

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15219

研究課題名（和文）微弱光による冬眠様状態QIH誘導法開発とQIHにおける血圧・心拍調節機構の理解

研究課題名（英文）Development of a method for inducing a hibernation-like state (QIH) using weak light and understanding of the mechanisms of blood pressure and heart rate regulation in QIH

研究代表者

高橋 徹 (Takahashi, Tohru)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：10919137

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：これまで、神経細胞の興奮を長時間（e.g., 24時間）持続させ、かつON-OFFの時間分解能高い方法は確立されていなかった。そこで本研究では、光操作を冬眠という長期的な表現型にアプライするという、すなわち光刺激による冬眠様低代謝状態QIH（OPN4-QIH）誘導法の創出を第一目標にし、これを達成した。具体的には、光受容体オプシンOPN4（オプシン4、メラノプシン）を改変し、長期刺激に耐えうる改変型オプシンOPN4dCを作出し、24時間QIH誘導のために最適化した。加えて、このOPN4-QIHにおける血圧・心拍数・体温のマルチ動態を解析し、Qニューロンが有する心血管系調節機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年われわれは、哺乳類を冬眠様状態誘導QIHに誘う神経細胞群Qニューロンの同定に成功した。近い将来、このQニューロンを制御・操作して人工冬眠を実現するためには、この細胞群を適切に操作し、その活動パターンを正確に理解する必要がある。

そこで本研究では、より自由に誘導・操作できるQIHを実現するために、長時間刺激が可能な微弱光でQIHを誘導する方法を開発した。また、自然の冬眠の特徴の1つである「体温変化に依存しない心血管系の制御」に着目し、この光制御されたQIHにおいて血圧、心拍数、体温を同時に計測・評価した。その結果、QIHは心血管系調節の観点からも、自然の冬眠に近い状態であると証明された。

研究成果の概要（英文）：Until now, no method had been established that could sustain neuronal excitation for a long period of time (e.g., 24 hours) and switch it ON-OFF with high time resolution. In this study, therefore, our primary goal was to apply light manipulation to the long-term phenotype of hibernation, i.e., to create a method for inducing a hibernation-like hypometabolic state QIH (OPN4-QIH) by light stimulation, and we achieved this. Specifically, we modified the photoreceptor opsin OPN4 (opsin 4, melanopsin) to create a modified opsin OPN4dC that can withstand long-term stimulation and optimized it for 24-hour QIH induction. In addition, to understand the similarities between natural hibernation and QIH, we analyzed the multiple dynamics of blood pressure, heart rate, and body temperature in this OPN4-QIH and clarified the cardiovascular regulatory function of Q neurons.

研究分野：神経行動生理学

キーワード：メラノプシン OPN4 QIH 冬眠様状態 Qニューロン 光遺伝学 オプトジェネティクス 体温 血圧 心拍数 心血管系調節

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

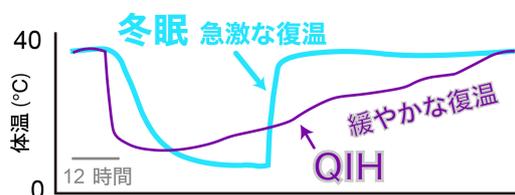
1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは近年、マウスを冬眠様状態 (QIH) に誘導する新規神経細胞群 (Q ニューロン) を同定した¹。冬眠様状態 QIH は冬眠と似た生理的特徴を多く有する¹。QIH マウスが示す冬眠に似た主な特徴として、数日に及ぶ低体温、設定温度の低下、低体温中でも機能する体温恒常性、自発的な回復、などが挙げられる¹。一方、類似性が弱い点もあり、その最たる現象としては、回復期での体温・代謝の緩慢な挙動がある(背景図)。これまでは、QIH 誘導には主に薬理遺伝学的手法 DREADD を用いてきた¹。しかし、QIH が様々な生理機能 (e.g.脳活動、睡眠覚醒) に与える影響を解析する際などは、より速やかに回復する実験系が好ましい。何よりも、自然の冬眠²では一まるでスイッチの ON-OFF のように一より速いタイムコースで回復する例が一般的であるが(背景図)、この点において、冬眠と QIH には決定的な差異があるといえる。より真の冬眠に近い状態の実現という意味でも、人為的操作によって速やかに回復できる実験系の確立は有意義だと考えられてきた。

