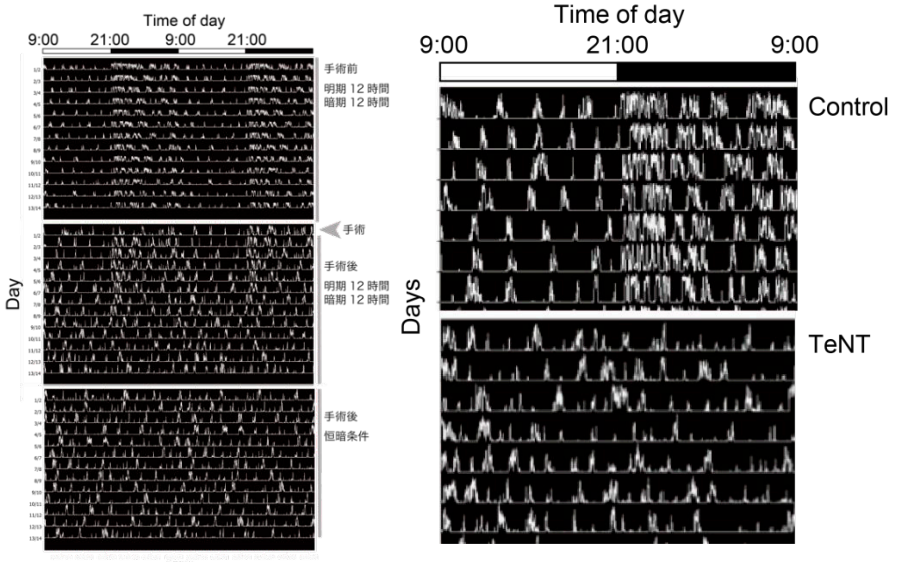
211　時計細胞が睡眠のタイミングを決定する神経機構	平野　有沙

【目的】睡眠は生物に不可欠な本能行動の一つである。睡眠は量的に充分であるだけではなく睡眠・覚醒のタイミングも重要なファクターである。特に 24 時間型社会と呼ばれる現代社会では、概日リズム睡眠障害が社会的な問題であり、癌、メタボリックシンドロームや鬱病などの重篤な病気と深く連関する。位相決定に重要な役割を果たす概日時計の中枢は視床下部の視交叉上核（SCN）に存在しており、個々の SCN 神経はそれぞれ細胞内に分子時計を内在する。個体においては SCN から他の脳領域に時刻情報を出力することで、睡眠リズムをはじめ様々な生理リズムが生み出されると考えられるが、SCN から行動に至る神経ネットワークの理解はほとんど進んでいない。本研究では、概日時計の中枢である視交叉上核（SCN）を出発点として神経投射される細胞群の同定とその神経回路が生理リズムの基本である睡眠覚醒サイクル制御において果たす役割の解明を目指した。特に、SCN の中でも第三の神経群を形成しながらその機能がわかっていないガストリン放出ペプチド（GRP）産生神経に注目し、GRP 神経の投射地図を作製するとともに概日リズム制御における生理的意義を明らかにした。

【方法】*Grp* 遺伝子プロモーターに駆動される *Cre* リコンビナーゼを発現する *Cre* ドライバーマウスとアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて GRP 神経特異的な遺伝子操作を行った。GRP 神経を特異的に蛍光タンパク質でラベルし、その投射先マッピングを行った。さらに、GRP 神経特異的に破傷風毒素（テタヌス毒素, TeNT）を発現させて、神経小胞を機能阻害したときの行動リズムへの影響を解析した。その際に SCN の時計遺伝子発現リズムを調べるために PER2::LUC マウスにおける発光モニターを行った。さらに、赤色ルシフェラーゼである AkaLuc を用いて自由行動下のマウスにおける脳深部の発光を観察することで、*in vivo* で神経活動を測定する実験系を立ち上げた。

