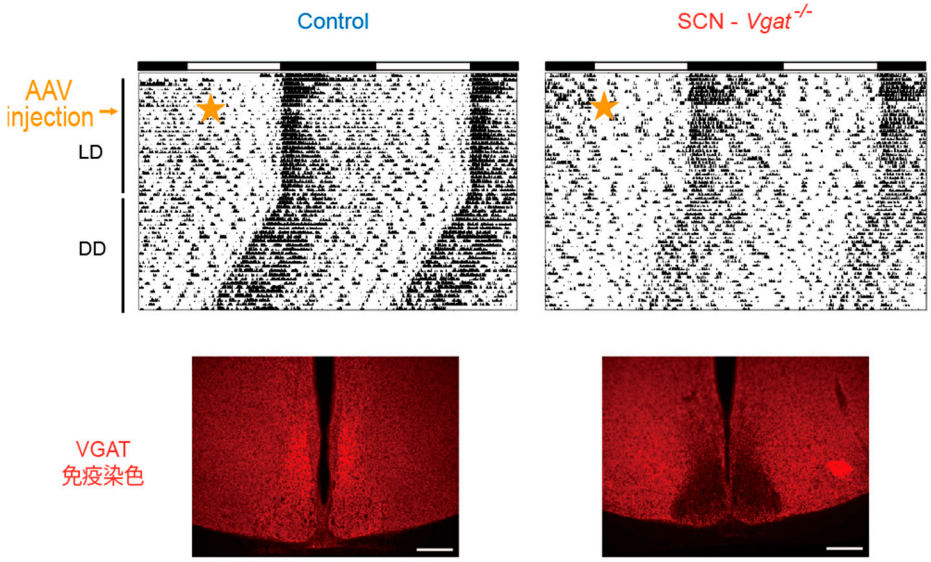
140　脳深部光計測を用いた睡眠覚醒メカニズム解明	小野　大輔

【目的】睡眠・覚醒は約 24 時間ごとに繰り返される。この 24 時間周期のリズムを「概日リズム」と呼び、脳内視床下部の「視交叉上核」が概日時計の中枢として生体機能の時間的統合を行う。また、概日リズムは“時計遺伝子”の発見を皮切りにその調節機構が明らかにされてきている一方で、神経回路レベルの調節機構の解明はほとんど進展がなく未だ仮説の域を出ない。本研究では、光操作と併用可能な発光イメージング技術を導入し、哺乳類の概日時計による睡眠覚醒調節メカニズムを神経回路レベルで明らかにする事を目的とする。

【方法、結果】視交叉上核はほぼすべて抑制性神経である事から、視交叉上核特異的な *Vgat* 欠損を試みた。$Vgat^{flox/flox}$ マウスに AAV を用いて、視交叉上核特異的に Cre を発現させた。動物の自発行動を計測する為に、赤外線センサーを飼育ボックスの上部に設置し、1 分ごとの自発行動量を連続的に計測した。視交叉上核特異的 *Vgat* 欠損マウスは、暗期における行動量の低下、および活動開始時間のばらつきの増加がみられたが、フリーラン周期そのものには影響を与えなかった。これらの結果は、視交叉上核における GABA は概日時計の周期には影響を及ぼさないが、出力経路に影響を及ぼすことを示唆する。

次に視交叉上核からの出力領域を同定するため、Gad67-Cre マウスを用い視交叉上核特異的に GFP を発現させ、軸索終末を確認した。その結果複数の脳領域に視交叉上核の軸索が確認された。その中で最も密に軸索が確認された室傍核に着目した。視床下部室傍核神経は様々な神経ペプチドを発現する神経細胞である事が知られている。その中でコルチコトロピン放出因子（CRF）神経はストレス応答に関わる事から、睡眠覚醒の調節に関わるのではないかと考えた。そこで、CRF-Cre マウスを導入し、Cre 依存的に ChR2 を発現させる事が可能な AAV（AAV-CMV-flex-ChR2-EYFP）を室傍核 CRF 神経に発現させた。その後、光ファイバーを室傍核直上に挿入し、さらに脳波・筋電図を計測するための電極およびワイヤーを装着した。その結果、室傍核 CRF 神経の光操作により覚醒が誘導された。今後は視交叉上核から睡眠覚醒を調節する神経回路の全貌を明らかにする。

