

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390052

研究課題名(和文)概日ペースメーカー神経ネットワークの動作原理

研究課題名(英文)Neural mechanisms underlying the circadian pacemakers

研究代表者

三枝 理博(Mieda, Michihiro)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：20296552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：哺乳類の中枢概日ペースメーカー・視交叉上核(SCN)は多種・多数のニューロンから成る神経ネットワークである。しかし、SCNが強固で安定した概日振動を発振するために必要な神経ネットワークの動作原理は明らかでない。本研究では、ニューロンタイプ特異的遺伝子操作、概日行動リズム解析、SCNにおけるin vivo, ex vivoでの遺伝子発現解析などを行い、SCNのAVP産生ニューロンが安定した概日リズムの発振、周期の決定に極めて重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The suprachiasmatic nucleus (SCN), the primary circadian pacemaker in mammals, is a network structure composed of multiple types of neurons. However, the neural mechanisms underlying the generation of robust and stable circadian oscillation by the SCN network remains unknown. We generated mice with neuron type-specific genetic manipulations and performed analyses of their behavior, gene expression in vivo and ex vivo, and so on. We found that AVP producing neurons in the SCN play a critical role in the generation of stable circadian behavioral rhythms and the determination of the circadian period.

研究分野：神経科学

キーワード：概日リズム 視交叉上核 バソプレシン 遺伝子操作マウス 体内時計 神経ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の中核概日ペースメーカー・視交叉上核 (SCN) は多種・多数のニューロンから成る神経ネットワークである。しかし、SCN が強固で安定した概日振動を発振するために必要な神経ネットワークの動作原理は明らかでなかった。

(2) SCN の概日ペースメーカーが外界の光に同調するのに対し、食餌のタイミングに同調する SCN とは別の概日ペースメーカー(食餌同調性概日ペースメーカー) の存在が知られているが、その神経基盤は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) SCN の光同調性概日ペースメーカーについて、多種多様な時計ニューロンが集まって SCN 全体として強固で安定した概日リズムを発振するメカニズムを、ニューロンタイプ特異的な遺伝子操作を用いて明らかにする。

(2) 未だ神経基盤が明らかでない食餌同調性概日ペースメーカーについて、脳領域特異的な遺伝子操作を用いてその神経基盤の同定を目指すとともに、食餌同調性概日ペースメーカーが果たす生理機能も明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AVP 産生ニューロンは SCN の主要なニューロンタイプの1つである。我々が開発した、AVP ニューロン特異的 Cre ドライバーマウスを用い、AVP ニューロン特異的に時計遺伝子 *Bmal1* (細胞時計の破壊) や *Casein kinase 1 delta* (CK1d: 細胞時計の周期延長) を欠損したマウスを作製し、その概日行動リズム、SCN における *in vivo*, *ex vivo* での時計遺伝子発現リズムなどを解析した。

(2) 食餌同調性概日ペースメーカーについては、我々の先行研究に基づき、視床下部背内側核緻密部 (DMHc) がその神経基盤の有力な候補部位と考え、DMHc 特異的 Cre ドライバーマウスを用いて *Bmal1* や *CK1d* の特異的欠損マウスを作製、その食餌同調性概日リズムを解析した。また、神経特異的 *Bmal1* 欠損マウスでは食餌同調性概日行動リズムが消失するので、このモデルマウスにおける末梢臓器の食餌同調性を検討した。

