

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06939

研究課題名(和文) 網膜神経節細胞バソプレシン神経の概日リズムと精神機能への生理的役割の解析

研究課題名(英文) Physiological role of arginine vasopressin released from RGCs on circadian rhythm and psychiatry function

研究代表者

辻 隆宏 (Tsuji, Takahiro)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：40787389

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)：網膜のバソプレシン(AVP)シグナルの生理的意義を解明するために、二つの方法により遺伝子改変モデルマウスを作成した。第一に、AVP細胞にCre recombinaseが発現するマウス(AVP-Cre)にアデノ随伴ウイルス(AAV)の硝子体内投与により網膜特異的にAVPシグナルを操作することを目指した。複数の候補ウイルスのうち、AAV2-CAGGS-Flex-EGFPが最も網膜によく感染するが、感染効率はせいぜい20%ぐらいであった。第二に、AVP特異的にジフテリア受容体を発現するマウスを作成した。このマウスの硝子体内にジフテリア毒素を注入したところ、ほとんどの網膜内AVP細胞が除去されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バソプレシン(AVP)は、網膜や嗅覚系などから脳内に幅広く発現する分子であり、体内の水分ホメオスタシスの維持から概日リズムや社会性などの行動にも関係する分子である。しかし、それら行動の分子機構については解明されていない。申請者の作成した、ジフテリア毒素注入による部位特異的AVP細胞除去システムは、効率的に部位特異的にAVP細胞を除去できる実験系である。この実験系による網膜AVPの生理的機能解明は、概日リズム障害の眼局所投与薬の開発につながる事が期待される。さらに、部位特異的なAVP細胞除去によりAVPの多様な生理的役割の脳内分子機序解明にも応用することができる。

研究成果の概要(英文)：We generated genetically engineered mouse models by two methods, to elucidate the physiological significance of vasopressin (AVP) signaling in the retina. First, we aimed to manipulate AVP signaling specifically in the retina by intravitreal administration of adeno-associated virus (AAV) to mice expressing Cre recombinase in AVP cells (AVP-Cre). Among several candidate viruses, AAV2-CAGGS-Flex-EGFP was found to infect the retina most frequently but about 20% at best in the infection efficiency. Second, we generated mice that express AVP-specific diphtheria receptors. Intraperitoneal and intravitreal injection of diphtheria toxin into these mice resulted in a partial reduction of AVP cells in the brain and retina in the former, and elimination of most intraretinal AVP cells in the latter.

研究分野：神経科学

キーワード：バソプレシン 網膜神経節細胞 視交叉上核 概日リズム 社会的時差ばけ 睡眠障害

1. 研究開始当初の背景

個体の概日リズムは約 24 時間であるが、外界のリズムとは正確に一致しておらず、外界の環境に適応するシステムが必要である。この適応システムで最も強力な因子が光であり、光が概日リズムのずれの調整をおこなう。光情報は網膜神経節細胞から概日リズムの司令塔である視交叉上核(以下、SCN)に伝達され、体内の概日リズムを外界のリズムに同期させる。個体のリズムと外界のリズムのずれが時差ぼけとして定義され、その中でも個体と外界(社会)のリズムとのずれとして、新たに 2006 年に社会的 Jet lag 時差ぼけが提唱された(Chronobiol Int, 2016)。時差ぼけはメタボリック症候群、高血圧、糖尿病や睡眠障害などやガンのリスク、学習障害を引き起こす。時差ぼけの分子メカニズム解明および治療法の開発は社会的要請の高い課題である。