視交叉上核における GABA は概日リズムの出力に関与する



140. 脳深部光計測を用いた睡眠覚醒メカニズム解明

小野　大輔

名古屋大学 環境医学研究所 神経系分野Ⅱ

Key words：睡眠・覚醒，概日リズム，神経回路，発光イメージング

緒　言

動物にとって睡眠は必須な生理現象であり、一日のうち“いつ眠りいつ起きるか”の決定は、地球上で生きる為の重要な生存戦略である。つまり、生命は 24 時間の明暗サイクルの中で、時間的にすみ分け、その個体の生存に有利な時間帯に必要な活動を行う。哺乳類では、睡眠・覚醒は約 24 時間ごとに繰り返される。この 24 時間周期のリズムを「概日リズム」と呼び、脳内視床下部の「視交叉上核」が概日時計の中枢として生体機能の時間的統合を行う［1，2］。また、概日リズムは“時計遺伝子”の発見を皮切りにその調節機構が明らかにされてきている一方で、神経回路レベルの調節機構の解明はほとんど進展がなく未だ仮説の域を出ない。

概日時計の中枢である視交叉上核から睡眠・覚醒の行動への出力を考えた際、昼行性・夜行性動物では行動の時間帯が昼夜逆転しているにも関わらず、視交叉上核の神経活動は、同じように昼間に高まる事が知られている［3，4］。つまり視交叉上核は 24 時間のリズムを刻むペースメーカーとして機能し、脳内の神経経路を介して、視交叉上核からの時刻情報が昼夜反転され、睡眠・覚醒の時間的タイミングが調節されている事が示唆されている。しかし、どの神経経路が時刻情報を変換しているのか、またその情報変換メカニズムについては不明である。

睡眠覚醒調節メカニズムを神経回路レベルで明らかにするためには、1. 神経細胞の入出力の同定。2. 特定細胞の活動操作と、行動の因果関係の検証。3. 特定細胞の活動計測と行動の因果関係の検証。が重要である。これらの点において、光遺伝学と光イメージングは有効なツールになると考える。なぜなら、光遺伝学では光で特定細胞の活動を操作可能であり、光イメージングでは特定細胞の神経活動を光で計測可能であるからである。しかし、現在多く用いられている蛍光イメージングは計測の為に励起光を必要とする。したがって、蛍光タンパク質を用いた光計測と、光操作を同時に行う事はできない。そこで、本研究では光遺伝学ツールと併用可能な新規発光タンパク質を用いた神経活動イメージング法を導入する。このタンパク質は、酵素・基質の反応で光を放ち、計測に励起光を必要としない為、光遺伝学ツールとの併用が可能である。本研究提案では、室傍核の入出力に関わる細胞を同定し、その細胞の活動操作と計測を同時に行い、睡眠覚醒の時刻調節メカニズムに迫る。

方法および結果

1.　視交叉上核特異的 *Vgat* 欠損マウスの作製

哺乳類における概日時計の中枢は視床下部に位置する視交叉上核に位置する。また、視交叉上核は様々な神経伝達物質を発現するヘテロな細胞集団が存在する神経核である。特に視交叉上核のほぼすべての神経細胞は抑制性神経である事が知られている［5］。しかしながらその機能的意義は未だ議論されている。この事は、これまで薬剤を用いた実験で結論を付けてきたという背景がある。そこで、本研究では視交叉上核特異的に Vesicular GABA transporter（*Vgat*）を欠損させ、概日リズムへの影響を検討した。

視交叉上核特異的に *Vgat* の欠損を行う為、Vgat-flox マウスを導入した。Vgat-flox マウスは個別に飼育ケージに移し、明暗 12：12 時間の環境の下飼育した。動物の自発行動を計測する為に、赤外線センサーを飼育ボックスの上部に設置し、1 分ごとの自発行動量を連続的に計測した。明暗 12：12 時間を 1 週間以上経過した後、視交叉上核特異的な *Vgat* 欠損を試みた。$Vgat^{flox/flox}$ マウスを、イソフルランを用いて麻酔をかけ定位脳固定装置を用い頭部を固定した。その後、両側の視交叉上核に Cre-GFP または GFP を発現する事が可能なアデノ随伴ウイルス（AAV）（AAV-hSyn-GFP-

Cre or AAV-hSyn-hrGFP）をインジェクションした。AAV インジェクション 3 週間後にマウスは恒常暗環境に移した。実験終了後、還流固定を行いマウスの脳を取り出し、クライオスタットを用い 40 μm の脳切片を作製後、視交叉上核の Vgat 発現量を定量した。

