

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21498

研究課題名（和文）中枢体内時計全体を包括した光同調メカニズムの統合的理解

研究課題名（英文）Integrated understanding of the light entrainment mechanism encompassing the entire 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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：視床下部視交叉上核（SCN）の中枢体内時計は、網膜から伝わる外界の昼夜サイクルに同調する（光同調）。SCNは背内側部（shell）と腹外側部（core）の二領域に大別される。光情報はまずcore細胞に伝えられ、coreからshellに情報が送られ、SCN全体の位相がシフトする。入力部・core細胞の情報伝達については研究が進んでいる。しかし光同調の成立には、細胞数も多く概日振動も大きいshellでも位相がシフトして固定される必要があるが、この過程は不明である。我々はSCN shellの特異的遺伝子操作により光同調能が劇的に変化したマウスを得たので、その詳細な解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠に問題を抱える日本人は5人に1人に上る。シフトワークや生活習慣の乱れは、睡眠の主要な制御機構である体内時計に変調をきたし、睡眠障害のみならず、気分障害、肥満、心筋梗塞、がん等、様々な疾患・健康障害のリスクを著しく増大する。中枢体内時計の内因性周期は24時間から少しずれているので、光同調は24時間周期の社会生活を健全に営む上で極めて重要である。また、夜間に人工光を浴びると体内時計が乱れ、睡眠や種々の生体機能に問題が生じる（光害）。本研究により中枢体内時計全体を包括した光同調メカニズムに関する、根本的かつ統合的な理解が得られれば、その学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The central circadian clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is synchronized to the day-night cycle of the external world transmitted from the retina (light entrainment). Light information is first transmitted to the core cells, and then information is sent from the core to the shell, resulting in a phase shift of the entire SCN. The signal transduction mechanisms of core cells have been well studied. However, for light entrainment to be established, the shell, which has a large number of cells and large circadian oscillations, must also undergo a phase shift and become fixed, but this process is not known. We have obtained mice with dramatically altered light-entrainment ability by specific genetic manipulation of the SCN shell, and have analyzed it in detail.

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 時差

1. 研究開始当初の背景

睡眠に問題を抱える日本人は5人に1人に上る。シフトワークや生活習慣の乱れは、睡眠の主要な制御機構である体内時計に変調をきたし、睡眠障害のみならず、気分障害、肥満、心筋梗塞、がん等、様々な疾患・健康障害のリスクを著しく増大する。哺乳類では、視床下部視交叉上核 (SCN) の中枢体内時計が概日 (サーカディアン) リズムを自律的に発振し、全身に時刻情報を発信する。また中枢体内時計は、網膜視床下部路を介して伝わる外界の明暗 (昼夜) サイクルに同調する (光同調)。その内因性周期は24時間から少しずれているので (概日時計)、光同調は24時間周期の社会生活を健全に営む上で極めて重要である。一方、夜間に人工光を浴びると体内時計が乱れ、睡眠や種々の生体機能に問題が生じる (光害)。

SCNは背内側部 (shell) と腹外側部 (core) の二領域に大別される。網膜視床下部路はcoreに投射して光情報をまずcore細胞に伝え、その後coreからshellに情報が送られ、SCN全体の位相がシフトする。光同調の入力部であるcore細胞の情報伝達については研究が進んでいる。しかし光同調の成立には、細胞数も多く概日振動も大きいshellでも位相がシフトして固定される必要があるが、この過程の研究はほぼ皆無であった。

2. 研究の目的

前述のように、これまでの光同調メカニズムの研究は、網膜視床下部路から光受容領域のSCN core細胞への神経伝達物質、およびcore細胞内でのシグナル伝達機構に関するものがほとんどで、coreからshell細胞にどのように情報が伝えられて、新たな位相に概日振動がセットされるのか、との問題は残ったままであった。shellの方が細胞数も多く、時計遺伝子発現リズムの振幅も大きい。また我々のこれまでの研究で、shellは概日リズム発振に極めて重要であることが明らかになってきた。SCN概日振動体の主要な部分を担うshellにどのように明暗サイクル情報が伝わり保持されるのか、極めて核心的な問題である。