【結果】*Grp-iCre* ノックインマウスの SCN に ChR2-EYFP またはシナプトファイジン-GFP を発現する AAV を投与することにより、神経細胞の軸索を蛍光ラベルした。その結果、SCN の GRP 神経は視床下部の視索前野（POA）、視床室傍核（PVT）、室傍核下部領域（SPVZ）、視床下部室傍（PVH）、核視床下部背内側核（DMH）に密な投射をしている一方、視床下部腹内側核（VMH）には投射しないことが判明した。さらに、TeNT を発現させたマウスにおいては行動リズムが大きく減弱することが明らかになった（図）。さらにそのときの SCN の PER2::LUC の発現リズムも大きく減弱していた。神経活動のイメージングに関しては、SCN のような脳深部でも完全な非侵襲系でルシフェラーゼの発光を検出することが可能であった。今後、基質の連続投与の条件を確定させて GRP 神経における神経活動リズムを観察する予定である。

TeNT を用いて GRP 神経を抑制したときのマウス行動リズム



211. 時計細胞が睡眠のタイミングを決定する神経機構

平野　有沙

*筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構

Key words：概日時計，視交叉上核，GRP 神経，概日リズム

緒　言

睡眠は生物に不可欠な本能行動の一つである。一時的な断眠は認知機能、学習機能や注意力の低下をもたらすが、断続的な不眠によって生物は様々な失調をきたす。一方、量的に充分であるだけではなく睡眠・覚醒のタイミングも生体恒常性の維持において重要なファクターである。特に 24 時間型社会と呼ばれる現代社会では、概日リズム睡眠障害が社会的な問題であり、例えばシフトワーカーでは癌、メタボリックシンドロームや鬱病などの重篤な病気の罹患率が高くなることが知られている。

睡眠サイクルの位相は体内時計である概日時計が重要な役割を果たす。時計中枢は視床下部の視交叉上核（SCN）に存在しており、個々の SCN 神経はそれぞれ細胞内に分子時計を内在する。個体においては SCN から他の脳領域に時刻情報を出力することで、睡眠・覚醒リズムをはじめ様々な生理リズム（摂食リズムや代謝リズム）が生み出されるため、概日時計の出力系の理解なくしては生理リズム形成の根幹を理解したとは言い難い。しかし、細胞内または SCN 内の時計発振メカニズムが極めて詳細に解析されてきたのに対し、生理リズムの出力系である SCN から行動に至る神経ネットワークの理解はほとんど進んでいない。さらに、複数の神経ペプチドが混在する SCN においてそれぞれの神経細胞群が果たす役割については未解明な部分が多い。本研究では、特に SCN の中で第 3 の細胞群を形成しながら知見の少ないガストリン放出ペプチド（GRP）産生神経に着目して、神経投射される細胞群の同定とそれらが睡眠覚醒サイクル制御において果たす役割の解明を目指した。

方法および結果

1. CN の GRP 神経の投射地図作成

GRP 神経特異的な遺伝子操作を行うため、*Grp* 遺伝子座に *iCre* 遺伝子を挿入した *Grp-iCre* ノックインマウスを新たに導入した（富山大学森寿先生との共同研究［1］）。そのマウスの SCN に Cre 依存的に ChR2-EYFP またはシナプロファイジン-GFP を発現するようなアデノ随伴ウイルス AAV を投与することにより、神経細胞の軸索を蛍光ラベルした。ウイルスをマウスに投与してから 2 週間後に、4%PFA を用いてマウスを還流固定し、脳を取り出した。脳切片に対して抗 GFP 抗体を用いて免疫組織染色を行い、蛍光タンパク質のシグナルを増強させた。その結果、SCN の GRP 神経は視床下部の視索前野（POA）、視床室傍核（PVT）、室傍核下部領域（SPVZ）、視床下部室傍（PVH）、核視床下部背内側核（DMH）に密な投射をしている一方、視床下部腹内側核（VMH）には投射しないことが判明した（図 1、A～C）。