視交叉上核特異的 *Vgat* 欠損（SCN-Vgat$^{-/-}$）マウスは、明暗環境下において暗期における自発活動量の低下が認められた（図 1）。また恒常暗環境下においても主観的夜の自発行動量の低下が認められた。さらに、SCN-Vgat$^{-/-}$マウスの恒常暗環境下における自発行動の開始時間は、対照群と比較し有意にばらついていた。カイ二乗ペリオドグラム解析における Qp 値も SCN-Vgat$^{-/-}$マウスでは、対照群と比較し低い値を示した。しかしながら、自発行動のフリーラン周期を計算すると、両群では有意な差は認められなかった。これらの結果は、視交叉上核における GABA は概日時計の周期には影響を及ぼさないが、出力経路に影響を及ぼすことを示唆する。

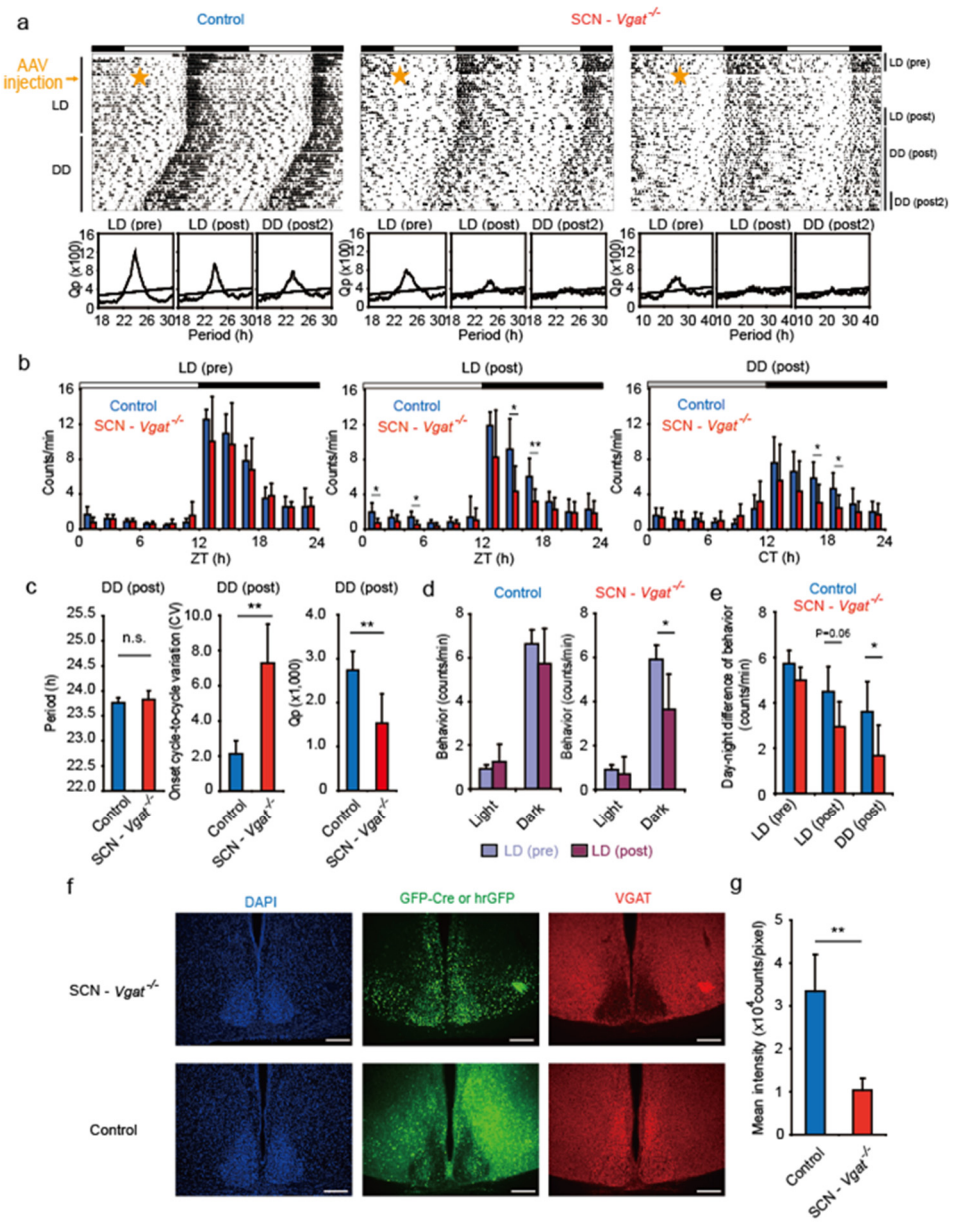


図 1. 視交叉上核特異的 *Vgat* 欠損は行動リズムを減弱させる。

(a) 視交叉上核特異的 *Vgat* 欠損マウスの自発行動リズム。星印の時点で AAV のインジェクションを行った。(b) LD および DD の際の活動量。(c) DD の際のフリーラン周期、活動開始時間のばらつき、ペリオドグラムで算出された Qp 値。(d、e) D 条件における明暗での活動量の差。(f) 視交叉上核の Vgat 免疫染色と AAV インジェクションの蛍光画像。(g) Vgat 発現量の定量値。(**P < 0.01、student's t-test) スケールバーは 200 μm。

