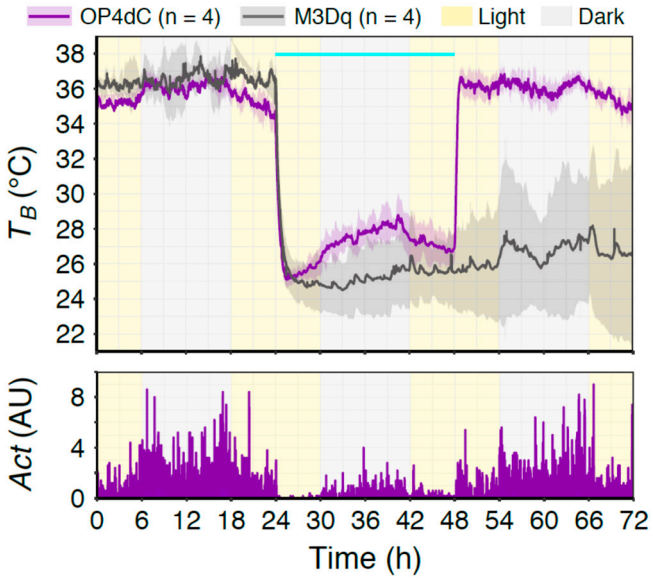
37　冬眠様状態を誘導する神経機構の研究	桜井　武

【目的】我々は、最近、視床下部前腹側脳室周囲核（AVPe）に存在し、*Qrfp* 遺伝子を発現する少数の神経細胞群（Q ニューロン）を操作することにより、本来冬眠を行わないマウスやラットにおいて、冬眠状態と非常によく似た、環境温度に近い低体温・低代謝状態を数日にわたり誘導することが可能であることを見出した。非冬眠動物にも冬眠様の制御された低代謝・低体温状態（QIH）を誘導できるという知見を利用して、将来ヒトやペット・家畜などに人工冬眠を導入する技術基盤を支える生物学的知見を得ることを目的とした。

【方法】1. 研究全体の推進のため、極弱光により長期間の QIH 誘導を可能にするツールを作製した。C 末端を中心に OPN4 に改変を加えたものを数種作製し、AAV ベクターを用いて *Qrfp-iCre* マウスの AVPe に発現させ、光ファイバーを留置して QIH 誘導を行い、体温はサーモグラフィーでモニターした。系の確立後、QIH 中の体温動態および心拍数の変動をテレメトリーによりモニターし、QIH 導入および回復時の心機能の変化を明らかにした。2. Q ニューロンのターゲットニューロンの同定を目指し、Q ニューロンを興奮させたときに興奮する視床下部背内側核（DMH）ニューロンをラベルするために、TRAP2 マウスの AVPe に *Qrfp* 遺伝子プロモーターを用いた AAV ベクターにより変異型 OPN4dC を発現させ、DMH に hM3Dq を Cre 依存的 AAV ベクターにのせて投与したのち、AVPe に留置した光ファイバーを用いて光遺伝学的に QIH を導入した。Tamoxifen 投与により、QIH 起動時に興奮したニューロンを hM3Dq にてラベルした後、CNO 投与により QIH のような低体温・低代謝状態が誘導できるか検討した。

【結果】1. 光操作をもちいた QIH 誘導法の開発: QIH 状態を高い時間分解能でオン・オフできる、光操作による QIH 誘導法を確立した。これを用いて QIH 導入および QIH からの離脱時の自律神経応答を明らかにした。OPN4 を改変したオプシ（OPN4dC）を用いて、極めて微弱な光で 24 時間にわたり QIH を操作できるようになった。このことにより、QIH 導入時だけではなく、復温時のダイナミックな生体機能の変化を測定できるようになった。QIH 導入時には心拍数の低下は体温の低下より早く観察され、復温時も、心拍数の増加が体温の上昇に先行して見られることが分かった（Takahashi et al. Cell Rep Methods, in revision）。この方法により、今後、QIH 中が睡眠だけではなく、記憶・情動などに及ぼす影響を解析できると思われる（下図）。2. Q-flp マウスの作製：現在繁殖を行っており、Q ニューロンサブタイプの機能解析やターゲットニューロンの同定に用いる予定である。3. 10×Chromium を用いて、Q ニューロンを含む AVPe 領域の単細胞解析を行い、Q ニューロン発現遺伝子に関する情報を得た。