しかし、この長期的な行動を誘発するに適した光操作技術は存在しない。神経細胞の興奮を長時間 (e.g. 24 時間) 持続させ、かつ ON-OFF の時間分解能高い方法は確立されていなかった。

そこで本研究では、微弱な青色光に対し安定した応答能を持つオプシンとして知られていた

OPN4 (オプシン 4、メラノプシン)^{3,4}に着目し、これを改変・応用することにした。



背景図. 冬眠と QIH での復温速度の差異

2. 研究の目的

長期間刺激と時間分解能の両立の観点から、より自在に操作・制御可能な QIH を実現するために、光高感受性オプシンを用いた新規の光遺伝学ツール開発すなわち『長期間刺激が可能な微弱光による QIH 誘導法』の開発を本研究の第一目標とした。加えて、QIH と冬眠の類似性をさらに明確に示すため、哺乳類冬眠における特徴の 1 つである「体温変化とは独立した心臓血管系の制御」に着目し、光操作型 QIH における心拍数・体温を同時計測の実現を目指した。新規光操作ツールの創出、および心臓血管系制御に着目した冬眠との類似性評価を行い、より自然の冬眠に近い低代謝誘導法を確立させる。

3. 研究の方法

本研究では Q ニューロンへの選択的アプローチのために、Qrfp-iCre マウス系統¹ (ヘテロ接合体) および目的に応じた Cre 酵素依存性アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用した。

・光刺激 Qrfp-iCre マウスの視床下部視策前野の最前方の前腹側脳室周囲核(AVPe)と呼ばれる脳部位に、Cre 依存性 AAV を投与し、Q ニューロン特異的に OPN4 を発現させ、同領域に光ファイバーを留置し、 μW スケール強度の青色レーザー (473nm) 光刺激を行った。

・腹腔温、心電図、血圧計測 腹腔内深部体温 (body temperature, TB) および心拍数 (heart rate, HR) の計測には DSI 社製のテレメトリー(遠隔測定)システムを用いた⁵。マウス腹腔内にプローブ送信器(ETA-F10)本体を留置し、胸郭にワイヤーを留置した。自由行動下におけるマウスの TB および HR を採取した。表部温度および褐色脂肪細胞温度 (temperature around brown adipose tissue [TBAT]) の計測には赤外線サーモカメラを用いた⁵。

4. 研究成果

① 改変型 OPN4 は時間分解能高い冬眠様状態を誘発する

より高い時間分解能で Q ニューロンを操作するために、マウスで長期 QIH を誘発する改変型ヒト OPN4 を用いたオプトジェネティクスの確立を目指した。OPN4 は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役受容体 (GPCR) である³。哺乳類 OPN4 の C 末端領域には、アレチン結合に必要なリン酸化部位のクラスターが含まれており、OPN4 の不活性化につながる^{6,7}。したがって、この領域の切断または OPN4 の C 末端尾部のリン酸化部位での変異の導入は、シグナル伝達を強化する可能性があった。野生型 OPN4、C 末端切断型 OPN4dC、9 つのリン酸化部位で変異を持つ型を用いて、QIH 誘導について検証した(図 1A)。473 nm 青色レーザーを連続照射 (光ファイバー先端で $3 \mu\text{W}$ の出力、 $100 \mu\text{W mm}^{-2}$ の放射照度、6 時間刺激) した。結果、C 末端が欠失した形態の OPN4dC (リン酸化部位がすべて欠失) が最も効果的であった。以降の実験では OPN4dC を使用し、OPN4dC を介した QIH を $\text{QIH}^{\text{OPN4dC}}$ と以降記載する。注目すべきことに、従来の光操作に通常使用される出力 (3~30mW) よりもはるかに低い出力である、わずか $3 \mu\text{W}$ ($100 \mu\text{W mm}^{-2}$) の強さの光照射で、効率的かつ継続的に QIH を誘導できた。 $\text{QIH}^{\text{OPN4dC}}$ では、光照射開始から 2 分後に不動、体温の急速な低下、および尾の血管拡張を示した(図 1D)。これは QIH^{M3Dq} での特徴に似ている。しかし、従来の QIH^{M3Dq} で観察された緩やかな回復とは対照的に、 $\text{QIH}^{\text{OPN4dC}}$ では TBAT と TB は光照射終了直後に急速に増加し、わずか約 30 分で正常レベルに回復した(図 1C, D)。

