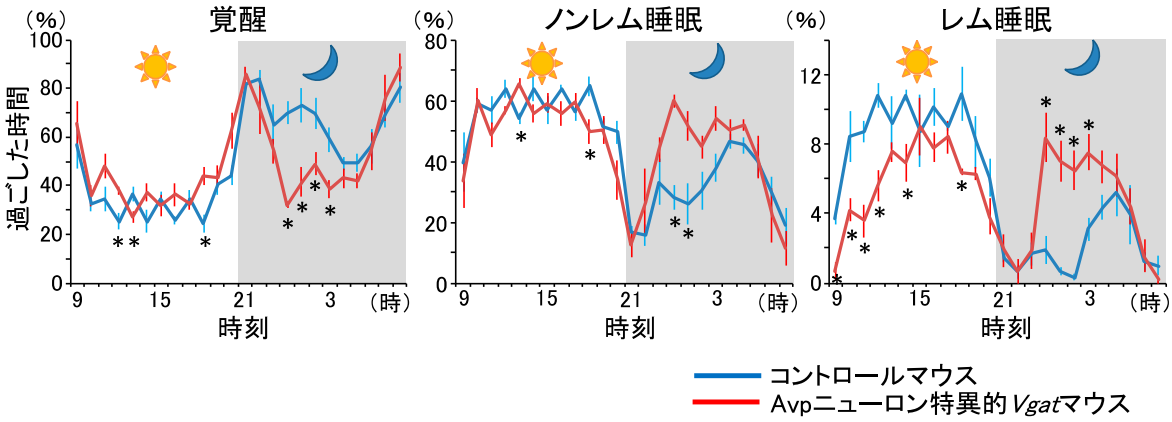
66　中枢概日時計と睡眠覚醒中枢の相互制御メカニズム	三枝　理博

【目的】睡眠を調節する主要な要素として、恒常性（長く起きた後には長く眠る）に加えて、概日リズム（サーカディアンリズム）が挙げられる。哺乳類においては、視床下部の視交叉上核が体内時計（中枢概日時計）として機能し、全身に時刻の情報を送る。しかしながら、中枢概日時計からどのような神経メカニズムで睡眠が調節されるのか、その具体的な神経経路は明らかになっていない。本研究では、中枢概日時計による睡眠覚醒制御の神経メカニズムを理解することを目的とした。

【方法】視交叉上核の中枢概日時計神経ネットワーク機能に異常が生じるバソプレシン（AVP）産生ニューロン特異的小胞 GABA トランスポーター（*VGAT*）欠損マウスの睡眠覚醒を測定した。また、光遺伝学・化学遺伝学的手法を用いて視交叉上核ニューロンをニューロンタイプ特異的に刺激し、睡眠覚醒への効果を検討した。

【結果】AVP ニューロン特異的 *Vgat* 欠損マウスでは、夜間の覚醒量が減少し、ノンレム睡眠、レム睡眠量が増加した（下図）。また視交叉上核の AVP ニューロンを光遺伝学により特定の条件で刺激すると、睡眠中のマウスが速やかに覚醒し、しばらくの間覚醒が維持された。現在詳細なメカニズムを解析中である。これらの知見は、中枢概日時計と睡眠覚醒制御中枢を結ぶミッシングリンクを解明する大きな手がかりになると考えている。

AVP ニューロン特異的 *Vgat* 欠損マウスの睡眠覚醒リズム



66. 中枢概日時計と睡眠覚醒中枢の相互制御メカニズム

三枝　理博

金沢大学 医薬保健研究域 医学系 統合神経生理学

Key words：概日リズム，視交叉上核，睡眠，光遺伝学，神経ネットワーク

緒　言

睡眠を調節する主要な要素として、恒常性（長く起きた後には長く眠る）に加えて、概日リズム（サーカディアンリズム）が挙げられる［1］。哺乳類においては、視床下部の視交叉上核が体内時計（中枢概日時計）として機能し、全身に時刻の情報を送る。逆に、睡眠・覚醒のステージにより視交叉上核ニューロンの活動が調節されていることも報告されている。しかしながら、中枢概日時計からどのような神経メカニズムで睡眠が調節されるのか、また睡眠・覚醒が中枢概日時計をどのように制御するのか、その具体的な神経経路は明らかになっていない。その一因として、両者間に直接の神経連絡が少ないので、神経解剖学的に神経投射を追跡しても両者を結びつける神経経路を同定できないことが挙げられる。

我々はこれまでに、中枢概日時計・視交叉上核の神経ネットワークメカニズムを明らかにするために、視交叉上核の主要なニューロンの二つ、バソプレシン（AVP）産生ニューロンと血管作動性腸管ペプチド（VIP）産生ニューロンについて、ニューロンタイプ特異的に遺伝子操作・神経活動操作するための Cre ドライバーマウスを作成して用いてきた（図 1）。その結果、従来中枢概日時計からの出力を担うと考えられていた AVP ニューロンが、概日リズムの発振や周期決定に重要な役割を持つこと［2，3］、AVP ニューロンによる GABA 性神経伝達（視交叉上核では AVP ニューロンも含め、ほぼ全てのニューロンが GABA を含有する）が、中枢時計から行動への出力のタイミングを制御すること等を明らかにした。

