

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06123・19K21241

研究課題名(和文)ファイバーフォトメトリーを用いた、視交叉上核の細胞種特異的カルシウムイメージング

研究課題名(英文) Cell-type specific calcium imaging of suprachiasmatic nucleus with fiber photometry

研究代表者

津野 祐輔 (TSUNO, Yusuke)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70827154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：視交叉上核AVPニューロン群で特異的にGABAが放出できない、サーカディアンリズム障害マウスにおいて、AVPニューロンのカルシウムリズムと、動物行動リズムとの関係性が崩れることを、ファイバーフォトメトリー法を用いて見出した(Maejima, Tsuno et al., submitted)。自由行動下マウスの視交叉上核AVPニューロンの長時間記録を行い、通常ではカルシウムリズムのピークが動物行動の終了時点に対応するが、ノックアウトマウスでその関係性が崩れていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視交叉上核ニューロンの中でも、AVPニューロンの重要性を示唆する結果であり、本研究は学術的に意義深い。サーカディアンリズムは、昼の活動と、夜の睡眠のリズムを制御し、この変調は睡眠障害や精神疾患の原因となりうる。サーカディアンリズムの生成メカニズムを理解することで、睡眠障害やシフト勤務といった日内リズムの変調を正す手掛かりが得られる。

研究成果の概要(英文)：Using fiber photometry, we found that the relationship between calcium rhythms of AVP neurons and animal behavioral rhythms was disrupted in circadian rhythm-deficient mice in which suprachiasmatic nucleus AVP neurons could not release GABA specifically. (Maejima, Tsuno et al., Submitted). Long-term recordings of suprachiasmatic nucleus AVP neurons in freely moving mice showed that the peak of calcium rhythm usually corresponds to the end of animal behavior, but that the relationship was broken in knockout mice.

研究分野：神経生理学

キーワード：サーカディアンリズム 視交叉上核 ファイバーフォトメトリー カルシウムイメージング インビボ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サーカディアンリズム (概日リズム) は、地球上の生物に幅広く見られる現象であり、昼夜の変化に合わせて、個体の活動を最適化するシステムであると考えられる。哺乳類においては、全身の個々の細胞の時計遺伝子の発現が日内変動を示すが、それらを安定化し同期させているのが、脳の視交叉上核である。視交叉上核からのシグナルによって、個体の日内リズムは地球上における一日と同期する。日内リズムの変調は、様々な身体的・精神的ストレスを引き起こし、精神疾患の原因となりうる。このサーカディアンリズムは、どのようなメカニズムで制御されているのであろうか。また、視交叉上核はどのようなシグナルを全身に送っているのであろうか。さらに、視交叉上核内では、どのようにサーカディアンリズムがコードされているのであろうか。これらの問いに答えることにより、ヒトのサーカディアンリズムを理解し、睡眠障害やシフト勤務といった日内リズムの変調に対する、効果的な対処法が得られると期待できる。

哺乳類のサーカディアンリズムを制御する中枢は、視床下部の視交叉上核である。視交叉上核は GABA 性ニューロンの集合体であり、背内側には AVP (arginine vasopressin) ニューロンが、腹外側には VIP (vasoactive intestinal polypeptide) ニューロンが集まっている。VIP 欠損マウスのサーカディアンリズムは顕著な異常を示すことから、多くの研究者が VIP ニューロンに注目している。その中で三枝らは AVP ニューロンがサーカディアンリズム調節の鍵であるという証拠を見出してきた。AVP ニューロン特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスを用いて、時計遺伝子の一つである *Bmal1* をノックアウトしたマウス (AVP-Bmal1^{-/-}) では、サーカディアンリズムの周期が延長し、また強度が弱まる (Mieda et al., 2015)。また、AVP ニューロン特異的に、時計遺伝子を制御するリン酸化酵素 CK1 δ (casein kinase 1 delta) をノックアウトしたマウスでは、概日リズムの周期が延長した (Mieda et al., 2016)。さらに、AVP ニューロン特異的に CK1 δ を過剰発現したマウスでは、概日リズムの周期が短縮した (Mieda et al., 2016)。AVP ニューロン内に限局した CK1 δ の発現の有無によって、サーカディアンリズムが延長したり短縮したりすることから、AVP ニューロンが個体のサーカディアンリズム制御に重要な役割を担うことが示唆された。