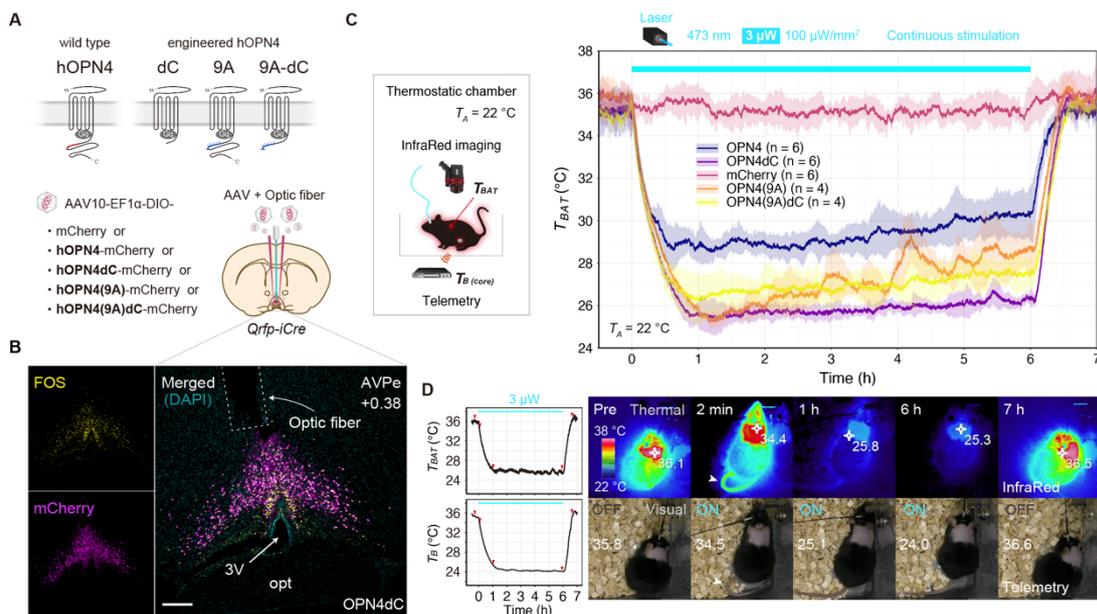


図 1. OPN4 を用いた光遺伝学は時間分解能高い冬眠様状態誘導を可能にする

② 24 時間光刺激の実現

次に、24 時間持続する QIH を誘発しようと試みた。まず、一般的に使用されているオプシン ChR2 と SSFO を使用した。ChR2 の使用については、さまざまな刺激周波数をテストし、QIH 誘発には 2 Hz が最も効果的であった(図 2A)。ChR2 では約 10 時間、SSFO では約 3 時間持続する深い低体温表現型を誘発した。ただし、これらのオプシンを使用して長期(例えば 24 時間の)QIH を維持することには失敗した(図 2A)。対照的に、OPN4dC は弱い光(ファイバー先端で $3 \mu\text{W}$ 、24 時間、図 2B)で 24 時間持続する QIH を誘発できた。刺激中、マウスは低体温状態を維持したが、暗期において運動活動 (Act) がわずかに増加し、これは体温 TB と関連し