4. 研究成果

(1) AVP ニューロン特異的 *Bmal1* 欠損マウス (AVP ニューロンで特異的に細胞時計を欠損したマウス) は、概日行動リズムの周期が約1時間、活動期が約5時間延長するとの予備的なデータが得られていた。本研究では行動リズム解析を進め、完了した (図1)。このフェノタイプは、組換え AAV ベクターを用いて、成体マウスの SCN・AVP ニューロンに *Bmal1* 発現をレスキューすることで消失したことから、神経ネットワーク形成の異常などにより2次的に生じたものではない。また、

in situ hybridization (ISH) 法による SCN での *in vivo* 遺伝子発現解析、*Per2::Luc* レポーターマウスを用いた、SCN スライスにおける時計遺伝子 *Per2* 発現リズムの解析なども行った。これらの解析から、AVP ニューロン特異的 *Bmal1* 欠損マウスでは SCN ニューロン間のカップリングが弱まり、SCN の概日時計機能が低下すると考えられた。この AVP ニューロンの機能を AVP のみが担うとは考えられず、共発現する他の神経伝達物質の関与が示唆された。概日リズム発振における AVP ニューロンの役割を示した、意義のある結果である。結果をまとめ、*Neuron* 誌に論文を発表した。

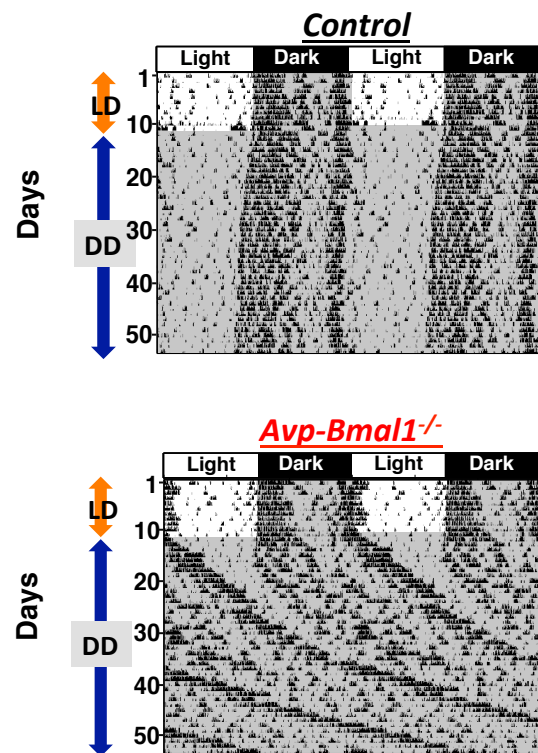


図1 AVP ニューロン特異的 *Bmal1* 欠損マウスの概日行動リズム

(2) AVP ニューロン特異的 *CK1d* 欠損マウス (AVP ニューロン特異的に細胞時計の周期を延長したマウス) は、概日行動リズムの周期が約1時間延長した。反対に、組換え AAV ベクターを用いて SCN・AVP ニューロンで *CK1d* を過剰発現したマウスでは概日周期が約30分短縮した (図2)。したがって、AVP ニューロンの細胞時計の周期に応じて概日行動リズムの周期も変化するので、AVP ニューロンが概日周期を決定するペースメーカー細胞 (の少なくとも一部) として機能することが示唆された。この結果は従来の見解を覆すものであり、重要である。結果をまとめ、現在論文を投稿中である。