2. 研究の目的

この AVP ニューロン特異的変異マウスの個体レベルでのサーカディアンリズムの異常は、AVP ニューロンの活動の変化と完全に一致しているのだろうか? 本研究ではこの、個体レベルでのサーカディアンリズムの異常と、AVP ニューロン活動の日内リズムとの相関を、インビボで調べることを目的とする。そのために、AVP ニューロンのインビボでの活動を記録し、その日内変動を調べる。これにより、AVP ニューロン特異的遺伝子改変マウスにおいて、どのようなメカニズムで、個体のサーカディアンリズムへの影響が起こるかを調べる。

これまでに個体レベルのサーカディアンリズム変調のメカニズムを理解するために、視交叉上核スライスを用いた研究は広く行われてきた。しかしながら、必ずしも個体レベルの変調と、脳スライスで見られるサーカディアンリズムの変化が一致しない。原因として、視交叉上核内及び周囲との神経ネットワークを破壊している可能性や、GABA や神経ペプチド等の伝達物質をウォッシュアウトしている可能性が考えられる。インビボ計測の必要性が考えられてきたが、実際に記録が行われた例は非常に少ない。この点において、自由行動下動物からインビボ計測を行う本研究には独自性がある。また、サーカディアンリズムのような長期間の記録は難しくこれまでにほとんど無い。脳深部からカルシウムイメージングを行うファイバーフォトメトリーは、長期間記録を可能にする新しい技術である。さらに、必要な遺伝学的ツールが使用可能であり、遺伝学と生理学を融合した研究を行える点で、他研究室とは一線を画する。

3. 研究の方法

本研究において申請者は、視交叉上核 AVP ニューロン活動の日内リズムを調べる。そのために、AVP ニューロン特異的に、カルシウムインディケータ GCaMP を発現させる。AVP-Cre マウスの視交叉上核に、Cre 依存的に GCaMP を発現するウイルスベクター (AAV. CAG. DIO. jGCaMP7s) をハミルトンシリンジで注入し、加えて記録用のオプティカルファイバーを埋め込む。2~4 週間待ち GCaMP6s を十分発現させた後、ファイバーフォトメトリー法による、インビボカルシウムイメージングを行う。ファイバーフォトメトリー法とは、脳内に埋め込んだオプティカルファイバーを介して光を照射し、細胞から放出される蛍光を検出する手法である。5 日間の明暗サイクルの後、10 日間の暗サイクル環境に置き、その間の個体の活動と AVP ニューロンのカルシウム活動を同時記録する。そして、AVP ニューロン活動の日内変動が、個体レベルの日内変動とどの程度同期しているのかを、AVP ニューロン特異的遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。遺伝子改変マウスとしては、サーカディアンリズムが変調している AVP-Vgat^{-/-} マウスを用いる。この遺伝子改変マウスの AVP ニューロンが、どのような日内リズムで活動している

かを、カルシウムイメージングによって、カルシウムダイナミクスを記録することによって調べる。

4. 研究成果

本研究において、視交叉上核 AVP ニューロン群で特異的に GABA が放出できない、サーカディアンリズム障害マウスにおいて、AVP ニューロンのカルシウムリズムと、動物行動リズムとの関係性が崩れることを、ファイバーフォトメトリー法を用いて見出した(Maejima, Tsuno et al., submitted, 図1)。

私の所属する研究室において、視交叉上核 AVP ニューロン特異的に小胞 GABA トランスポーターをノックアウトしたマウス (*AVP-Vgat^{-/-}*) では、動物行動リズムに異常が起こることが発見された。しかしながら、視交叉上核ニューロンの活動にどのような変化が見られるかは不明であった。そこで私は、ファイバーフォトメトリー法を用いて自由行動下マウスの視交叉上核 AVP ニューロンの長時間記録を行い、通常ではカルシウムリズムのピークが動物行動の終了時点に対応するが、ノックアウトマウスでその関係性が崩れていることを見出した。

