の細胞内で概日リズムを刻む、時計遺伝子群を中心とした分子機構（分子時計）については、ほぼ明らかになった。一方で、SCN が強固で安定した概日リズムを発振するには、分子時計だけでは十分でなく、SCN 細胞間コミュニケーションが必要不可欠であるが、この SCN 神経ネットワークの動作原理はよく分かっていない。また中枢時計からの出力、どのような神経経路で睡眠を制御するのか、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、中枢時計・SCN 神経ネットワークの動作原理を理解するとともに、その出力神経経路を明らかにすることを目的とした。SCN は複数のニューロンタイプにより構築された神経ネットワークである。ほぼ全ての SCN ニューロンは GABA を含有し、その一部が特定の神経ペプチドを共発現する。SCN 背内側部に分布する AVP (arginine vasopressin) 産生ニューロンと、腹側部に位置する VIP (vasoactive intestinal polypeptide) 産生ニューロンは 2 つの主要なニューロンタイプである。我々は種々の AVP ニューロン特異的 conditional knockout (cKO) マウスを作成・解析し、AVP ニューロンが SCN による概日リズムの発振・周期決定に中心的な役割を担うことを見出した (Mieda et al, Neuron 2015; Mieda et al, Curr Biol 2016)。神経活動や細胞間コミュニケーションをスライスや生体内でニューロンタイプ特異的に計測し、各種 cKO マウスにおける SCN ネットワークの異常を明らかにすれば、細胞・回路レベルでの異常を行動の異常と結びつけることができると考えた。

3. 研究の方法

我々がこれまで作成してきた、概日リズムに異常を示す各種 AVP ニューロン特異的 cKO マウスに対して、*Per2::Luc* レポーターマウスを用いた *ex vivo* 発光イメージング、ファイバーフォトメトリーと GCaMP による *in vivo* 細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) リズム長期計測、*in vivo* multi-unit activity (MUA) 計測、光遺伝学、化学遺伝学、スライスパッチクランプ法、*in vivo* ゲノム編集などを適用して、各種 cKO の SCN ネットワークの異常を明らかにした。

4. 研究成果

① AVP ニューロン特異的 *Vgat* 欠損マウス (*Avp-Vgat*^{-/-}マウス) は、概日リズム周期に変化は無いが、活動時間が顕著に増加し (5 時間以上)、リズム分割様の概日行動リズムを示す。しかし予想に反して、*Avp-Vgat*^{-/-}マウスの SCN において、時計遺伝子 (*Per2::Luc*) 発現リズム (分子時計) は正常であった。ファイバーフォトメトリーを用いて SCN AVP ニューロンにおける $[Ca^{2+}]_i$ リズムを生体内で測定しても、同様に正常であった (図 1)。しかしながら *Avp-Vgat*^{-/-}マウスの概日行動リズムは、SCN の分子時計を基準に取ると、活動期開始時刻は早まり、終了時刻は遅れ、結果として活動期が延長していた。SCN の神経発火活動 (MUA) リズムを生体内で計測したところ、正常マウスでは昼に高く夜に低い単峰性のリズムを示すが、*Avp-Vgat*^{-/-}マウスでは昼に加えて夜にも活動のピークを生じるという二峰性のリズムを示し、マウスの行動はその神経活動が低下するリズムの谷間に起きていることが明らかになった (図 2)。以上の結果から、SCN AVP ニューロンから放出される GABA により、SCN の分子時計上の適切な時間枠に SCN の神経活動を限定することで、マウスの行動が適切な時間帯に起きると考えられた。以上の結果をまとめて論文発表した (Maejima et al, PNAS 2021)。

時計が正確でも、オン・オフタイマーの設定が狂っていたら、意味を成さない。このような体内時計における作動時間帯の設定メカニズムを明らかにすることで、体内時計に即した睡眠・覚醒制御機構や様々な身体機能の発現機構の理解が深まり、睡眠障害、自律神経失調、メタボリックシンドロームなど、生活リズムの乱れに起因する様々な疾患・健康障害の治療・改善に応用できると期待される。

