

睡眠リズムを制御する新規神経回路の特定と解析

筑波大学医学医療系・国際統合睡眠医科学研究機構

平野 有沙

【研究背景と目的】

睡眠は動物に不可欠な生理行動である。一時的な断眠は認知・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し、重篤な場合には死に至る。重要なことに、睡眠の量に加えてタイミング（位相）も我々の健康に強く影響を与える。24時間型社会と呼ばれる現代社会では、環境サイクルと体内リズムのズレから生じる概日リズム障害が問題となっており、睡眠障害、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の強い連関が報告されている。

睡眠位相の決定には概日時計と呼ばれる生体内の時計システムが重要な役割を担い、中枢時計が存在する視床下部の視交叉上核 (SCN) から他の脳領域に時刻情報を出力することで様々な生理リズム（睡眠・摂食・生殖リズムや代謝リズム）が生み出される。そのため、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が、SCNの“細胞内”の時計発振機構に比べて生理リズムの出力系を司る“SCN外”の神経ネットワークの理解は進んでいない。そこで本研究は、神経トレーサーを利用してSCNから神経投射される細胞群の同定を行うとともに、人為的に神経活動を操作することでその神経連絡の睡眠覚醒サイクル制御における役割を明らかにする。申請者らは最近、覚醒系神経の投射マッピングの過程でSCNから睡眠中枢のひとつである腹外側視索前野 (VLPO) への神経投射を発見した。さらに、SCNの中でもVLPOに投射する神経細胞と、主要な投射先である室傍核 (PVN) に投射する神経細胞は異なる細胞群を形成しており、そのSCN内の局在が大きく異なることを見出した。つまり、これらの細胞群はそれぞれ個性を持ち、異なる脳領域に投射することで様々な生理リズムの形成に寄与しており、VLPOに投射しているSCN神経が睡眠リズム形成を担う細胞群であると考えられた。本研究では、VLPOに投射しているSCN神経に着目し、その個性を理解するとともに睡眠覚醒リズム形成における寄与を調べて行動リズムを生み出す分子・神経機構を明らかにすることを目指した。

【方法と結果】

(1) VLPOへと出力するSCN神経の性状解析 投射先特異的にSCNの神経細胞群をラベルし、その性状解析を行った。イヌ科アデノウイルス2型 (CAV2) は軸索末端から取り込まれ、逆行性に輸送されて細胞体において目的遺伝子を発現するため、CAV2をVLPOに導入することで、その領域にのみ投射している神経細胞の遺伝子操作が可能である。本研究では、CAV2によりCreリコンビナーゼを発現させて、Cre依存的に目的の遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) をSCNに投与することでVLPOに投射しているSCN神経のみをラベルした (図1. AB)。まず最初に、蛍光ラベルしたSCN神経について、SCNに発現している神経ペプチドに対する免疫組織染色を行なったところ、VLPOに投射するSCN神経は腸管作動性ペプチド (VIP) を主に発現し、アルギニンパソプレシン (AVP) 神経とは共局在しなかった (図1, CD)。さらに、GABA神経マーカーである *Vgat* 遺伝子座に *Cre* 遺伝子を挿入した *Vgat-IRE5-Cre* マウスを用いてSCNのGABA神経のみに蛍光タンパク質を導入し、その軸索を可視化した。その結果、SCNのGABA神経は視索前野 (POA) 全般にわたり軸索を伸ばし、VLPOも含まれていた (図2)。つまり、SCNからVLPOに神経連絡する神経は少なくともVIP産生神経とGABA産生神経で構成されていることが判明した。

