

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07732

研究課題名(和文) 覚醒制御における前脳基底部分アセチルコリン神経細胞内の分子シグナル機構の解明

研究課題名(英文) Molecular signaling mechanisms in basal forebrain acetylcholine neurons in the control of arousal.

研究代表者

丹羽 康貴 (Niwa, Yasutaka)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40590071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：初年度は尾静脈からPHP.eB型AAVを導入することで、前脳基底部分アセチルコリン神経を阻害し、トランスジェニックマウスによる阻害時と同様の睡眠覚醒異常が再現されるかを検証したが、統計学的に有意な差は見られなかった。そこで方針を変えて、2～3年度に破傷風毒を発現するAAVの作成、キャピラリーインジェクションによるウイルス導入、そしてインジェクションしたマウスの脳波・筋電図測定および免疫組織化学による導入遺伝子発現の確認までの一連の実験を行う実験系を確立することができた。3年度途中で研究代表者の他機関への異動が決まったため、計画の中断を余儀なくされ、異動後の再立ち上げが必要となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは人生のおよそ3分の1を睡眠に費やす。裏を返せば残りの3分の2は覚醒時間であるが、この間に私たちは様々な活動を行い、脳には多様な情報が入ってくる。こうした情報は異なる時間幅で処理されて、次の行動へと反映される。脳を中心とする神経回路上の電気信号による情報伝達は、速い覚醒制御を説明する上では有用であるが、時間-日レベルのゆっくりとした情報処理・応答をうまく説明することができない。本研究は、ゆっくりとした情報処理・応答が特定の神経回路網においてどのように行われているかの解明を試みるチャレンジングなものである。本研究によって立ち上げた実験系を用いて、今後さらなる解明が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the first fiscal year, we tested whether inhibition of basal forebrain acetylcholine neurons by introduction of PHP.eB AAV through the tail vein reproduced the same sleep-wake abnormalities as inhibition in transgenic mice, but no statistically significant differences were observed. In the second and third fiscal year, we changed the course of our research and established a series of experiments including preparation of AAV expressing tetanus toxin, introduction of the virus by capillary injection, EEG and EMG measurements and confirmation of transgene expression by immunohistochemistry in the injected mice. In the middle of the third fiscal year, the project had to be suspended due to the transfer of the principal investigator to another institution. The project had to be restarted after the transfer.

研究分野：睡眠医科学

キーワード：前脳基底部分 Ntrk1 アセチルコリン 睡眠覚醒

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは人生のおよそ3分の1を睡眠に費やす。裏を返せば残りの3分の2は覚醒時間であるが、この間に私たちは様々な活動を行い、脳には多様な情報が入ってくる。こうした情報は異なる時間幅で処理されて、次の行動へと反映される。例えば網膜から入ってきた視覚情報は、外側膝状体を介して第一次視覚野へと伝えられ情報処理される。その際、情報は神経回路上を電気信号として瞬時に伝達されていく。そのため、目の前に飛び出てきた障害物に対しても、即座に反応し避けることができる。一方で、1日中講義を聞いた後や、何時間も夢中になって物事に取り組んだ後、頭の中が飽和状態になった気がしたり眠気が出たりする経験から、上記のような神経回路上の電気信号による速い情報処理・応答とは明らかに異なる時間幅を持ったメカニズムによる覚醒制御機構の存在が示唆される。

覚醒を支える神経基盤は古くからよく研究されており、Moruzzi と Magoun が提唱した上行性毛様体賦活系と呼ばれる概念が注目されてきた(Moruzzi & Magoun 1949)。その後の詳細な研究によって、上行性毛様体賦活系の神経基盤として、オレキシン神経やモノアミン神経およびアセチルコリン神経が大きく関わっていることが明らかになってきている(Sakurai 2007, Saper et al. 2010)。これらの神経回路網は速い覚醒制御を説明する上では有用であるが、それらの回路上の電気信号による情報伝達だけでは上記のような時間～日レベルのゆっくりとした情報処理・応答をうまく説明することができない。すなわち、覚醒制御における時間～日レベルのゆっくりとした情報処理・応答が上記神経回路網において一体どのように行われているのか、またそれを担っているものは一体何なのかという問いが研究開始当初の背景としてあった。