*現在の所属：筑波大学 医学医療系・国際統合睡眠医科学研究機構

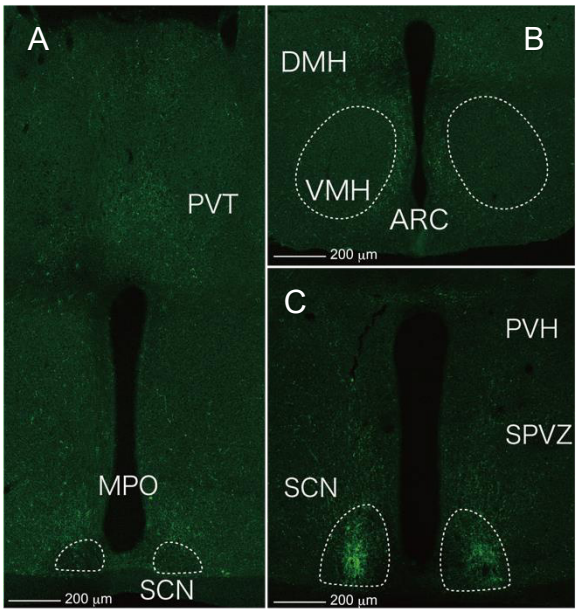


図 1. GRP 神経の投射地図

Grp-iCre マウスを利用してシナプス局在タンパク質であるシナプトファイジンと GFP の融合タンパク質を SCN の GRP 神経に発現させた。SCN の GRP 神経の細胞体のみが GFP でラベルされている。一方、GFP でラベルされた軸索は視索前野（POA、図中では特に MPO）、視床室傍核（PVT）（図 1A）、背側外側核（DMH）、弓状核（ARC）（図 1B）、視床下部室傍核（PVH）、室傍核下部領域（SPVZ）（図 1C）に GFP のシグナルが認められる。

2. GRP 神経の生理的意義

神経連絡を抑制したときの生理リズムへの影響を調べるため、GRP 神経特異的にテタヌス毒素（破傷風毒素）を発現させて GRP 神経において神経小胞を機能阻害した。マウスの行動を赤外線センサーでモニターし、行動リズムを解析したところテタヌス毒素を発現させたマウスにおいては行動リズムが大きく減弱することが明らかになった（図 2A）。一方、コントロールとして GFP を発現させたマウスではリズムの減弱はまったく見られなかった（図 2B）。また、*Grp-iCre* マウスは *Grp* 遺伝子の開始コドンから *iCre* 遺伝子が挿入されているため、*Grp* ノックアウトマウスとしても使用可能である。そこで、*Grp-iCre* ホモマウス（ホモノックアウトマウス）の行動を解析したところ、ノックアウトマウスと野生型マウスで行動リズムに大きな違いは観察されなかった。つまり、行動リズム出力には神経ペプチドである GRP 以外に GRP 神経で発現している神経伝達物質が関与していると考えられた。