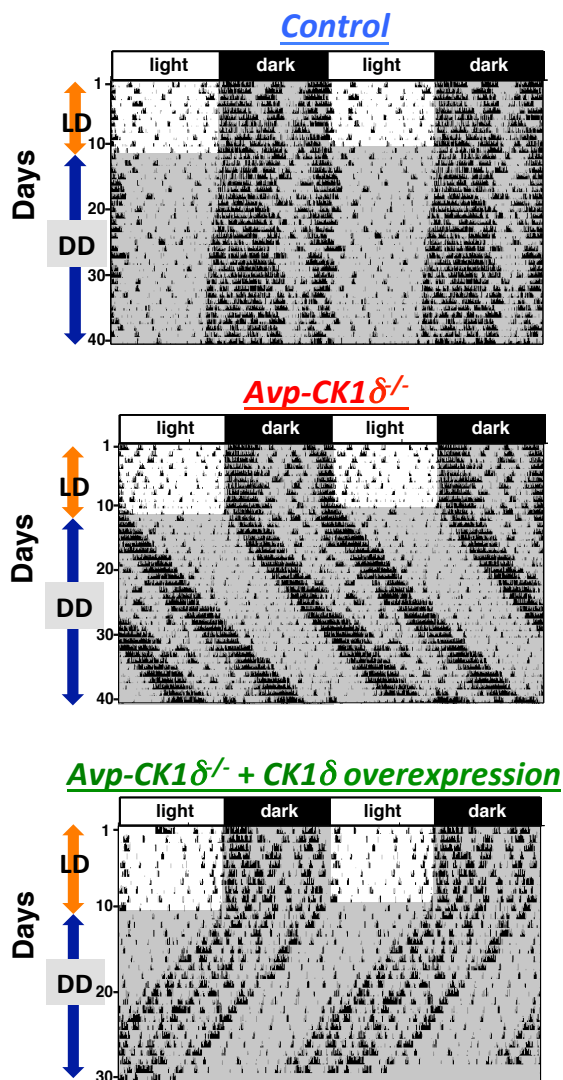


図2 AVPニューロン特異的CK1δ欠損マウス、CK1δ過剰発現マウスの概日行動リズム

(3) SCNの光同調性概日ペースメーカーについて、他にもAVPニューロン特異的Vgat欠損マウス(AVPニューロンからGABAが放出されない)の作成・解析も進めており、非常に興味深いフェノタイプを得られている。またSCNのもう一つの主要なニューロンタイプであるVIPニューロンについても、特異的Creドライバーマウスを作製し、AVPニューロンと同様の解析を進行中である。また両Creドライバーマウスを使って各ニューロンタイプを赤色蛍光タンパク質でラベルし、SCNスライスでのパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析も進めている。

(4) 食餌同調性概日ペースメーカーについては、DMHcに比較的特異的にCreを発現するマウス(Krox20-Cre)を用いてBmal1やCK1δをDMHc特異的に欠損したマウスを作製し、その食餌同調性概日行動リズムを調べたが、大きな異常は観察されなかった。遺伝子欠損の効率が十分で無い可能性があり、その結果

の解釈は難しい。

(5) DMHcに比較的特異的に発現する別のCreドライバーマウスを見出した(Grp-Cre)。同様にBmal1やCK1δを特異的に欠損させたマウスを作製してその食餌同調性概日行動リズムを検討したが、やはり大きな異常は観察されなかった。

(6) 神経特異的Bmal1欠損マウス(脳内食餌同調性概日ペースメーカーを欠損している)において、様々な臓器の末梢概日時計が食餌に同調する効率を、Per2::Lucレポーターマウスを用いて検討した。その結果、神経特異的Bmal1欠損マウスでは、胃内在性の末梢時計の食餌への同調が顕著に遅れることを見出した。したがって、脳内の食餌同調性概日ペースメーカーは、末梢臓器の食餌への同調も制御する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

- ① Mieda M*, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma K, Honma S, Sakurai T: Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. *Neuron* 85:1103-1116, 2015. 査読有
- ② 三枝理博: 概日時計による睡眠の調節. *実験医学* 33: 2071-2076, 2015. 査読無
- ③ Hasegawa E, Yanagisawa M, Sakurai T, Mieda M*: Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways. *J. Clin. Invest.* 124:604-616, 2014. 査読有
- ④ Furutani N, Hondo M, Kageyama H, Tsujino N, Mieda M, Yanagisawa M, Shioda S, and Sakurai T*: Neurotensin co-expressed in orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus plays an important role in regulation of sleep/wakefulness states. *PLoS One* 8:e62391, 2013. 査読有
- ⑤ Soya S, Shoji H, Hasegawa E, Hondo M, Miyakawa T, Yanagisawa M, Mieda M, and Sakurai T*: Orexin Receptor-1 in the Locus Coeruleus plays an important role in cue-dependent fear memory consolidation. *J. Neurosci.* 33:14549-14557, 2013. 査読有
- ⑥ Saito YC, Tsujino N, Hasegawa E, Akashi K, Abe M, Mieda M, Sakimura K, Sakurai T*: GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. *Front. Neural Circuits* 7:192, 2013. 査読有
- ⑦ Mieda M*, and Sakurai T: Orexin