幸運なことに、予想だにしない劇的な異常がSCN shellの光同調メカニズムに生じているマウスモデル (AVPニューロン特異的 *Nalcn* 欠損マウス: *Avp-Nalcn*^{-/-}) を得ることができた。我々がこれまでに蓄積してきたツールや技術を用いて当該モデルを解析することで、中枢体内時計全体を包括した光同調メカニズムに関する、根本的かつ統合的な理解を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

SCN shellを代表するAVP (arginine vasopressin) 産生ニューロンで特異的にリークNa⁺チャネル (*Nalcn*) を欠損したマウス (*Avp-Cre* x *Nalcn*^{fllox/fllox} = *Avp-Nalcn*^{-/-}) は、光同調に劇的な異常を示すことが、予備的な実験により分かった。そこで *Avp-Nalcn*^{-/-}マウスの詳細な行動解析を行った。

Avp-Nalcn^{-/-}マウスのSCN coreでは遺伝子操作を行っていないので、当該マウスの光同調異常の原因として、原因として、coreからshellへの情報伝達が異常、shell細胞間のカップリング低下により新たな位相がなかなか定まらない、等の可能性が考えられた。このような *Avp-Nalcn*^{-/-}マウスのSCNの異常をex vivoで調べるため、細胞レベルでの概日リズムをexplantで解析できる *Per2::Luc* レポーターマウスと組み合わせ、SCN explantでの解析を試みた。

In vivoでもcore・shell間の情報伝達を調べるために、緑色Ca²⁺センサー蛋白質 jRCaMP7sをAAVベクターを用いてSCNに発現させ、ファイバーフォトメトリーを用い、神経活動の指標として細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を計測することを計画した。In vivoで光ファイバーの位置だけでcoreとshellを区別することは不可能なので、shellの主なニューロンとしてAVPニューロン、coreの代表としてVIPニューロンで計測した。*Avp-Nalcn*^{-/-}マウスをさらに *Vip-tTA* マウス (VIPニューロン特異的 tTA2 発現マウス) と交配した。AVPニューロンにはCre依存性 (DIO) 発現 AAVベクター、VIPニューロンには tTA2 依存性 (TREプロモーター) AAVベクターをSCNに局所感染させて jRCaMP7s を特異的に発現させた。*Avp-Nalcn*^{-/-}マウスは *Avp-Cre* を含み、またAVP、VIPニューロンは近接しているので、このようにCreとtTA2を組み合わせて始めて、*Avp-Nalcn*^{-/-}マウスにおけるVIPニューロンの計測が可能になる。

4. 研究成果

① *Avp-Nalcn*^{-/-}マウスは、光同調能が劇的に変化しているとの予備的データが得られていた。ここでまず、詳細な概日行動リズムの解析を行い、また当該マウスの光刺激に対する位相反応曲線を作成した。主観的夜前半 (CT14) での30分の光パルスでは、コントロールマウスでは概日行動リズムの位相が後退するが、*Avp-Nalcn*^{-/-}マウスでは一時的に位相後退が観察されるものの、すぐに元の位相に戻るか、あるいはやや位相が前進した。一方、コントロールマウスで位相前進

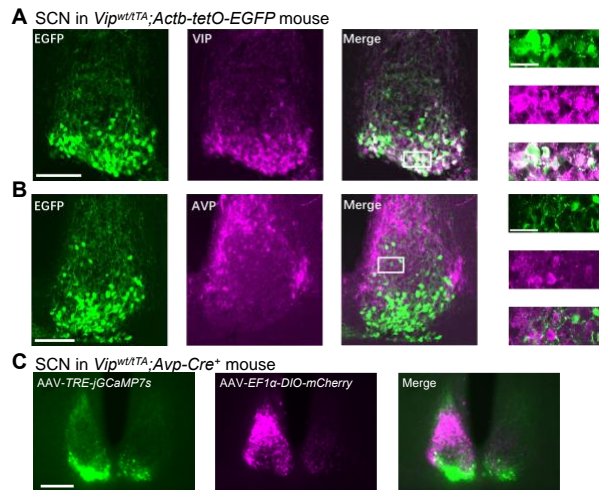
を引き起こす CT22 での光パルス照射は、*Avp-Nalcn*^{-/-}マウスでは位相前進が極端に大きくなった。興味深いことに、大きな雌雄差が観察され、メスの方が異常の程度が大きかった。