ていることが観察された (図 2B)。この増加は、同じ時間経過で別のマウス個体での各試行で再現された。長時間の強力な低体温中であっても概日リズムの影響が残っており、マウスが暗期に活動的になった可能性があることを示唆している。QIH^{OPN4dC} 中の TB 変化は、特に誘導期には QIH^{M3Dq} の変化と類似していた (図 2B)。一方、QIH^{OPN4dC} は光照射終了後に低体温から急速に回復し、徐々に自然に回復をみせる QIH^{M3Dq} とは対照的であった。次に、24 時間 QIH^{OPN4dC} の再現性を調べるために、2 日間隔で 24 時間の刺激を同一個体で 4 回繰り返した (3 μ W、刺激 1 回につき 24 時間持続、図 2C)。Q-OPN4dC マウス (オス n = 2、メス n = 2) は毎回安定した QIH を示し、個体間および試行間での差はわずかであった (図 2D, E)。すべての個体の体温は、レーザー刺激の終了から 30 分以内に正常に戻った (図 2F)。同一個体内での良好な再現性は、24 時間にわたる継続的なレーザー刺激が、重大な組織/細胞損傷や OPN4dC の退色を引き起こさないことを示唆する。実際、ここで用いた μ W スケールの光刺激は、組織の炎症および損傷マーカーの発現を誘導しなかった。これらの結果は、OPN4dC 光遺伝学が組織損傷を引き起こすことなく、極めて高い感度、持続性、および再現性で機能することを示している。

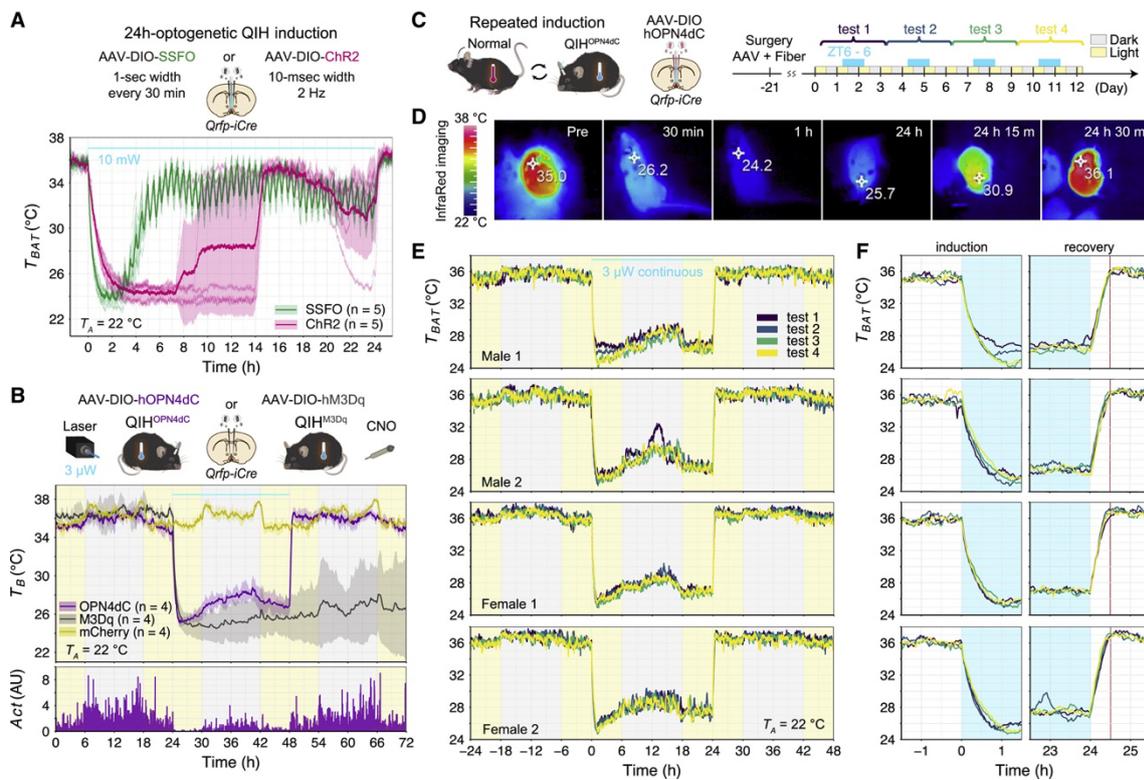


図 2. OPN4dC を用いた光刺激は 24 時間持続的な興奮操作を可能にする

③ QIH^{OPN4dC} における心臓血管系-体温の特徴的時系列変化

次に QIH^{OPN4dC} を使用して、TB、TBAT、心電図 (ECG)、心拍数 (HR) など各種バイタルサインの変化を高い時間分解能で調べた (図 3)。