2. 研究の目的

代表者らはこれまでに遺伝学的手法を駆使して前脳基底部分アセチルコリン神経の阻害マウスを作製することに成功し、そのマウスが非常に深刻な覚醒異常を示すことを発見した(Niwa et al. 2018)。前脳基底部分アセチルコリン神経はアルツハイマー病で初期に障害されることが知られており、覚醒制御にとって重要な神経であることが示されている。代表者らは Ntrk1 遺伝子の前脳基底部分特異的な発現パターンを利用することで、前脳基底部分および脳幹に分かれて局在するアセチルコリン神経のうち前脳基底部分のアセチルコリン神経のみを遺伝学的に操作できることを示した(Niwa et al. 2018)。

Ntrk1 遺伝子はチロシナーゼ型受容体をコードしており、そのリガンドとして神経成長因子 NGF が知られている。NGF-Ntrk1 シグナルは培養神経細胞や末梢神経細胞において、細胞の生存維持、神経突起の伸長促進、神経伝達物質の合成促進などの作用を示す。また、軽度認知機能障害や初期のアルツハイマー病患者において前脳基底部分の Ntrk1 陽性細胞数は認知機能テストの成績と相関することも知られている(Mufson et al. 2000)。このようにして、前脳基底部分の Ntrk1 陽性神経細胞が覚醒制御に重要な働きをしていることは分かっているが、その神経細胞において NGF-Ntrk1 シグナルが覚醒制御にどの程度寄与しているのかについてはほとんど分かっていない。

そこで本研究課題では、**前脳基底部分アセチルコリン神経細胞内の NGF-Ntrk1 シグナルが、覚醒制御における時間～日レベルのゆっくりとした情報処理・応答に何らかの関与をしているのではないか**という作業仮説を立て、それを実験的に証明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではまずコントロール実験として、尾静脈から PHP.eB 型のアデノ随伴ウイルス(AAV)を導入することで、前脳基底部分アセチルコリン神経を阻害し、トランスジェニックマウスによる阻害と同様の睡眠覚醒異常(Niwa et al. 2018)が再現されるかを検証する。具体的には Cre 依存的に破傷風毒の発現が誘導されるコンストラクトおよび AAV を作製する。この AAV を前脳基底部分アセチルコリン神経に Cre の発現が見られる Ntrk1-IRES-Cre マウスの尾静脈から導入し、その睡眠覚醒行動を調べる。この実験によって、トランスジェニックマウスと同様の睡眠覚醒異常が再現された場合は、PHP.eB 型の AAV を用いた Ntrk1 シグナル関連分子の過剰発現および睡眠測定による睡眠覚醒行動の検証へと進める。

もし PHP.eB 型の AAV による前脳基底部分アセチルコリン神経の阻害がうまくいかなかった場合は、キャピラリーインジェクションによる AAV の局所投与に切り替えて実験を行う。また、その場合には前脳基底部分アセチルコリン神経の主な投射先である大脳皮質や海馬領域への AAV 局所投与も検討し、逆行性に AAV を感染させて前脳基底部分アセチルコリン神経を阻害する方法についても検討する。

4. 研究成果

本研究ではまず初年度に、尾静脈から PHP.eB 型 AAV を導入することで、前脳基底部分アセチルコリン神経を阻害し、トランスジェニックマウスによる阻害と同様の睡眠覚醒異常(Niwa et al. 2018)が再現されるかを検証した。具体的には Cre 依存的に破傷風毒の発現が誘導されるコンストラクトおよび AAV を作製した。この AAV を前脳基底部分アセチルコリン神経に Cre の発現が

見られる Ntrk1-IRES-Cre マウスの尾静脈から導入し、その睡眠覚醒行動を調べた。その結果、トランスジェニックマウスによる阻害で見られたような暗期の覚醒時間が増える傾向は見られなかったが、コントロールとの差は統計学的に有意ではなかった。この原因として、前脳基底部での感染効率がそれほど高くないことが考えられる。そこで、前脳基底部アセチルコリン神経やその投射領域へ直接インジェクションすることで、感染効率を上げて、行動学的な変化が見られないかを検証していく方針へと切り替えた。

2年度は、前脳基底部アセチルコリン神経における Ntrk1 シグナル関連分子の過剰発現マウスを作製し検証するための予備実験に取り組んだ。具体的には、AAV のキャピラリーインジェクションが可能な実験系を確立することができた。また、導入遺伝子の発現を免疫組織化学によって確認する実験系を確立することができた(図1)。