② *Avp-Nalcn*^{-/-}マウスと *Per2::Luc* レポーターマウスを交配し、SCN explant の発光イメージングによる解析を行ったが、explant では光パルスによる位相シフトを上手く再現できなかった。

③ gain of function 型の変異 *Nalcn* を AVP ニューロン特異的に発現するマウスを作成し解析したが、その概日行動リズムに大きな異常は観察されなかった。

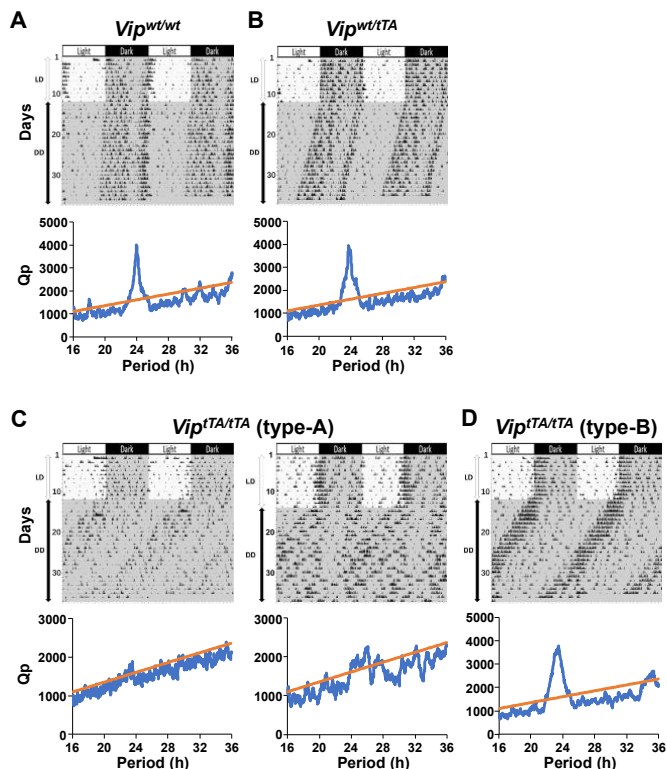
④ *Avp-Nalcn*^{-/-}マウスなど、*Avp-Cre* マウスを用いた AVP ニューロン特異的遺伝子改変マウスにおいて、SCN VIP ニューロンの細胞内 Ca 計測や神経活動操作などを目的とした特異的遺伝子操作を行うため、*Vip-tTA* ノックインマウスを作成し、機能解析を行った。当該マウスにおいて VIP ニューロンに特異的に遺伝子導入できること (図 1)、ノックインにより内在性 *Vip* 遺伝子発現が阻害されるのでホモ接合体マウスは既に報告のある *Vip* ノックアウトマウスと同様の概日リズム障害を呈することを示し、論文発表した (図 2) (Peng et al, Front Physiol 2022)。

図1 *Vip-tTA* マウスにおける tTA の発現特異性
SCN において、ほとんどの tTA 発現細胞は VIP 陽性 (A) かつ AVP 陰性 (B) である。*Avp-Cre* マウスと交配し、tTA 依存的 AAV、Cre 依存的 AAV ベクターをインジェクションすることで、AVP ニューロンと VIP ニューロンに異なる遺伝子操作を加えることが可能になる (C)。



⑤ *Avp-Nalcn*^{-/-}マウスと tdTomato レポーターマウスと交配したマウスを作成し、SCN スライス の電気生理学的解析を現在行っている。また、*Avp-Nalcn*^{-/-}マウスと *Vip-tTA* マウスを交配した。Cre 依存的あるいは tTA 依存的 jGCaMP7s 発現 AAV ベクターを SCN に局所投与して、ファイバースコープを用いて in vivo での細胞内 Ca リズムを AVP ニューロン、VIP ニューロンそれぞれで計測する実験を開始した。光パルス照射に対する AVP、VIP ニューロンの短期、長期における応答を、in vivo で測定できる。

図2 *Vip-tTA* マウスホモ接合体は VIP ノックアウトと同様の概日リズム異常を示す
A: 野生型
B: ヘテロ接合体
C: ホモ接合体、arrhythmicity や multiple-period を示す個体 (type-A)
D: ホモ接合体、短周期を示す個体 (type-B)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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 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 VipT ^{TA} 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6件(うち招待講演 2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 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 Tsuno 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 Tsuno 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

〔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
---------	---------