OPN4dC をもちいた QIH 誘導における深部体温（上、T_B）と行動量（下、Act）の経時変化



37. 冬眠様状態を誘導する神経機構の研究

桜井　武

筑波大学 医学医療系／国際統合睡眠医科学研究機構

Key words：体温制御，低代謝，冬眠，視床下部，視索前野

緒　言

冬眠中の動物は、低体温・低代謝・低活動の状態になるが、その状況下でも環境の変化に適応することが可能であり、何ら組織障害を伴うことなく自発的に元の状態に戻る。冬眠動物のように生体の酸素需要を安全に低下させることができれば、さまざまな応用が可能であるため、その機能と作用機序には注目がされている。しかし、マウスなど汎用される実験動物の多くは冬眠をしないこともあり、冬眠中の詳細な生理的状態、作用メカニズムなどは謎につつまれている。我々は近年、視床下部前腹側脳室周囲核（AVPe）に存在し、*Qrfp* 遺伝子を発現する少数の神経細胞群（Q ニューロン：Quiescence inducing neurons）を操作することにより、本来冬眠を行わないマウスやラットにおいて、冬眠状態と非常によく似た、環境温度に近い低体温・低代謝状態を数日にわたり誘導することが可能であることを見出した［1］。復温後、なんらの機能障害・組織障害もみられなかった。化学遺伝学的および光遺伝学的に Q ニューロンを刺激することによって得られる冬眠様状態（QIH）は体温セットポイントの大幅な低下を伴っており、数日間の低体温・低活動状態が安定して安全に維持された。また、マウスはなんら機能的および組織学的障害をおうことなく、自律的に回復した。*Qrfp* 遺伝子は哺乳類において広く保存されていることから、この機能は哺乳類において保存されている可能性が高く、ヒトを含む哺乳類に適応可能である可能性が高い。この神経系の操作により、非冬眠動物にも冬眠様の制御された低代謝・低体温状態（QIH）を誘導できるという知見を利用して、将来ヒトやペット・家畜などに人工冬眠を導入する技術基盤を確立するための生物学的知識基盤を得ることを目的とした。

方法および結果

1. 極弱光による光操作をもちいた QIH 誘導法の開発

化学遺伝学（DREADD）による QIH は、その回復に数日以上を要し、その間、ゆっくりと回復するため、QIH が生理機能に及ぼす役割を解明するために若干使いにくい点があった。たとえば QIH 中の脳派はノンレム睡眠と全く異なっており、通常の睡眠の機能を果たしていないと思われるが、その間、睡眠圧は上昇するのか、逆に低下するのか見る際、QIH がゆっくりと回復するのでは、はっきりとした結果が得られない。つまり、QIH から解放されたときにリバウンドスリープがみられるのかどうか、回復過程で徐々に睡眠をとるようになるため、はっきりとした結論を出すのが難しかった。

そこで、QIH 状態を高い時間分解能でオン・オフできる、光操作による QIH 誘導法を確立した。QIH を長時間にわたって光誘導するためには、長時間の光照射によっても組織障害を来さない、微弱光による QIH 導入法を確立する必要があった。Q ニューロンに各種オプシンを発現させ、光刺激により QIH を導入することにより検討した結果、hOPN4 の C 末端を欠失させたオプシン（OPN4dC）がもっとも効率よく、ChR2 に通常使用する光の 1,000 分の 1 以下の光強度で QIH を導入できることが明らかになった。OPN4dC を用いて、極めて微弱な光で 24 時間にわたり QIH を操作できるようになった（図 1）。このことにより、QIH 導入時だけではなく、復温時のダイナミックな生体機能の変化を測定できるようになった。まずは、QIH 導入および QIH からの離脱時の自律神経応答を明らかにした。QIH 導入時には心拍数の低下は体温の低下より早く観察され、復温時も、心拍数の増加が体温の上昇に先行して見られることが分