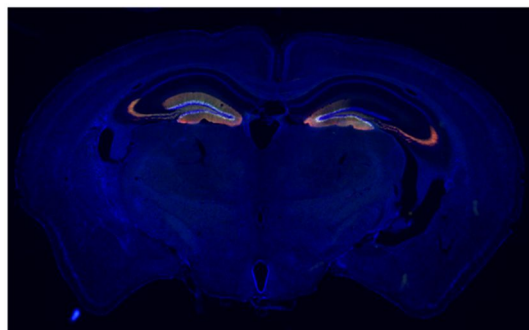


図1 Creマウスを用いてAAVの局所投与を行い、Cre依存的なマーカー遺伝子の発現を免疫組織化学により確認する系を確立した(赤および緑がマーカー遺伝子発現で、青色はDAPI染色)。

3年度は、前脳基底部アセチルコリン神経における Ntrk1 シグナル関連分子の過剰発現マウスを作製し検証するためのさらなる予備実験に取り組んだ。具体的には破傷風毒を発現する AAV の作成、キャピラリーインジェクションによるウイルス導入、そしてインジェクションしたマウスの脳波・筋電図測定および免疫組織化学による導入遺伝子発現の確認までの一連の実験を行う実験系を確立することができた(図2)。しかし、サンプルサイズを増やすことを計画している段階で研究代表者の他機関への異動が決まったため、計画の中断を余儀なくされた。



図2 キャピラリーインジェクションによるAAVの局所投与を行い、続けてマウスの脳波・筋電図測定用の電極留置を行う様子。

補助事業期間延長を経て4年度は、脳波・筋電図測定系の再立ち上げを行い、小規模での測定が可能になった。しかし、キャピラリーインジェクションによるウイルス導入や、インジェクションしたマウスの脳波・筋電図測定および免疫組織化学による導入遺伝子発現の確認までの一連の実験を立ち上げることはできず、今後の課題となった。

<引用文献>

Moruzzi, Giuseppe, and Horace Winchell Magoun. "Brain stem reticular formation and activation of the EEG." *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1.1-4 (1949): 455-473.

Sakurai, Takeshi. "The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness." *Nature Reviews Neuroscience* 8.3 (2007): 171-181.

Saper, Clifford B., et al. "Sleep state switching." *Neuron* 68.6 (2010): 1023-1042.

Niwa, Yasutaka, et al. "Muscarinic acetylcholine receptors Chrm1 and Chrm3 are essential for REM sleep." *Cell Reports* 24.9 (2018): 2231-2247.

Mufson, Elliott J., et al. "Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease." *Journal of Comparative Neurology* 427.1 (2000): 19-30.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Prokofeva Kseniia, Saito Yuki C., Niwa Yasutaka, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Hirano Arisa, Sakurai Takeshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Structure and Function of Neuronal Circuits Linking Ventrolateral Preoptic Nucleus and Lateral Hypothalamic Area	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4075 ~ 4092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1913-22.2023	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 Masuda Kosaku, Katsuda Yoko, Niwa Yasutaka, Sakurai Takeshi, Hirano Arisa	4. 巻 17
2. 論文標題 Analysis of circadian rhythm components in EEG/EMG data of aged mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2023.1173537	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 Murakami Agnieszka M., Yonekura Manabu, Nagatomo Katsuhiko, Niwa Yasutaka, Itagaki Shirou, Murakami Manabu	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid method for plasmid DNA recombination (Murakami-system)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 102167 ~ 102167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mex.2023.102167	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 Murakami Agnieszka M., Nagatomo Katsuhiko, Miyoshi Ichiro, Itagaki Shirou, Niwa Yasutaka, Murakami Manabu	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel binding site between the voltage-dependent calcium channel CaV1.2 subunit and CaV 2 subunit discovered using a new analysis method for protein-protein interactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-41168-4	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 Murakami Manabu, Murakami Agnieszka M, Yonekura Manabu, Miyoshi Ichiro, Itagaki Shirou, Niwa Yasutaka	4. 巻 2
2. 論文標題 A simple, dual direct expression plasmid system in prokaryotic and mammalian cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad139	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasutaka Niwa, Hirotaka Obo, Jurgen Wess, Takeshi Sakurai
2. 発表標題 Molecular genetics of muscarinic regulation during sleep and wakefulness
3. 学会等名 JNS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasutaka Niwa, Hirotaka Obo, Jurgen Wess, Takeshi Sakurai
2. 発表標題 Molecular genetics of muscarinic regulation during sleep and wakefulness
3. 学会等名 FENS forum (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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