QIH^{OPN4dC} マウスは、光照射開始直後に HR が急激に低下し、続いて TB と TBAT が減少した (図 3A, B)。回復期には、最初に HR が増加し、その後 TB と TBAT がゆっくりと基準レベルに戻った。比較のために、低体温の対照条件として全身麻酔 (イソフルラン吸入) を使用した。QIH^{OPN4dC} 中は、麻酔中よりも HR がより急速かつ深く低下した (図 3C)。2 つのグループで TB がほぼ同じ値であったとき (刺激開始後 2.5~3.5 時間) でも、QIH^{OPN4dC} の HR は麻酔時の HR よりも低かった (図 3D)。加えて、QIH^{OPN4dC} の TB が麻酔時の TB よりも高かったとき (刺激開始後 5~6 時間)、HR は両方の条件でほぼ同じだった (図 3D)。以上の結果は、QIH 群に

おける“体温低下とは独立した心拍数低下”の存在を示しており、心拍数が Q ニューロンによって直接制御されている可能性を支持している。次に、QIH^{OPN4dC}、QIH^{M3Dq}、イソフルラン誘発麻酔の TB と HR の動態を比較した(図 3F)。自然の冬眠では、冬眠に入ると、まず HR が先行して急速に減少し、その後 TB がより緩やかに遅れて減少し、続いて TB が急速に減少するにつれて HR がより緩やかに減少する⁸。ゆえにこれらパラメータの散布図は、通常、オープンループの形をとる⁸(図 3E)。麻酔をかけたマウスでは、HR-TB ループは平坦な形になり、麻酔での HR 変動は TB 変化に依存していることを示した(図 3F)。QIH^{OPN4dC} では、TB の減少に先立って HR が抑制され、オフセットのタイミングは完全に制御可能であった(図 3F)。さらに、QIH^{OPN4dC} での TB-HR の生理学的動態は、冬眠のそれと類似していた(図 3E, F)。