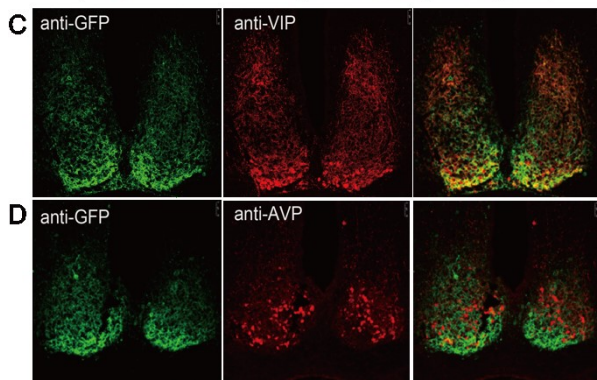


図1. SCN神経の逆行性ラベル

A. VLPOにCreを発現するCAV2を投与した。SCN神経の軸索が染色されている。B. SCNには膜局在タンパク質であるチャンネルロドプシン (ChR2) とEYFPの融合タンパク質を発現するAAVを投与した。C. $SCN \rightarrow VLPO$ 神経をGFP抗体 (緑) で染色し、VIP神経 (赤) との共局在を調べた。D. $SCN \rightarrow VLPO$ 神経をGFP抗体 (緑) で染色し、AVP神経 (赤) との共局在を調べた。

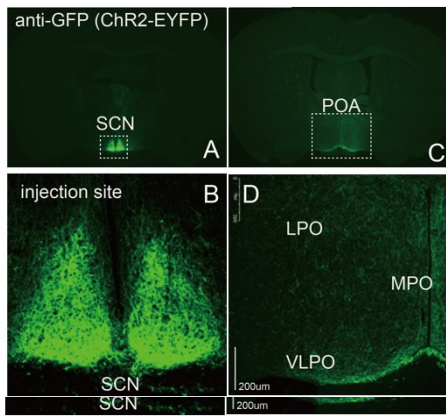


図 2. SCN^{GABA} 神経の順行性ラベル

AB. *Vgat-IRES-Cre* マウスの SCN に CRE 依存的に ChR2-EYFP を発現する AAV を投与した。SCN のほとんどの細胞において ChR2-EYFP の発現が確認された。CD. GFP 抗体による免疫組織染色を行い、SCN 神経の軸索の局在を網羅的に調べた。その中に POA が含まれていた。睡眠中枢である VLPO も SCN^{GABA} 神経からの神経投射をうける。

(2) VLPO へと出力する SCN 神経の機能解析 申請者はこれまでに薬理遺伝学的手法 (DREADD) を用いて、SCN→VLPO 神経を人為的に活性化したときにマウス自発行動が抑制されることを見出した (図 3, A)。CNO の投与による自発行動の低下が、実際にマウスの睡眠覚醒状態を変化させている結果であることを確認するため、EEG/EMG 測定による睡眠ステージ解析を行なった。CAV2 と hM3Dq-mCherry (Gq シグナリング活性化型の DREADD) を発現する AAV を用いて VLPO に投射する SCN 神経にのみ hM3Dq-mCherry を発現させた。EEG 測定のための電極を頭部に固定し、さらに筋電図を測定するための電極を皮下に埋め込んだ。その結果、人工リガンドである CNO の投与後 4 時間において、マウスの覚醒時間は有意に減少した (図 3. B)。この結果は SCN から VLPO に投射する神経回路が直接的に睡眠覚醒制御を行い、マウス自発行動の変化をもたらしていることを示唆する。

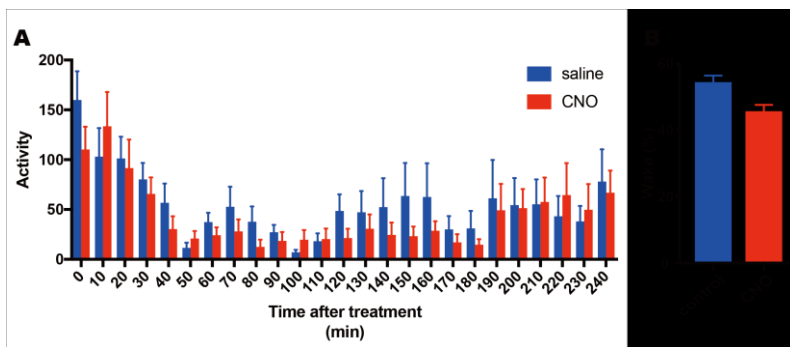


図 3. DREADD による SCN→VLPO 神経の活性化

SCN→VLPO に hM3Dq-mCherry を発現させて CNO (3mg/kg) を暗期開始 1 時間に腹腔内投与した。マウス行動を赤外線センサーでモニターした (n=8, p<0.05 by two-way ANOVA)。B. CNO を暗期開始 1 時間に腹腔内投与したときのマウス睡眠への影響を調べた (n=4, p<0.05 by student's ttest)