2. 視交叉上核からの出力経路の同定

視交叉上核における GABA が概日リズムの出力に関わる事から、視交叉上核の神経細胞がどの脳領域に軸索を伸ばしているかを検証し、出力経路の同定を試みた。GABA の合成酵素の一つである Gad67 の Cre マウス（Gad67-Cre マウス）を導入し、Cre 依存的に蛍光タンパク質を発現させることが可能な AAV（AAV-CMV-flex-hrGFP）を視交叉上核特異的に発現させた。その後還流固定により脳を取り出し、クライオスタットを用いて 40 μm の脳切片を作製後、蛍光顕微鏡を用い軸索終末の存在する領域を確認した。

視交叉上核からの軸索終末は、主に視床下部室傍核、終板脈管器官、背内側視床下部、腹内側視床下部、結節乳頭体核、視床室傍核に見られた（図 2）。その中でも、視床下部室傍核には最も密な軸索終末が観察された。これらの結果から、視交叉上核から室傍核を介し、睡眠覚醒調節がなされているのではないかと言う仮説を立てた。

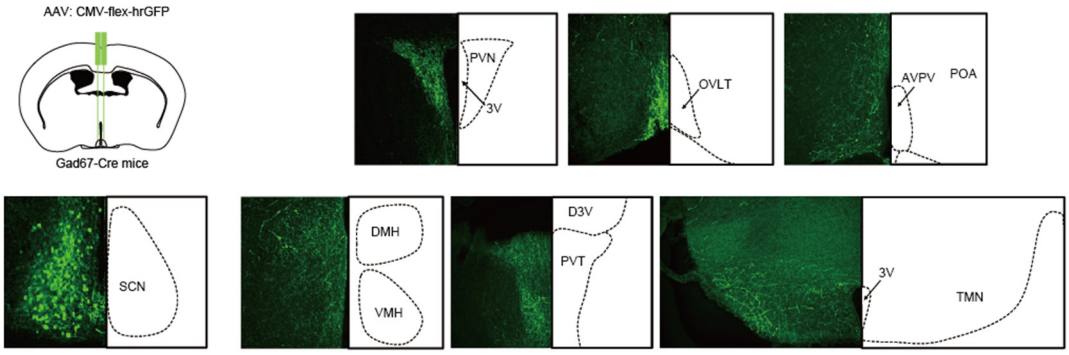


図 2. 視交叉上核からの出力領域。

視交叉上核特異的に蛍光タンパク質を発現させた。その後脳切片を作製し、軸索が密に確認される領域を確認した。

3. 室傍核神経の光操作

視床下部室傍核神経は様々な神経ペプチドを発現する神経細胞である事が知られている。その中でコルチコトロピン放出因子（CRF）神経はストレス応答に関わる事から、睡眠覚醒の調節に関わるのではないかと考えた。そこで、CRF-Cre マウスを導入し、Cre 依存的に ChR2 を発現させる事が可能な AAV（AAV-CMV-flex-ChR2-EYFP）を室傍核 CRF 神経に発現させた。その後、光ファイバーを室傍核直上に挿入し、さらに脳波・筋電図を計測するための電極およびワイヤーを装着した。2 週間以上の手術回復期間を置いたのち、脳波・筋電図の計測を行いながら、10 Hz での光刺激を行い、睡眠・覚醒の変化を確認した。

室傍核 CRF 神経を光刺激すると、覚醒が上昇する事を確認した。これはノンレム、レム睡眠からであっても覚醒に移行した。対照群では、光刺激に依存した睡眠・覚醒のステージ変化は認められなかった。これらの結果は、室傍核 CRF 神経は覚醒に関わる神経細胞であると言える。