SCN に光シグナルを直接投射する細胞として、2002 年に内因性光感受性網膜神経節細胞(以下、ipRGC)が同定された。ipRGC にはメラノプシン(OPN4)という光受容体が発現しており、網膜神経節細胞自身が直接光を感知している。ipRGC の脳内投射部位は SCN、内側膝状体、視蓋前域、傍視索上核、外側手綱核や扁桃体などであり、概日リズム、瞳孔反応、睡眠覚醒、気分変動、記憶など脳高次機能に関与している。バソプレシン(AVP)は主に視床下部の視索上核や室傍核で産生され、下垂体後葉より分泌され、末梢では電解質バランス、水分保持などに働いている。一方、中枢にも各種受容体が分布しており、社会性、攻撃性、不安、認知機能や記憶などに関与している。これまで AVP および類似分子であるオキシトシン(OT)の社会性などについて研究をしてきた。遺伝子改変ラットを用いて(eGFP-AVP rat)、脳内の AVP の発現を調べたところ、網膜と嗅覚系に豊富に発現していることを発見した。解析をすすめたところ、ipRGC の約 20%に AVP が発現し、SCN に投射していた。光刺激や視神経の電気刺激により、網膜から SCN に AVP が放出され、SCN の一部の神経群の活性化に働くことを SCN の電気生理学的手法およびマイクロダイアライシス法を用いて証明した(J Phys., 2016, 2017, J Neuroendo., 2017)。しかし、ラットでは技術的な制約がありこの投射が個体の行動を変化させるかは証明できず、網膜 AVP シグナルの個体での生理機能はなにかという課題が残った。

SCN は、ipRGC が投射する腹外側部と投射のない背内側部の 2 つに分けられる。光投射部には別の神経ペプチドの VIP や GRP が、非投射部には AVP が発現している。そのため、これまで AVP は光同期などには関わらず、概日リズムを末梢へ伝達する神経ペプチドとして認識されていた。しかし、AVP 受容体である V1a や V1b ノックアウトマウスやその拮抗薬を用いた実験から概日リズムの光同期にも関わっていることが示唆された。特に、時差ぼけマウスモデルで AVP シグナル欠損は時差ぼけを速やかに改善させることがわかった(Science, 2013)。時差ぼけに関わる AVP シグナル伝達経路についてはいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

申請者が発見した網膜神経節細胞にある AVP シグナルの個体生理機能を発見するために、網膜由来の AVP をノックダウンしたモデルマウスを作成する。とりわけ高次脳機能への役割を解明する。特に、網膜神経節細胞から分泌される AVP に着目し、AVP による時差ぼけからの概日リズム再同期機序を明らかにする。また、精神機能(社会性や不安行動)への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 網膜 AVP 特異的遺伝子変異マウスの作成

網膜特異的 AVP 発現細胞の局在

AVP 特異的に Cre recombinase を発現したマウス (AVP-Cre mice, 金沢大学三枝教授供与) に Cre 依存的に tdtomato を発現するマウス (Ai9, Jackson laboratory) と掛け合わせた (AVP-Cre-tdtomato マウス)。安楽死後、眼球を摘出し、網膜切片を作成し、免疫染色にて確認した

AAV ウイルスによる網膜 AVP 特異的発現システムの開発

AVP-Cre mice を 3 種混合麻酔の腹腔内投与により麻酔し、局所麻酔(Benoxyl®) 散瞳剤(SANDOL P®)を点眼後、AAV ウイルスを 1 μ l 硝子体内注射した。ウイルスは、網膜で報告のあった AAV2/1-CAG-hChR2(H134R)-mCherry, AAV2/8-CAG-ChR2-GFP, AAV2/9-CAG-ChR2-Venus, AAV2/8-CAG-Flex-EYFP, and AAV2/9-Flex-ChR2-eYFP(addgene より購入)と AAV2-CAGGS-Flex-EGFP, AAV9-CAGGS-Flex-EGFP, AAVDJ-CAGGS-Flex-EGFP(福島県立医科大学、加藤成樹先生ご提供)を試した。

diphtheria toxin による AVP 特異的細胞除去システムの開発

で作成した AVP-Cre-tdtomato マウスに Cre 依存的に diphtheria toxin receptor (DTR) を発現するマウス (Rosa26iDTR)を掛け合わせ作成した (AVP-Cre-tdtomato-iDTR マウス)。腹腔内 (10ng/weight(g))および硝子体内 (1 ng/ μ l, 2 μ l) 投与後、脳切片作成および網膜フラットマウントを作成し、発現を確認した。