(3) SCN 神経の抑制による行動リズムへの影響

実験 2 では SCN の一過的な活性化がマウスの行動に及ぼす影響を明らかにしたが、この神経回路の生理機能を明らかにするには神経連絡の阻害を行うことが重要である。そこで我々は、神経毒素であるテタヌス毒素 (TeNT-LC) を用いて細胞の神経小胞を阻害した。具体的には、CAV2 と TeNT-LC および EYFP を発現する AAV を用いて VLPO に投射する SCN 神経のみに神経毒素を発現させた。そのあと赤外線センサーを用いてマウス行動リズムを測定した。その結果、コントロールの遺伝子を発現させたマウスにおいてはウイルスの投与後も明瞭な行動リズムが観察されたが、TeNT-LC を発現させたマウスは徐々にリズムを失い、明暗

サイクルにおいても行動リズムが大きく減弱した。また、恒暗条件においても行動リズムはほぼ消失していた (図 4. AB)。これらの結果から、マウスにおいて睡眠中枢に神経軸索を伸ばしている SCN 神経群は行動リズムの形成に必須の役割を果たしていることが明らかになった。

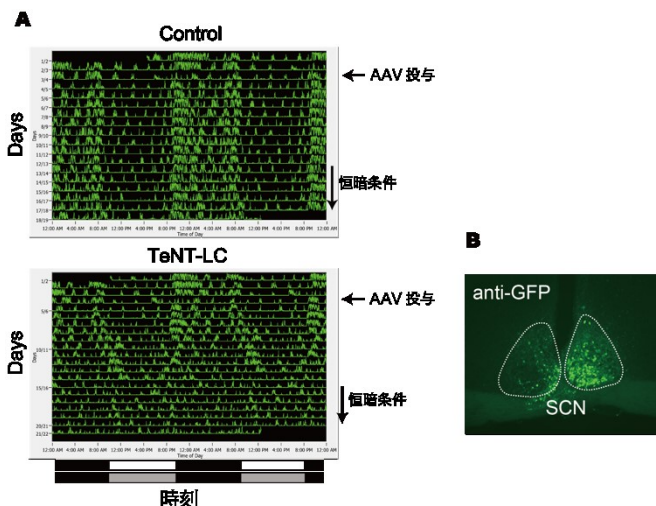


図 4. テタヌス毒素を発現したマウスにおける行動リズム

A. CAV2 と AAV の投与後、テタヌス毒素 (TeNT-LC) を発現させたマウスでは徐々に発現リズムが減弱していった。B. そのマウスの SCN における EYFP の発現 (TeNT-LC も同時に発現していると思われる) を GFP 抗体を用いて解析した。

(4) SCN 神経を抑制した際の SCN 概日リズムへの影響

我々は実験 3 で VLPO に投射する SCN 神経群を抑制した際に行動リズムの大きな減弱が見られることを見

出した。リズム消失には大きくわけて3つのメカニズムが考えられる。1) 個々の SCN 神経内の分子時計が破壊されている。2) SCN 神経間のカップリングが破壊されてリズムの脱同調が起きている。3) SCN 時計は正常に動いているが行動に至る出力経路に異常がある。そこで、行動リズム消失のメカニズムを明らかにするため、SCN の時計を可視化した。時計タンパク質 PER2 は発現量がリズムに変動するため、ルシフェラーゼとの融合タンパク質である PER2::LUC のルシフェラーゼ発光をモニターすることで細胞の分子時計をリアルタイムで解析することが可能である。そこで PER2::LUC マウスの SCN[→]VLPO 神経にテタヌス毒素を発現させた際の PER2::LUC リズムへの影響を調べた。マウスから SCN 切片を作成し、基質であるルシフェリンを添加した培地で培養した。CCD カメラを用い、数日間にわたってルシフェラーゼの発光をイメージングした。その結果、コントロールと TeNT-LC を発現させたマウスにおいて明瞭な概日リズムが観察された (図 5)。さらに、個々の SCN 神経のリズムは正確に揃っており、PER2::LUC リズムのピークタイムの分散に有意な違いは観察されなかった。つまり、神経毒素を発現させたマウスにおいても SCN 神経のカップリングは崩れておらず、SCN 時計は正常に機能していると考えられた。そのため、このマウスにおける行動リズム異常は SCN 神経からの出力経路への影響が原因だと考えられた。