本研究において私は、視交叉上核ニューロンの活動を細胞種特異的に計測するシステムを構築した。細胞活動に伴うカルシウム濃度上昇を検出するために、脳内から蛍光を検出するファイバーフォトメトリー法を用いた。当初は退色の影響が大きく、日内リズムを観察することが難しかったが、励起光強度、励起・記録時間、励起光源の種類に関する条件検討を行い、方法を確立した。AVP ニューロンのカルシウム活動を15日間という長期にわたり連続記録することに成功した。加えて、個体の活動を同時に記録する系を立ち上げた。そして、AVP ニューロン活動の日内変動が、個体レベルの日内変動とどの程度同期しているのかを、AVP ニューロン特異的遺伝子改変マウスを用いて明らかにした。

この成果は、視交叉上核内の GABA ネットワークの意義を知るうえで、重要な知見である。今後は、カルシウムリズムの他に、時計遺伝子発現や、GABA 入力 of 長期間記録を行い、さらに研究を進展させる。

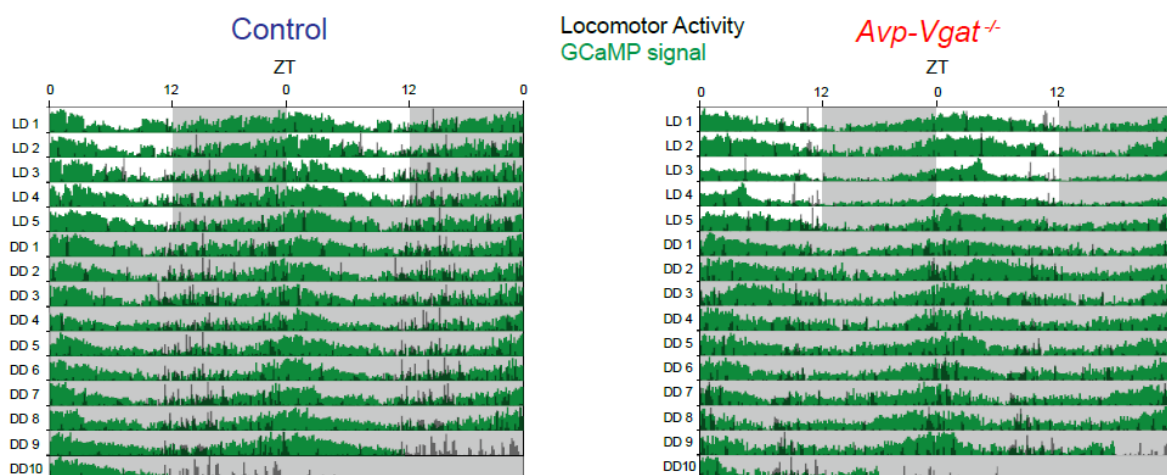


図1. 視交叉上核 AVP ニューロンにおける in vivo カルシウム活動と、動物行動の日内変動。縦軸は日、横軸は二日間の時間。5 日間の明暗条件 (LD) の後、10 日間の恒暗条件 (DD) で連続記録。緑：カルシウムシグナル、黒：動物行動活動。左：コントロール、右：*AVP-Vgat^{-/-}*。コントロールでは、動物行動の終わりとカルシウムリズムのピークが、ほぼ同じ時 (ZT=0) であるのに対して、*AVP-Vgat^{-/-}* ではその関係性が崩れている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuke Tsuno, Takashi Maejima, Emi Hasegawa, Michihiro Mieda
2. 発表標題 In vitro, behavioral, and in vivo analysis of circadian rhythm of suprachiasmatic nucleus in AVP-Vgat ^{-/-} mice
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 Yusuke Tsuno, Takashi Maejima, Emi Hasegawa, Michihiro Mieda
2. 発表標題 In vitro, behavioral, and in vivo analysis of circadian rhythm of suprachiasmatic nucleus in AVP-Vgat ^{-/-} mice
3. 学会等名 New Frontier in Neuroscience 2020, Kanazawa University (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Tsuno, Takashi Maejima, Emi Hasegawa, Michihiro Mieda
2. 発表標題 In vivo analysis of circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus in AVP neuron-specific vesicular GABA transporter knock-out mice
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----