(2) 輪回し概日リズム測定法および jet lag モデルの作成

マウス用回転カゴ(16台、RWC-15、メルクエスト)を導入し、概日リズム行動システムを立ち上げた。動物実験施設内に個室を確保し、光照度および明暗サイクルのコントロールを可能と

した。1 - 2 週間、個別の回転カゴケージで明暗サイクル(12h:12h)に慣れさせた後、高照度 200 ルクス、低照度 50 ルクスで明暗サイクルを 8 時間前進、8 時間後退させることにより(明暗)時差をつくり、輪回し活動量の変化を経時的に計測した。

4. 研究成果

(1) AVP-Cre-tdtomato の網膜内発現部位

tdtomato の自発蛍光により網膜の発現部位を確認した。私達のラットでの既報と同様に、網膜神経節細胞層(RGC)と内顆粒層(INL)の細胞層の発現を確認できた。内因性の AVP の免疫染色と tdtomato のシグナルは一致していた(図 1)。

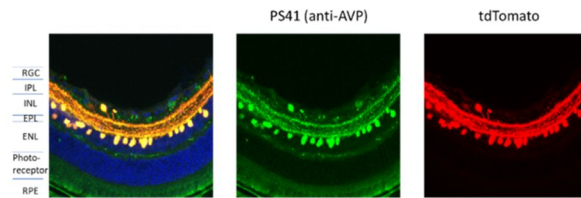


図 1 網膜 AVP の発現部位

(2) AAV ウイルスによる網膜 AVP 特異的な遺伝子発現

複数試した AAV ウイルスの中でも、AAV2-CAGGS-FlEx-EGFP が最もよく発現していた(図 2)。注射部位に最もよく発現していたが、tdtomato のシグナルから推測して、発現は約 20% ぐらいであった。投射部位は視交叉上核と外側膝状体の中間小葉への投射を認めた(Data not shown)。しかしながら、ウイルスによる網膜への発現効率が低かったため、発現効率を上げる方法を開発する必要があった。

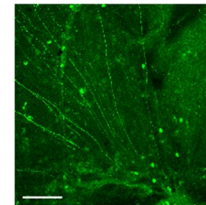


図 2 AVP 特異的な eGFP 発現

(3) Diphtheria toxin による AVP 特異的細胞除去マウスの作成

腹腔内にジフテリア毒素を投与 9 日後、脳内の AVP 細胞を蛍光顕微鏡で tdtomato シグナルを観察した。AVP の主な産生部位である視交叉上核での AVP 細胞の除去が確認できた(図 3)。網膜の AVP 細胞の除去も確認できたが、完全あるいは大部分の細胞除去はできなかった(Data not shown)。

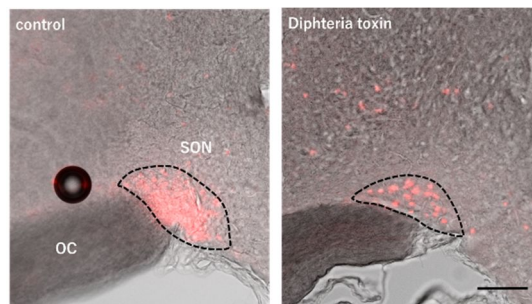


図 3 AVP 特異的神経細胞除去

硝子体内にジフテリア毒素投与 7 日後、網膜フラットマウント切片を作成し、共焦点顕微鏡により、tdtomato シグナルを観察した。網膜神経節細胞層、内顆粒層の細胞とそれらの神経線維が存在する内網状層のシグナルが消失していた(図 4)。