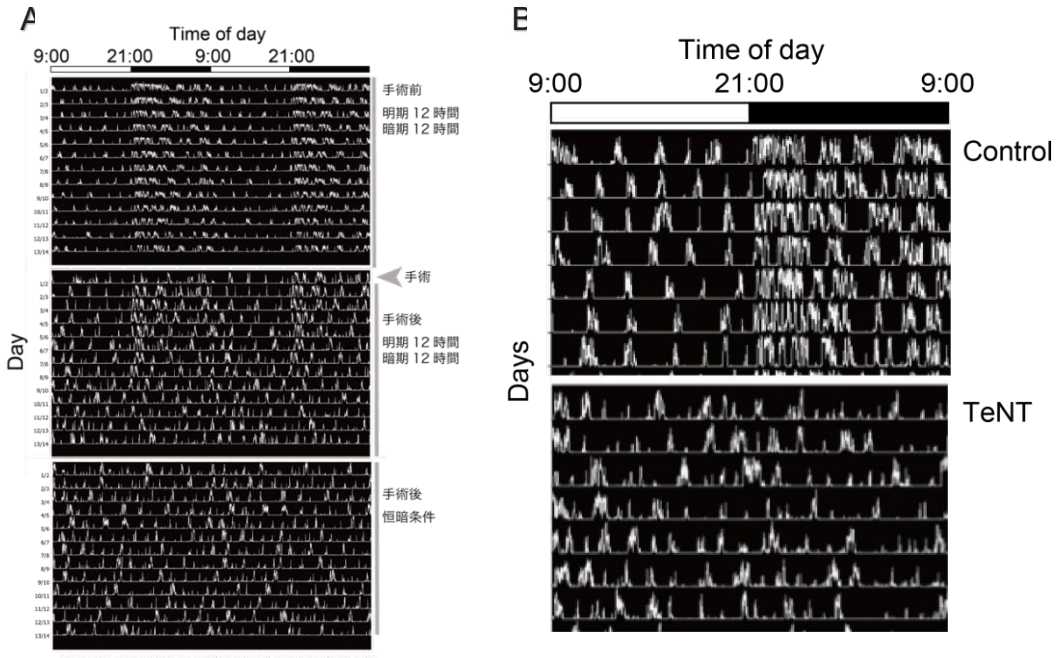


図 2. GRP 神経に TeNT を発現させたマウス行動のダブルプロット

A) AAV 投与前後のマウスの自発行動を赤外線センサーによって測定した。TeNT を発現する AAV の投与前は明瞭な行動リズムが見られるのに対し、ウイルスの投与後は徐々にリズムが失われ、恒暗条件においてはリズムがほぼ失われている。

B) GFP のみを発現させたコントロールマウスと TeNT を発現させたマウスの行動リズムの比較。恒暗条件における行動リズムをプロットした。

3. GRP 神経の出力リズム

実験 2 で TeNT を発現したマウスは行動リズムが大きく減弱することを見出した。このマウスにおいて SCN の時計機能を調べるために時計タンパク質 PER2 とルシフェラーゼの融合タンパク質を発現する PER2::LUC ノックインマウスを用いて SCN 時計を可視化した。行動リズムが消失した個体から SCN 切片を作製し、切片培養しながらルシフェラーゼの発光をモニターした。その結果、GFP を発現するコントロールマウスの SCN は明瞭な概日性の発光リズムを示したのに対して、TeNT を発現するマウスにおいては発光リズムが失われていた（図 3）。この結果から、SCN の GRP 神経は SCN の細胞リズムを維持するのに必要であることが判明した。

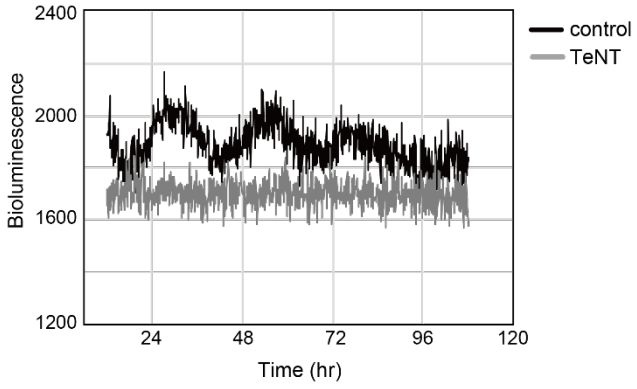


図 3. SCN における PER2::LUC 発光リズム

TeNT を発現させたマウスと GFP を発現させたコントロールマウスからビブラトームを用いて 150 μm 脳切片を作製し、SCN のみ切り出した。0.1 mM ルシフェリンを加えた切片培養培地で SCN 切片を培養し、クロノス Dio（ATTO）を用いて発光を測定した。