かった（図 2）[2]。この方法により、今後、QIH 中が睡眠だけではなく、記憶・情動などに及ぼす影響を解析できると思われる。

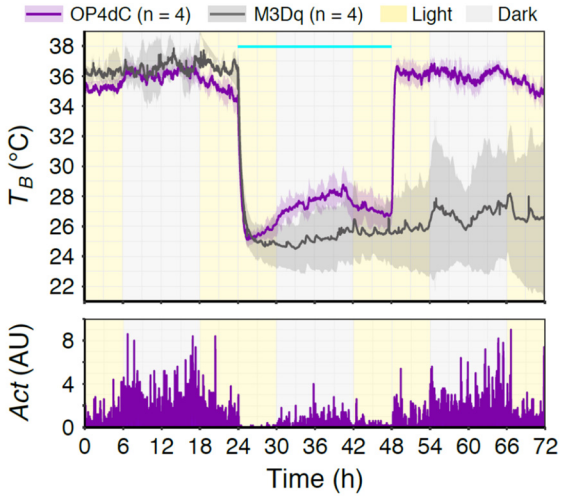


図1. OPN4dCをもちいたQIH誘導における深部体温（上：TB）と行動量（下：Act）の経時変化

深部体温（上：TB）と行動量（下：Act）の経時変化を紫色のトレースで表す。灰色のトレースは hM3Dq をもちいた DREADD による QIH の経時変化。Qrfp-iCre マウスの AVPe に Cre 依存的 AAV ベクターを用いて、OPN4dC または hM3Dq を発現させた。光は AVPe に留置した光ファイバー経由で 463 nm の微弱光（5 μW）を定常光として与えた（緑色のバーの時間帯）。24 時間にわたり低体温・低活動状態を維持できた。光照射停止後、体温は 60 分程度で 37℃付近に戻り、活動も開始した。DREADD による QIH は、24 時の時点で 1 回の CNO 投与により誘導した。