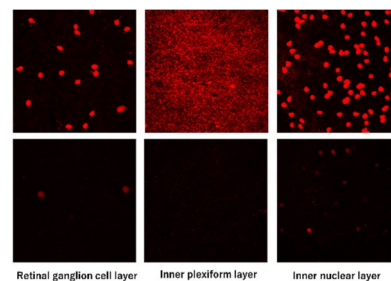


図 4 網膜 AVP 特異的神経細胞除去

(4) 時差ぼけモデルの作成

高照度 200 ルクスでは、オスの野生型マウスでは 8 時間位相前進により 3.75 日、8 時間位相後退により 4.5 日新しい明暗サイクルに適応するのに必要である。申請者の作成した、AVP と異なるある遺伝子 X 改変マウスにこのパラダイムを試したところ、時差ボケがそれぞれ 1.75 日と 1.63 日と速やかに新しい明暗サイクルに適応することを発見した(図 5)。

これらの結果から、網膜 AVP 特異的な細胞除去マウスの作成に成功した。AVP は脳内のさまざまな部位に存在しているが、その生理機能についてはすべて解明されていない。今後、脳の他の部位に存在する AVP 細胞除去による機能解析にこの遺伝子改変マウス(AVP-Cre-tdtomato-iDTR mice)は有用なツールとなる。また、申請者の保持する遺伝子改変マウスが時差ボケを速やかに改善させる表現形を示したことから、このマウスを解析し、AVP 以外の時差ぼけに関与する分子機構を解明することにより、時差ぼけによる健康被害の予防や治療法につながることを期待できる。

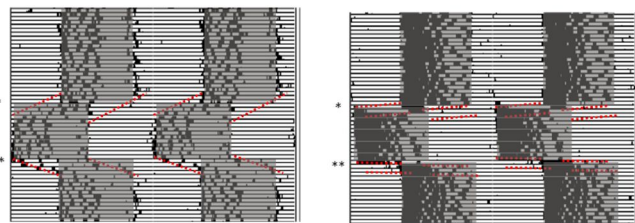


図 5 時差ぼけモデルマウスの作成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuji Chiharu, Fujisaku Tomoaki., Tsuji Takahiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Oxytocin ameliorates maternal separation induced ultrasonic vocalisation calls in mouse pups prenatally exposed to valproic acid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12850	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 Kogami Yuji, Tsuji Takahiro, Tsuji Chiharu, Yokoyama Shigeru, Furuhashi Kazumi, Lopatina Olga, Shabalova Anna, Salmina Alla B., Watanabe Yumi, Hattori Tsuyoshi, Nishimori Katsuhiko, Kodama Kota, Higashida Haruhiro	4. 巻 32
2. 論文標題 A monoclonal antibody raised against a synthetic oxytocin peptide stains mouse hypothalamic neurones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12815	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 Tanaka Sanae, Komagome Aiko, Iguchi-Sherry Aya, Nagasaka Akiko, Yuhi Teruko, Higashida Haruhiro, Rooksby Maki, Kikuchi Mitsuru, Arai Oko, Minami Kana, Tsuji Takahiro, Tsuji Chiharu	4. 巻 10
2. 論文標題 Participatory Art Activities Increase Salivary Oxytocin Secretion of ASD Children	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 680 ~ 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci10100680	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 Tsuji Takahiro, Tsuji Chiharu, Lozic Maja, Ludwig Mike, Leng Gareth	4. 巻 7
2. 論文標題 Coding of odors in the anterior olfactory nucleus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14284	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 該当する