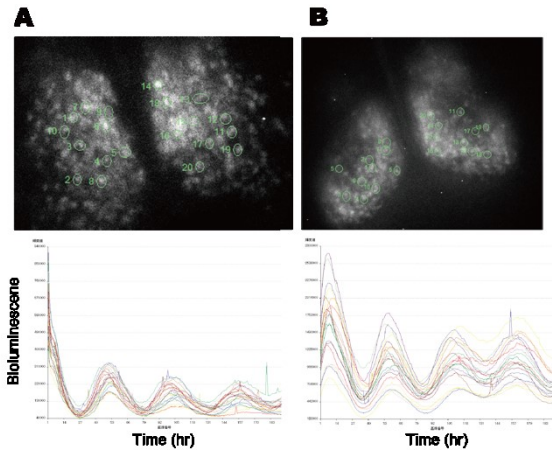


図 5. 行動リズム消失マウスにおける SCN 時計のイメージング

マウスの SCN[→]VLPO 神経に TeNT-LC を発現させて行動リズムを確認したあと SCN 切片を作製した。SCN 切片を 37°C で大気培養し、PER2::LUC の発光をシングルセルレベルでイメージングした (A. コントロールマウス, B. TeNT-LC 発現マウス)。各マウスの切片から 20 個のシングルセルをピックアップし、その発光リズムをプロットした。

(5) 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

自由行動下のマウスにおいて神経活動のリアルタイムモニタリングを行うことで、実際に生体内で 1 日のどの時刻に情報出力が行われているのかを明らかにして情報出力とマウス睡眠覚醒状態との相関を明らかにしたいと考え、*in vivo* での神経活動のイメージングを試みた。しかし、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ファイバーを挿入する必要があるため、SCN および SCN の投射先領域 (特に SCN の直上にある SPVZ および PVN) が破壊されることが強く懸念された。そこで我々は、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。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 6)。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 SCN 神経における神経活動リズムを観察する予定である。

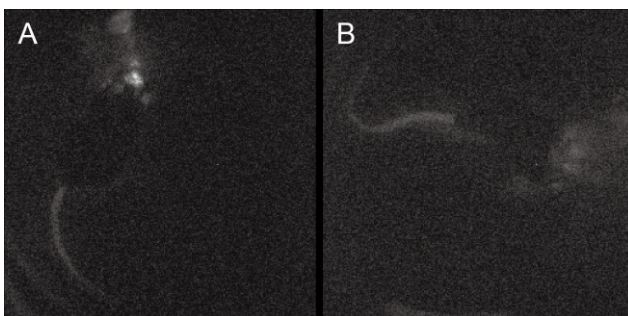


図 6. AkaLuc による脳深部イメージング

マウスの視床下部 (脳表から 5.7mm 深部) に AkaLuc を発現させた。1 週間後に基質 Alalumine 30 mM を 100 μ l 腹腔内投与し、脳内の生物発光を検出した (EM ゲイン 1000, 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、SCN から VLPO への神経投射に焦点をあててその性状解析および機能解析を行なった。その結果、SCN[→]VLPO 神経は GABA および VIP 神経で構成されており、SCN の中でも特異的な細胞集団を形成すると考えられた。さらに、一過性に神経を活性化させたさいには睡眠量が増加した。これは生体内で SCN の神経活動がマウスの休息期である昼間に上昇するという先行知見の結果と一致する。重要なことに、一過性の神経活動の誘導の効果は夜間のみ観察された。つまり、この効果には時刻依存性が存在している。また、神経連絡を阻害したところ行動リズムの減弱が観察されたが、SCN 時計そのものはコントロールマウスと比べて有意な違いは観察されなかったことから、SCN から VLPO に至る出力経路の異常が行動リズム消失に寄与していると考えられた。本研究で我々は SCN から睡眠リズムを形成する神経回路を同定した。本研究結果は、筆頭著者として論文投稿準備中である。