4. GRP 神経の出力リズム測定のための *in vivo* 神経活動モニター系の立ち上げ

GRP 神経の活動リズムを調べるため、*in vivo* での神経活動のイメージングを試みた。神経活動のモニターに頻繁に使用される GCaMP は蛍光タンパク質であり、励起光の照射や蛍光の検出に光カニューレを挿入する必要があるため、SCN および SCN の投射先領域が破壊されることが強く懸念される。そこで本研究で我々は、赤色ルシフェラーゼを用いた非侵襲イメージングを用いることにした。イメージングには赤色ルシフェラーゼである AkaLuc を用いた［2］。テトラサイクリン応答配列の下流に *AkaLuc* 遺伝子を挿入したウイルスベクターおよび *c-Fos* プロモーター下流にテトラサイクリンアクチベーター遺伝子を挿入したウイルスベクターを作成し、脳内にイジェクションした。ルシフェラーゼの発光基質を投与し、自由行動下のマウスにおける発光を MIIS in vivo imager を用いて観察した（図 4）。観察された発光は十分であり、今後、基質の連続投与の条件を確定させて GRP 神経における神経活動リズムを観察する予定である。

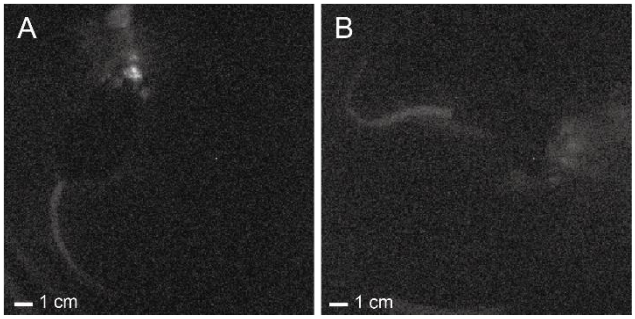


図 4. AlaLuc による脳深部イメージング
AAV を用いてマウスの視床下部（脳表から 5.7 mm 深部）に AlaLuc-Venus 融合タンパク質を発現させた。手術から 1 週間後にルシフェラーゼの基質である Alalumine -HCl 30 mM を 100 μl 腹腔内投与し、脳内の生物発光を検出した（MIIS multi functional in vivo imaging system、EM ゲイン 1,000、露光 1 秒）。（A : AkaLuc を発現させたマウス。B : コントロールマウス）。

考　察

本研究では GRP 神経が行動リズム出力において重要な役割を果たすことを明らかにした（Li, Hirano et al., 投稿準備中）。GRP 神経は SCN の中でも比較的小さな細胞集団を作っているのにもかかわらず、GRP 神経のみの機能不全で行動リズムが大きく影響を受けた。一方、我々は *Grp* 遺伝子の欠損が行動リズムに大きな影響を及ぼさないという結果を得ている。このことは GRP 神経に発現する他の因子が行動リズム出力に関与していることを示唆している。このような結果は、一般的に遺伝子欠損の効果を調べる分子生物学的な手法では、見落としがちなメカニズムが存在することを明確に示している。本研究領域では、神経細胞の種類に特異的な解析は極めて少なく、貴重な研究結果が得られたと考えられる。最近になって SCN 神経のシングル RNA-seq 解析が報告されたが、*Grp* 遺伝子は SCN に発現する主要な神経ペプチドである Vasoactive intestinal peptide（VIP）と共発現しているようである。つまり、本研究で我々が見出した GRP 神経テタヌス毒素発現マウスにおける行動リズム異常に VIP が関与している可能性があり、今後解析が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、富山大学医学部の森寿教授と理研 CBS の宮脇敦史チームリーダーである。

文　献

1) Glucocorticoid receptor-mediated amygdalar metaplasticity underlies adaptive modulation of fear memory by stress. Inoue R, Abdou K, Hayashi-Tanaka A, Muramatsu SI, Mino K, Inokuchi K, Mori H. Elife. 2018 Jun 26;7. pii: e34135. doi: 10.7554/eLife.34135.

2) Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. Iwano S, Sugiyama M, Hama H, Watakabe A, Hasegawa N, Kuchimaru T, Tanaka KZ, Takahashi M, Ishida Y, Hata J, Shimozono S, Namiki K, Fukano T, Kiyama M, Okano H, Kizaka-Kondoh S, McHugh TJ, Yamamori T, Hioki H, Maki S, Miyawaki A. Science. 2018 Feb 23;359(6378):935-939. doi: 10.1126/science.aaq1067.