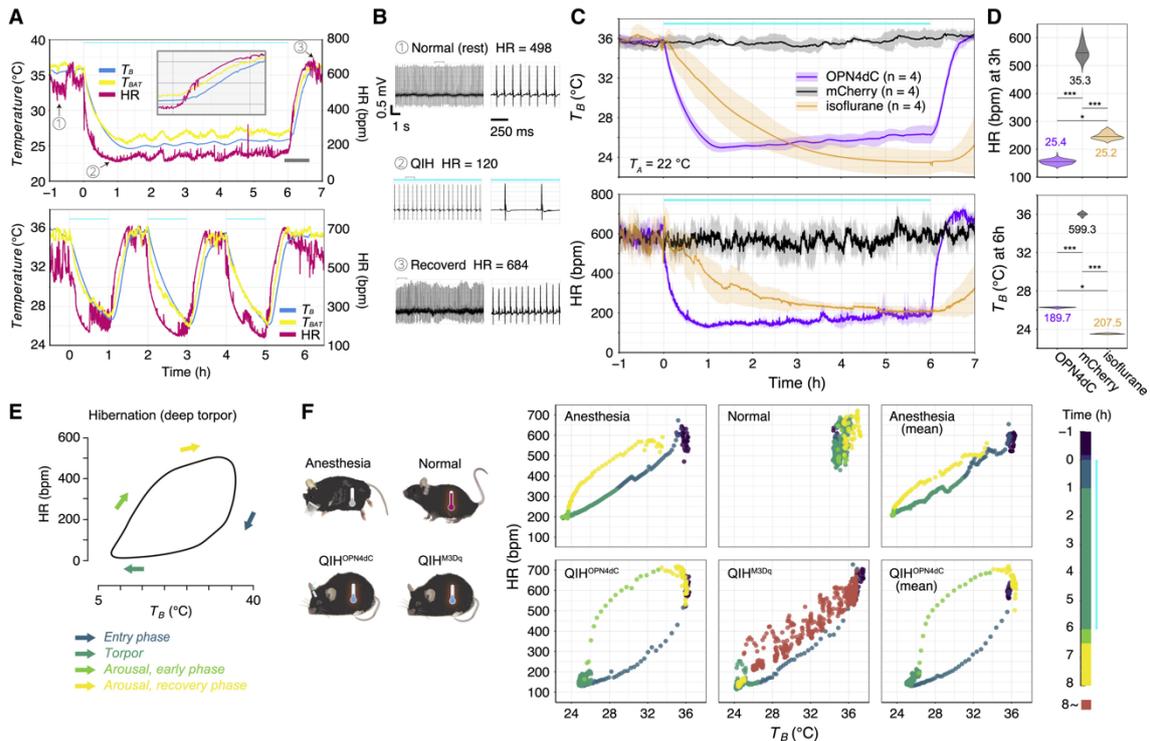


図 3. QIH^{OPN4dC} では自然の冬眠に似た生理学的変化が生じる

<総括>

本研究によって、光高感受性オプシン OPN4dC を用いた『長期間刺激が可能な微弱光による QIH 誘導法の開発』すなわち新規光操作ツールの創出が達成された。加えて、QIH と冬眠の類似性をさらに明確に解析するため、冬眠における特徴の 1 つである「体温変化とは独立した心臓血管系の制御」に着目し、光操作型 QIH における心拍数・体温を同時計測した結果、この観点において冬眠と QIH との類似性が実証された。より自然の冬眠に近い低代謝誘導法を確立させることができたといえる。以上の研究成果を主体とする原著論文⁹としてまとめ、報告した。

<引用文献>

1. Takahashi, T. M. *et al.* A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature* **583**, 109–114 (2020).
2. Jastroch, M. *et al.* Seasonal Control of Mammalian Energy Balance: Recent Advances in the Understanding of Daily Torpor and Hibernation. *J. Neuroendocrinol.* **28**, (2016).
3. Hatori, M. & Panda, S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends in Molecular Medicine* vol. 16 435–446 (2010).
4. Koyanagi, M. & Terakita, A. Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 710–716 (2014).
5. Takahashi, T. M., Sakurai, T. & Hirano, A. Measuring body temperature of freely moving mice under an optogenetics-induced long-term hypothermic state. *STAR Protoc.* **4**, 102321 (2023).
6. Mure, L. S. S. *et al.* Melanopsin-Encoded Response Properties of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. *Neuron* **90**, 1016–1027 (2016).
7. Mure, L. S. *et al.* Sustained Melanopsin Photoresponse Is Supported by Specific Roles of β -Arrestin 1 and 2 in Deactivation and Regeneration of Photopigment. *Cell Rep.* **25**, 2497–2509.e4 (2018).
8. Horwitz, B. A. *et al.* Temporal relationships of blood pressure, heart rate, baroreflex function, and body temperature change over a hibernation bout in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**, 759–768 (2013).
9. Takahashi, T. M. *et al.* Optogenetic induction of hibernation-like state with modified human Opsin4 in mice. *Cell Reports Methods* **2**, 100336 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Tohru M., Hirano Arisa, Kanda Takeshi, Saito Viviane M., Ashitomi Hiroto, Tanaka Kazumasa Z., Yokoshiki Yasufumi, Masuda Kosaku, Yanagisawa Masashi, Vogt Kaspar E., Tokuda Takashi, Sakurai Takeshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Optogenetic induction of hibernation-like state with modified human Opsin4 in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100336 ~ 100336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100336	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 Takahashi Tohru M., Sakurai Takeshi, Hirano Arisa	4. 巻 4
2. 論文標題 Measuring body temperature of freely moving mice under an optogenetics-induced long-term hypothermic state	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102321 ~ 102321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102321	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋徹
2. 発表標題 Optogenetic Induction of Hibernation-like state with modified OPN4
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tohru M. Takahashi
2. 発表標題 Induction of mouse hibernation-like state with newly developed, highly sensitive opsin
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋徹
2. 発表標題 改変型OPN4 による冬眠様状態の光遺伝学的誘導
3. 学会等名 第17回 GPCR研究会
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
---------	---------