本研究では、これまでに我々が作成した視交叉上核に異常を持つ遺伝子操作マウスで睡眠覚醒を測定すること、また光遺伝学や化学遺伝学の手法を用いて視交叉上核ニューロンをニューロンタイプ特異的に刺激した時の睡眠覚醒への影響を検討することで、中枢概日時計による睡眠覚醒制御の神経メカニズムを理解することを目的とし、研究を行った。

方　法

1.　動物実験

マウスを用いた動物実験は、金沢大学動物実験規定に従い実施した。10 週齢以上の雄マウス（遺伝的背景は C57BL/6J）を実験に使用した。用いた遺伝子改変マウスは、Vgat flox（Jackson Laboratory＃012897）［4］、Avp-Cre［2］、Vip-IRES-Cre（Jackson Laboratory #010908）［5］である。

2.　睡眠解析

麻酔下でマウス頭蓋に 4 箇所穴を空け（直径約 2mm）、脳波筋電図測定用の微小電極を頭蓋内及び頚筋に埋め込んだ。充分回復した後、埋め込んだ電極部分を導線につなげ、シーベルを用いて自由に行動が出来る状態で測定を行った。電極から得られる脳波・筋電図を測定することにより睡眠覚醒状態を連続記録した。脳波・筋電図の記録・解析は SleepSign（キッセイコムテック）を用いた。

3.　光遺伝学・化学遺伝学

Chennelrhodopsin 2 や hM3Dq、hM4Di を、FLEX/DIO により Cre recombinase 依存的に発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを、脳定位固定装置とハミルトンシリンジを用いて、Avp-Cre マウスや Vip-IRES-Cre マウスの視交叉上核に微量注入した。手術後 2 週間以上おいて、実験に用いた。睡眠解析には微小電極を、光遺伝学的解析に

は光ファイバーを AAV 注入と同時に埋め込んだ。化学遺伝学的解析では腹腔内に clozapine-N-Oxide を投与した。

4. 統計解析

データは、平均±標準誤差で示した。統計解析は、Student's t test を用いて行った。P 値が 0.05 未満で統計的有意と判断した。

結果および考察

1. AVP ニューロン特異的小胞 GABA トランスポーター欠損マウスの睡眠覚醒

視交叉上核のニューロンは、AVP ニューロンを含め全てが GABA を含有するが、中枢概日時計神経ネットワークにおける GABA の明らかでない。小胞 GABA トランスポーター（VGAT）はシナプス小胞への GABA の取り込みに必要なタンパク質である。AVP ニューロン特異的 Cre 発現マウスと Vgat flox マウスを交配することで AVP ニューロン特異的に *Vgat* 遺伝子をノックアウトし、AVP ニューロンからの GABA シナプス放出が起こらないマウスを作成したところ、恒暗条件下での概日行動リズムには大きな異常が見られ、視交叉上核の概日リズム発振機能の異常が示唆された［未発表］。一方で明期 12 時間：暗期 12 時間の明暗条件下では行動リズム・自発活動量に大きな異常は見られない。そこで本研究では、当該マウスの明暗条件下での睡眠覚醒を測定したところ、コントロールマウスと比較し、暗期における覚醒量が約 16%減少し、ノンレム睡眠量は約 28%、レム睡眠量は約 107%増加した（図 2）。従って、視交叉上核 AVP ニューロンは、中枢概日時計自体のみでなく、GABA 作動性神経伝達を介して睡眠覚醒の調節にも関与している可能性が示唆された。現在さらに詳細な解析を進めている。

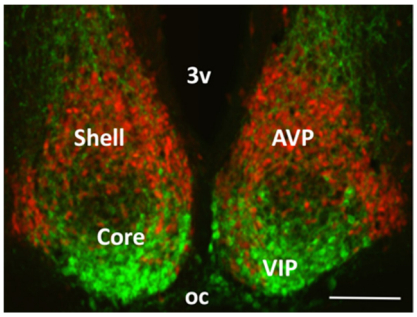


図 1. AVP ニューロン特異的遺伝子操作

マウス SCN の前頭断切片。赤色蛍光タンパク質 tdTomato のレポーターマウスと Avp-Cre マウスを交配し、AVP ニューロンが赤くラベルされている。VIP を抗体染色により緑にラベルした。スケールバー 100 μm、core：SCN 中核、shell：SCN 外殻、3v：第三脳室、oc：視交叉。