(hypocretin) receptor agonists and antagonists for treatment of sleep disorders. Rationale for development and current status. *CNS Drugs* 27:83-90, 2013. 査読有

⑧ Takarada T, Kodama A, Hotta S, Mieda M, Shimba S, Hinoi E, and Yoneda Y: Clock genes influence gene expression in growth plate and endochondral ossification in mice. *J. Biol. Chem.* 287:36081-36095, 2012. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 三枝理博、ニューロンタイプ特異的遺伝子操作による中枢概日ペースメーカー神経機構の解析 第 9 3 回日本生理学会、2016 年 3 月 22 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ② 三枝理博、中枢概日ペースメーカーにおけるバソプレシン産生ニューロンの役割 第 121 回日本解剖学会、2016 年 3 月 28 日、ビッグパレットふくしま (福島県)
- ③ 三枝理博、中枢概日時計におけるバソプレシン産生ニューロンの役割、第 3 8 回日本分子生物学会年会・第 8 8 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 4 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)
- ④ Mieda M. Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. XIV European Biological Rhythms Society (EBRS), 2015 年 8 月 4 日, The University of Manchester, (Manchester, UK)
- ⑤ Mieda M. Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. Asian Forum on Chronobiology in 2015, 2015 年 9 月 8 日、北海道大学 (北海道)
- ⑥ Mieda M. Roles of AVP-producing neurons in the central circadian pacemaker of the suprachiasmatic nucleus. 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑦ Mieda M, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma S, Sakurai T. Roles of AVP-producing neurons in the central circadian pacemaker of the suprachiasmatic nucleus. Society for Research on Biological Rhythms 2014 Meeting, 2014 年 6 月 16 日, the Yellowstone Conference Center at Big Sky Resort, (MT, USA)
- ⑧ 三枝理博、Cellular Circadian Oscillators in Vasopressin Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus Play a Critical Role in Coupling between

Morning and Evening Behavioral Rhythms in Mice. 第 92 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 22 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)

[図書] (計 3 件)

- ① Mieda M*, and Sakurai T: Pharmacogenetic dissection of neural mechanisms underlying the regulation of sleep/wakefulness using DREADDs. In *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*, G. Thiel, eds. (Totowa, New Jersey: Humana Press), 109-127, 2015. 査読有
- ② Mieda M*, and Sakurai T: Physiological roles of orexin receptors on sleep/wakefulness regulation. In *Orexin and Sleep - Molecular, Functional and Clinical Aspects*, T. Sakurai, J. M. Monti, S. R. Pandi-Perumal, eds. (Heidelberg, Germany: Springer), 53-65, 2015. 査読有
- ③ Mieda M*, and Sakurai T: Orexin (Hypocretin) and Narcolepsy. In *Narcolepsy, 2nd Edition: A Clinical Guide*, M. Goswami, M. J. Thorpy, Pandi-Perumal, eds. (Heidelberg, Germany: Springer), 11-23, 2016. 査読有

[その他]

ホームページ等
北國新聞 (朝刊) 2015 年 3 月 5 日掲載

ライフサイエンス新着レビュー
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9925>

サイエンスポータル 2015 年 3 月 9 日ニュース
http://scienceportal.jst.go.jp/news/new_sflash_review/newsflash/2015/03/20150309_01.html

<http://news.mynavi.jp/news/2015/03/09/086/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 理博 (MIEDA MICHIIRO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 20296552

(3) 連携研究者

桜井 武 (SAKURAI TAKESHI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 60251055