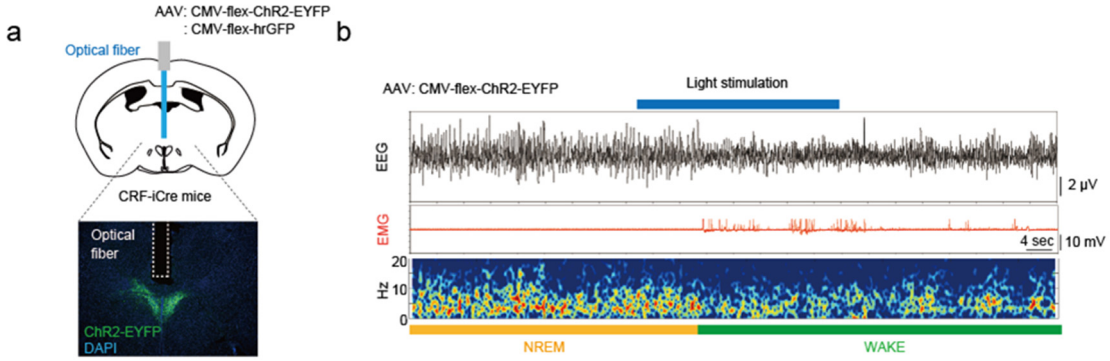


図 3. 室傍核 CRF 神経の光操作と睡眠覚醒調節

(a) CRF-Cre マウスの室傍核に AAV-CMV-flex-ChR2-EYFP をインジェクションし、光ファイバーを挿入した。

(b) 光照射（10 Hz）により NREM 睡眠から覚醒に移行した。

4. 視交叉上核における室傍核神経活動調節

視交叉上核の活動依存的な室傍核の神経活動調節を明らかにするために、視交叉上核の神経活動を光で操作するのと同時に、室傍核の神経活動を同時に計測する事を試みた。Gad67-Cre マウスから、室傍核および視交叉上核を含む脳スライスを作製し、そこに AAV を用い開発したスプリットタイプの発光カルシウムプローブを神経細胞に発現させ、さらに Cre 依存的に stabilized step function opsin（SSFO）を発現させた。発光を用いて神経細胞のカルシウムイメージングを行い、青色光を照射すると視交叉上核の細胞内カルシウム濃度が上昇した。一方で、室傍核の細胞内カルシウム濃度は減少した。同様の事を、ChrimsonR と GCaMP6s の組み合わせでも確認した。これらの結果は、室傍核の神経活動は、視交叉上核の活動依存的に調節されている事を示す。

考　察

視交叉上核は概日時計の中枢として機能し、生体機能の時間的な統合を行う。視交叉上核の電気破壊実験、さらには視交叉上核の移植実験から、概日リズムにおける視交叉上核の重要性が示唆されてきた。さらに、光イメージング技術の発展により、視交叉上核における細胞内カップリングのメカニズムが明らかになってきた。しかしながら、視交叉上核から先どのような神経回路が重要であるかはまったく不明であった。本研究では、視床下部内の神経回路が、視交叉上核からの時間情報を睡眠・覚醒に伝達している事を世界で初めて明らかにした。睡眠・覚醒だけでなくその他さまざまな生理的現象に概日時計の中枢である視交叉上核は関わっている。本研究を皮切りに新たな神経回路が見いだされる事が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者、名古屋大学環境医学研究所の山中章弘教授には貴重なコメントをいただきました。同研究室の、三好由夏さん、塚本沙代さん、北海道大学の中谷朋枝さんには実験のサポート、動物のタイピングをしていただきました。ここに感謝の意を表します。また、発光イメージングツール開発ではオリンパス株式会社の杉山崇先生、Vgat-flox マウスの提供をしてくださった群馬大学の柳川右千夫教授、研究の遂行にあたり多くのご指導、議論の場をくださった北海道大学（前所属）の本間研一教授、本間さと教授に感謝いたします。

文　献

1) Moore, R. Y. & Speh, J. C. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. Neurosci Lett 150, 112-116 (1993). Moore, R. Y. & Eichler, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain research 42, 201-206 (1972). https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6
2) Stephan, F. K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 69, 1583-1586 (1972). https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1583
3) Inouye, S. T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 5962-5966 (1979). https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5962
4) Sato, T. & Kawamura, H. Circadian rhythms in multiple unit activity inside and outside the suprachiasmatic nucleus in the diurnal chipmunk (Eutamias sibiricus). Neuroscience research 1, 45-52 (1984). https://doi.org/10.1016/0168-0102(84)90029-4
5) Moore, R. Y. & Speh, J. C. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. Neurosci Lett 150, 112-116 (1993). https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90120-A