1. 著者名 Tsuji Takahiro, Inatani Masaru, Tsuji Chiharu, Cheranov Stanislav M., Kadonosono Kazuaki	4. 巻 64
2. 論文標題 Oxytocin induced epithelium-mesenchimal transition through Rho-ROCK pathway in ARPE-19 cells, a human retinal pigmental cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101328 ~ 101328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2019.101328	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 Tsuji Takahiro, Furuhashi Kazumi, Gerasimenko Maria, Shabalova Anna, Cherepanov Stanislav M, Minami Kana, Higashida Haruhiro, Tsuji Chiharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Oral Supplementation with L-Carnosine Attenuates Social Recognition Deficits in CD157K0 Mice via Oxytocin Release	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 803 ~ 803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14040803	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 Matsumoto Nozomu, Hori Ikuma, Kajita Masashi K., Murase Tomoya, Nakamura Wataru, Tsuji Takahiro, Miyake Seiji, Inatani Masaru, Konishi Yoshiyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Intermitochondrial signaling regulates the uniform distribution of stationary mitochondria in axons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103704 ~ 103704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2022.103704	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 辻 隆宏	4. 巻 39
2. 論文標題 脳脊髄液圧 (頭蓋内圧) の変化による緑内障性視神経症発症メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神経眼科	6. 最初と最後の頁 10 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11476/shinkeiganka.39.10	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 辻 隆宏、辻 知陽	4. 巻 12
2. 論文標題 嗅覚系・視覚伝達系における神経ペプチド・バソプレシンの脳内での働きの解明をめざして	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 子どものこころと脳の発達	6. 最初と最後の頁 47～52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34572/jcbd.12.1_47	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takahiro Tsuji
2. 発表標題 Coding of odors in the anterior olfactory nucleus
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chiharu Tsuji, Takahiro Tsuji
2. 発表標題 Oxytocin ameliorates maternal separation-induced ultrasonic vocalization calls in mouse pups prenatally exposed to valproic acid
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chiharu Tsuji, Tomoaki Fujisaku, Takahiro Tsuji
2. 発表標題 Reduced emission of ultrasonic vocalization in the valproic acid exposed pups
3. 学会等名 13th World Congress of Neurohypophysial Hormone (WCNH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiharu Tsuji, Pinyue Fu, Zing Zhong, Takahiro Tsuji
2. 発表標題 Establishment of female social behavioral paradigm to detect social deficit in the valproic acid-induced mouse model of autism.
3. 学会等名 第42回日本神経科学・神経化学合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Tomoaki Fujisaku, Takahiro Tsuji
2. 発表標題 Impairment of pup Ultrasonic vocalization of valproic-acid induced mouse model of autism
3. 学会等名 NEURO2019 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji
2. 発表標題 Coding of odors in the anterior olfactory nucleus
3. 学会等名 New Frontier in Neuroscience 2020 International Symposium on Neural Development, Regeneration & Diseases (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Shigeru Yokoyama, Yasuhiko Yamamoto, Haruhiro Higashida, Chiharu Tsuji.
2. 発表標題 Maternal behavior of CD38 KO autism model mouse dam is improved by social support
3. 学会等名 International Symposium on Chronic Disease and Glycation Biology, Kanazawa University, Japan, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Shigeru Yokoyama, Yasuhiko Yamamoto, Haruhiro Higashida, Chiharu Tsuji.
2. 発表標題 Deficit of maternal behavior of CD38 KO autism model mouse induced by the isolation stress is improved by the social support.
3. 学会等名 International Symposium on New Frontiers in Neuroscience, Kanazawa University, Japan, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Chiharu Tsuji.
2. 発表標題 オキシトシンはバルプロ酸暴露マウス仔の母親分離による仔の超音波発声のcomplexタイプを変調する。
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 隆宏
2. 発表標題 脳圧と眼圧の関係について
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会招待講演(サブスペシャリティサンデー)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 辻 隆宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 臨床眼科	5. 総ページ数 2
3. 書名 【すべて見せます!患者説明・同意書マニュアル】神経眼科 視神経炎に対するステロイドパルス治療(解説/特集)	

1. 著者名 辻 隆宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 11
3. 書名 視路・視中枢（視索・外側膝状体・視放線の障害）（視中枢の障害）眼科学第3版（大鹿 哲郎（編集 主幹） / 園田 康平， 近藤 峰生， 稲谷 大（編集）	

〔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
研究 分 担 者	辻 知陽 (Tsuji Chiharu) (00523490)	金沢大学・子どものこころの発達研究センター・協力研究員 (13301)	

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
---------	---------