図1 AVP ニューロン
[Ca²⁺]_i リズム(緑)と行
動リズム(黒)の関係

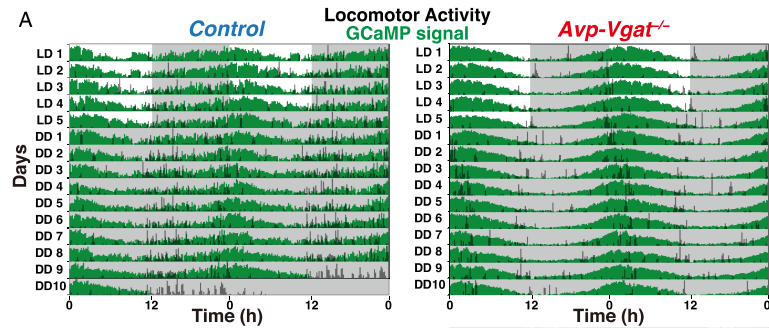
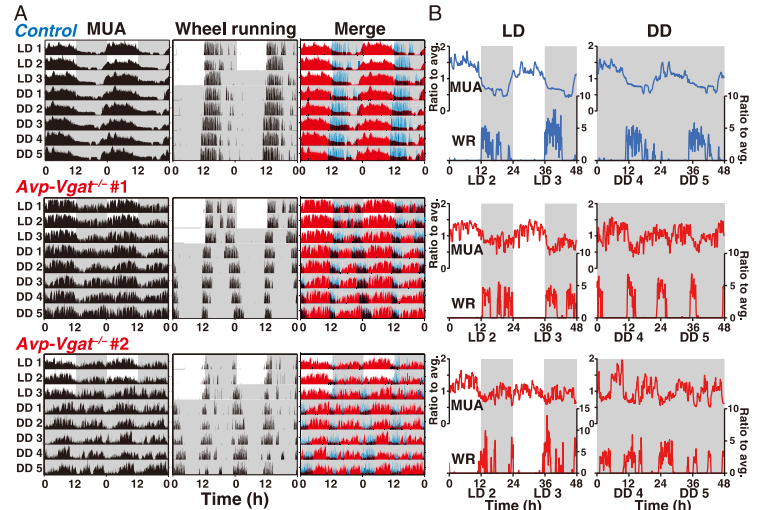


図2 SCN MUA リズムと
行動リズム(黒)の関係



② AVP ニューロンからの GABA 放出が、SCN 神経ネットワーク機能に重要であることが分かったので、次に、この GABA を受容して概日リズム形成に重要な役割を担う SCN ニューロンを明らかにすることを目的としている。そのために、in vivo ゲノム編集技術を用いて、ニューロンタイプ特異的に GABA_A 受容体を欠損することを試みた。SCN の AVP ニューロン、VIP ニューロンそれぞれに対して操作を行い、どちらのニューロンでも IPSC が完全に消失することを、SCN スライスでのパッチクランプ法により確認した。このような操作を行ったマウスの概日行動リズムを計測したところ、AVP ニューロン特異的欠損では異常は生じないが、VIP ニューロン特異的欠損により異常が生じるとの予備的なデータが得られている。今後さらに解析を進める予定である。

③ AVP ニューロン特異的 *CK1 δ* 欠損マウス (*Avp-CK1 δ*^{-/-}マウス) は、AVP ニューロンの分子時計周期の延長により概日行動周期も長くなる。逆に周期を短くすると (AVP ニューロン特異的 *CK1 δ* 過剰発現)、行動リズム周期も約 30 分短縮する (Mieda et al, Curr Biol 2016)。つまり、AVP ニューロンのみ分子時計周期を変えれば、SCN 統合概日リズムの周期が変わる。全 SCN ニューロンで *CK1 δ* を欠損しても概日行動リズム周期は *Avp-CK1 δ*^{-/-}マウスと差が無かった。一方 VIP ニューロン特異的欠損では、コントロールマウスと変わらなかった。よって 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周期を決定する主要なペースメーカー細胞と言える。しかし驚いたことに、培養 SCN スライスでの時計遺伝子 (*Per2::Luc*) 発現リズムでは、行動リズムで見られた周期延長が再現できない。

そこで、*Avp-CK1 δ*^{-/-}マウスと *Vip-tTA*マウスを交配し、Cre 依存のあるいは tTA 依存の jGCaMP7s 発現 AAV ベクターを SCN に局所投与して、ファイバーフォトメトリーを用いて in vivo での [Ca²⁺]_i リズムを AVP ニューロン、VIP ニューロンそれぞれで測定した。その結果、AVP ニューロン、VIP ニューロン共に [Ca²⁺]_i リズム周期が行動リズム周期と同程度に延長した。従って in vivo では、AVP ニューロンが VIP ニューロンや他の SCN ニューロンのリズム周期を制御することが示された。現在成果をまとめた論文を準備中である (Tsunoo et al, in preparation)。

④ 中枢時計が睡眠覚醒を制御する神経経路を明らかにするため、光遺伝学的手法によりニューロンタイプ特異的に SCN を刺激し、睡眠覚醒に影響を及ぼすニューロンを検索したところ、AVP ニューロンを刺激すると覚醒が顕著に増加するとの予備的結果が得られていた。しかし注意深く検証したところ、覚醒効果があるのは SCN ではなく、近傍の視床下部室傍核 (PVH) の AVP ニューロンであることが明らかとなった。当該ニューロンを活性化すると、睡眠中のマウスが 10 秒以内に覚醒するとの劇的な効果が観察されたので、さらに解析を進めた。化学遺伝学的手法で活性化しても覚醒量が増加し、抑制すると覚醒量が減少、睡眠量が増加した。この覚醒効果は、