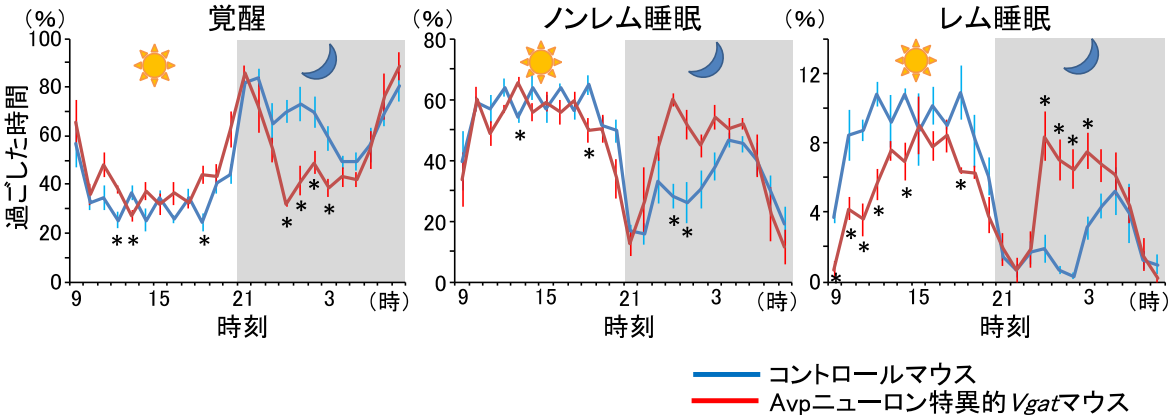


図 2. AVP ニューロン特異的 *Vgat* 欠損マウスの睡眠覚醒リズム

コントロールおよび AVP ニューロン特異的 *Vgat* 欠損マウスの 1 時間毎の覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠量を示した。n = 4、*P < 0.05。

2. 光遺伝学・化学遺伝学による視交叉上核ニューロンのニューロンタイプ特異的な神経活動操作

視交叉上核ニューロンの神経活動を *in vivo* で人為的に操作し、その睡眠覚醒への効果を直接測定した。睡眠覚醒に対して直接的な効果が観察されれば、中枢概日時計による睡眠覚醒の制御を直接示した最初の例であり、両者を結ぶミッシングリンクを解明する大きな手がかりにもなる。

Cre 依存的 AAV 発現ベクターとニューロンタイプ特異的 Cre 発現マウスを用いて、Channelrhodopsin 2［6］を視交叉上核の AVP ニューロンや VIP ニューロンに特異的に発現し、光遺伝学的に刺激した。さまざまな刺激条件を検討したところ、特定の条件で睡眠中のマウスの AVP ニューロンを刺激すると、10 秒以内に覚醒することを見いだした［未発表］。VIP ニューロンの刺激ではこのような覚醒効果は観察されていない。したがって、視交叉上核の AVP ニューロンから覚醒制御領域への機能的な出力が存在すると考えられ、現在詳細な解析を行っている。

GPCR を元にした DREADD（Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs）［7］を用いた化学遺伝学的な神経活動操作では、主に光応答性のイオンチャネルやトランスポーターを利用する光遺伝学とは異なる様式で神経活動を人為的に操作できる。本研究では、人工化合物 CNO（Clozapine-N-Oxide）の腹腔内投与によりニューロンを興奮させる hM3Dq、及び抑制する hM4Di を、AAV ベクターと Cre 発現マウスを用いて、視交叉上核の AVP ニューロンや VIP ニューロンに特異的に発現させた。睡眠覚醒への効果を検討する前に、まず概日行動リズムへの効果を検討したところ、VIP ニューロンを CNO 投与により興奮させた場合に、恒暗条件下で時刻依存的な概日行動リズムの位相シフトが観察された［未発表］。同様の条件による AVP ニューロンの刺激では、位相シフトは確認されていない。したがって、視交叉上核の VIP ニューロンは概日リズムの位相制御に重要であることが示唆された。現在、明暗条件下で概日リズムを明暗サイクルに同調させた条件で、DREADD により AVP ニューロンや VIP ニューロンの神経活動を人為的に操作した時に、直後に睡眠覚醒にどのような効果が現れるか検討している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学医薬保健研究域医学系統合神経生理学の前島隆司准教授、津野祐輔助教、長谷川恵美元助教、Md Tarikul Islam 大学院生である。

文　献

1） Fuller PM, Gooley JJ, Saper CB. Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. J Biol Rhythms. 2006 Dec;21(6):482-93. Review. PMID: 17107938

2） 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. 2015 Mar 4;85(5):1103-16. PMID: 25741730 DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.005

3） Mieda M, Okamoto H, Sakurai T. Manipulating the Cellular Circadian Period of Arginine Vasopressin Neurons Alters the Behavioral Circadian Period. Curr Biol. 2016 Sep 26;26(18):2535-2542. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27568590 DOI: 10.1016/j.cub.2016.07.022

4） Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. Nat Neurosci. 2008 Sep;11(9):998-1000. PMID: 19160495 DOI: 10.1038/nn.2167

5） Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. Neuron. 2011 Sep 22;71(6):995-1013. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21943598 DOI:10.1016/j.neuron.2011.07.026

6） Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci. 2005 Sep;8(9):1263-8. Epub 2005 Aug 14. PMID: 16116447

7) Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand.Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 20;104(12):5163-8. Epub 2007 Mar 2. PMID: 17360345