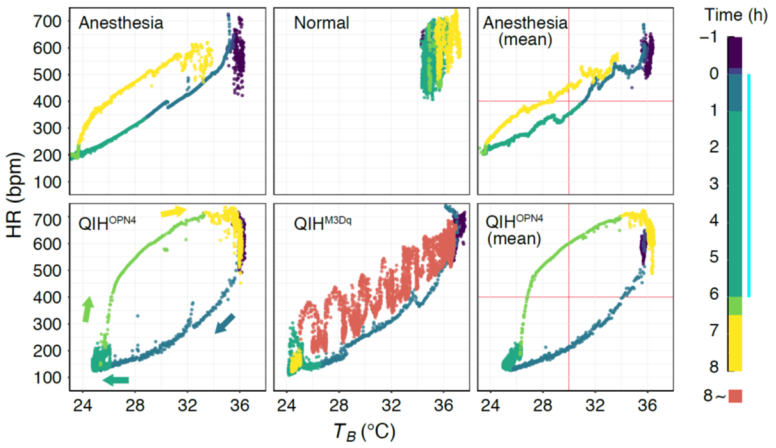


図 2. マウスの低体温状態における深部体温 TB と心拍数 HR の関係

QIHOPN4 では、OPN4dC を発現する Q ニューロンが青色光（3 μW）により 6 時間刺激された。コントロールでは、QIHOPN4 と同じ条件で、mCherry を発現する Q ニューロンを刺激した。QIHM3Dq では、hM3Dq を発現する Q ニューロンを clozapine-N-oxide（CNO）腹腔内投与（0.1 mg /kg）により興奮させた。麻酔では、QIHOPN4 および Normal の条件で使用したのと同じマウスを 1%イソフルランで 6 時間曝露した。光照射、CNO 腹腔内投与、イソフルラン吸入の開始時刻は時刻 0 とした。各条件の HR を同時刻の結核の関数としてプロットしたものである。プロットは、刺激開始 1 時間前、刺激開始 6 時間後、回復 2 時間後を各色で示した。QIHM3Dq では、刺激開始 6 時間後でも明確な回復が見られないため、完全回復までの時間のプロットも余分に描いている（オレンジ色）。

2. Q ニューロンのターゲットニューロンの同定

Q ニューロンは主に視床下部背内側核（Dorsomedial Hypothalamus : DMH）に作用して QIH を誘導すると考えられた。そのターゲットニューロンをラベルするために、TRAP2 マウスの AVPe に *Qrfp* 遺伝子プロモーターを用いた AAV ベクターにより OPN4dC を発現させ、また、DMH に hM3Dq を Cre 依存的 AAV ベクターにのせて投与したのち、AVPe に留置した光ファイバーを用いて光遺伝学的に QIH を導入したのち、Tamoxifen 投与により、QIH 起動時に興奮したニューロンを hM3Dq にてラベルした。その後、CNO 投与により QIH のような低体温・低代謝状態が誘導できるか検討したが、体温はむしろ上がる傾向にあり、QIH による低体温に応答した Cold-sensitive neurons をトラップしてしまった可能性が高い。今後、QIH 下における温熱的中性域と考えられる外気温での実験を進める予定である。また、DMH 以外のターゲットニューロンが重要である可能性も視野に入れて、とくに視索前野ニューロンに着目した検討も行う。

Qrfp プロモーターによる OPN4 発現では十分な QIH が誘導できないことも問題であり、プロモーターの最適化とともに *Qrfp* 遺伝子に FlpO を組み込んだ Qrfp-Flp マウスの開発を行った。Qrfp-Flp マウスは現在繁殖中であり、これが使えるようになれば、AVPe に Flp 依存的な AAV により hM3Dq や OPN4d を投与することにより、効率よく Q ニューロンにそれらの遺伝子を発現させることが可能になる。これにより、Cre をもちいた TRAP2 法が使いやすくなるため、成果が期待できる。

3. Q ニューロンサブタイプの機能解明（Q-flp マウスの作製）

Q ニューロンには、vGlut2 陽性の Qe ニューロン、vGat 陽性の Qi ニューロン、および両方を発現している Qh ニューロンが存在することがわかっている［1］。そこで、それぞれのサブポピュレーションの機能と解剖学的特徴を明らかにするべく、上記の Qrfp-Flp マウスを作製した。現在繁殖を行っており、Flp 依存的な AAV を用いて、hM3Dq を発現させ、QIH の誘導を確認しようとしている。この系がうまく動けば、Qrfp-Flp マウスと vGat-ires-Cre あるいは、vGlut2-ires-Cre と交配し、Flp/Cre の両方に依存的な AAV コンストラクト（Con/Fon）を用いて、hM3Dq を発現させ、Qe＋Qh ニューロンのみ、あるいは、Qi＋Qh ニューロンのみによる QIH 誘導を試みる。さらに、順行性および逆行性トレーシングを行い、Qe および Qi ニューロンの入出力系を明らかにしていく予定である。一方、Q-loxP-Flp-lox マウスも確立した。このマウスを vGlut2-ires-Cre や vGat-ires-Cre と交配することにより、それぞれ、Qi ニューロンのみ、Qe ニューロンのみによる QIH や、入出力系の観察が可能になると思われる。

4. QIH による延命効果の確認

また QIH が疾患遅延に役立つことを検証するための実験を行い、マウスを用いた複数の急性疾患モデルにおいて延命効果を確認した（投稿準備中）。どのモデルにおいても、QIH は発症後に誘導しても、明確に延命効果を呈することが明らかになった。今後、マイルドな病態モデルにも QIH を適用し、延命効果を確認していく。