オレキシニューロンを介することが明らかになった。また、当該ニューロン刺激により覚醒したマウスは self-grooming に多くの時間を費やすことが分かった。成果をまとめた論文を既に投稿し、改訂中である (Islam et al, in revision)。なお、覚醒しているマウスにおいて当該ニューロンを刺激しても、速やかに self-grooming が誘導されることが分かった。この誘導効果は極めて強力で、絶食後の再摂食中のマウスや、新たなメスマウスを追いかけているオスマウスなど、本来なら他の適応的行動をとる状況でも、刺激後速やかに self-grooming が誘導され、多くの時間を費やした。以上の結果をまとめ、論文発表した (Islam et al, Mol Brain, in press)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maejima T, Tsuno Y, Miyazaki S, Tsuneoka Y, Hasegawa E, Islam MT, Enoki R, Nakamura TJ, Mieda M.	4. 巻 118
2. 論文標題 GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2010168118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2010168118	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 Hasan N, Nagata N, Morishige JI, Islam MT, Jing Z, Harada KI, Mieda M, Ono M, Fujiwara H, Daikoku T, Fujiwara T, Maida Y, Ota T, Shimba S, Kaneko S, Fujimura A, Ando H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Brown adipocyte-specific knockout of Bmal1 causes mild but significant thermogenesis impairment in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Metab	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2021.101202	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 三枝理博	4. 巻 72
2. 論文標題 中枢時計・視交叉上核によるサーカディアンリズム発振のメカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳と神経	6. 最初と最後の頁 1143-1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416201667	査読の有無 無
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 Mieda M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 The central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus as an ensemble of multiple oscillatory neurons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.08.003	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 Shioda N, Imai Y, Yabuki Y, Sugimoto W, Yamaguchi K, Wang Y, Hikida T, Sasaoka T, Mieda M, Fukunaga K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Dopamine D2L Receptor Deficiency Causes Stress Vulnerability through 5-HT1A Receptor Dysfunction in Serotonergic Neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 7551-7563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0079-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 三枝理博	4. 巻 71
2. 論文標題 概日時計と睡眠	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 18-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 三枝理博	4. 巻 13
2. 論文標題 レム睡眠発現制御・情動脱力発作とナルコレプシー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 睡眠医療	6. 最初と最後の頁 367-373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Peng Y, Tsuno Y, Matsui A, Hiraoka Y, Tanaka K, Horike S, Daikoku T, Mieda M	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell type-specific genetic manipulation and impaired circadian rhythms in ViptTA knock-in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Physiol	6. 最初と最後の頁 TBD
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.895633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Islam MT, Maejima T, Matsui A, Mieda M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Paraventricular hypothalamic vasopressin neurons induce self-grooming in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-022-00932-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三枝理博
2. 発表標題 中枢時計におけるバソプレシン産生ニューロンの機能
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Islam MT, Rumpf F, Tsuno Y, Maejima T, Mieda M.
2. 発表標題 Vasopressin neurons in the paraventricular hypothalamus induce wakefulness via orexin neurons
3. 学会等名 第98回日本生理学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津野祐輔、前島隆司、長谷川恵美、三枝理博
2. 発表標題 AVPニューロン特異的小胞GABAトランスポーターノックアウトマウスにおける視交叉上核概日リズムのインビボ解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三枝理博
2. 発表標題 中枢概日時計神経ネットワークの遺伝学的解析
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津野祐輔、前島隆司、長谷川恵美、三枝理博
2. 発表標題 AVPニューロン特異的Vgatノックアウトマウスにおける視交叉上核概日リズムのインビトロ、行動、及びインビボ解析
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三枝理博、長谷川恵美、津野祐輔、前島隆司
2. 発表標題 GABAergic transmission of AVP neurons regulates correctly timed output of the central circadian pacemaker of the SCN.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maejima T, Tsuno Y, Miyazaki S, Tsuneoka Y, Hasegawa E, Islam MT, Enoki R, Nakamura TJ, Mieda M.
2. 発表標題 GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsunno Y, Peng Y, Daikoku T, Horike S, Mieda M
2. 発表標題 Cellular clocks of AVP neurons regulate the cellular circadian period of VIP neurons in the mouse SCN in vivo
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mieda M
2. 発表標題 Critical roles of AVP neurons in the central circadian clock of the SCN
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsunno Y, Peng Y, Daikoku T, Horike S, Yamagata K, Maejima T, Mieda M
2. 発表標題 AVP neurons of the SCN act as the principal circadian pacemaker cells in vivo
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Islam MT, Rumpf F, Tsuno Y, Kodani S, Maejima T, Mieda M
2. 発表標題 Vasopressin neurons in the paraventricular hypothalamus promote wakefulness via lateral hypothalamic orexin neurons
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

体内時計のオン・オフタイマー設定機構の一端を解明
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/88959>

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			
ドイツ	University of Wuerzburg			