5. QIH を誘導する薬物開発

Q ニューロンに発現する遺伝子の網羅的解析をおこなっている。視床下部前腹側脳室周囲核周辺のスライス標本より核を調製し、Chromium（10×Genomics）による scRNAseq を進めているほか、Q ニューロン核に GFP を発現させたマウスを作製し、核を FACS にて単離、核を用いた scRNAseq による解析を行っている。すでに数種の候補受容体遺伝子をピックアップすることが出来ており、まず、既知のリガンドが知られているものから、マウスを使って体温への影響を検討していく。

考　察

1. 極弱光による光操作をもちいた QIH 誘導法の開発

OPN4dC を用いた QIH は、通常の ChR2 に用いる 1/1,000 以下の強度の光（5μW）で導入可能であり、経頭蓋的な光操作も可能であった。90 分以内に導入され、また、光照射停止後 60 分以内にマウスは冬眠様状態から完全に回復した。この時間分解能を生かして QIH 中の生理機能や、QIH が様々な生理機能、神経機能に与える影響を解明することが可能になると考えられる。

2. Q ニューロンのターゲットニューロンの同定

Q ニューロンは主に DMH に作用して QIH を誘導すると考えられるため、DMH をターゲットとして TRAP2 を用いて Q ニューロン活性化後に興奮するニューロンをトラップすることを試みた。しかし、ラベルされたニューロンを操作しても QIH 様の状態は誘導できず、方法に問題があったと考えられた。Qrfp プロモーターによる OPN4 発現では十分な QIH が誘導できないことが問題であり、*Qrfp* 遺伝子に FlpO を組み込んだ Qrfp-Flp マウスの作製をおこなった。これが使えるようになれば、AVPe に Flp 依存的な AAV により hM3Dq や OPN4d を投与することにより、効率よく Q ニューロンにそれらの遺伝子を発現させることが可能になると考えられる。

3. Q ニューロンサブタイプの機能解明

Q ニューロンには、vGlut2 陽性の Qe ニューロン、vGat 陽性の Qi ニューロン、および両方を発現している Qh ニューロンが存在する［1]。これらのサブポピュレーションの機能と解剖学的特徴を明らかにするために、上記の Qrfp-Flp マウスを作製した。Qrfp-Flp マウスと vGat-ires-Cre あるいは、vGlut2-ires-Cre と交配し、Flp/Cre の両方に依存的な AAV コンストラクト（Con/Fon）を用いて、hM3Dq を発現させ、Qe＋Qh ニューロンのみ、あるいは、Qi＋Qh ニューロンのみによる興奮性操作が可能になり、それぞれの機能が解明できると思われる。また、順行性および逆行性トレーシングを行い、Qe および Qi ニューロンの入出力系を明らかにすることも可能である。

4. QIH による延命効果の確認

マウスを用いた感染症や急性腎不モデルにおいて延命効果が確認できた。このことにより、QIH を誘導することによる疾患進行の遅延に関して、期待が持てることが明らかになった。

5. QIH を誘導する薬物開発

将来 Q ニューロンを興奮させるための創薬ターゲットとして数種の GPCR をピックアップすることが出来た。これらをターゲットとした低分子量アゴニストの開発につながると思われる。

謝　辞

本研究の遂行に際し、筑波大学医学医療系分子行動生理学のメンバーに感謝する。

文　献

1） Takahashi, T.M., Sunagawa, G.A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., Sakimura, K., Takahashi, M., Sakurai, T. A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. ***Nature*** 583, 109–114(2020) DOI:10.1038/s41586-020-2163-6

2） Takahashi, T.M., Hirano, A, Yokoshiki, Y., Tokuda, T., Sakurai, T. Induction of hibernation-like state by optogenetics with improved OPN4. Cell Rep Methods, in revision