

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03263

研究課題名(和文) 眠気の統合センシングシステムの理解

研究課題名(英文) Understanding integrated sensing system of sleep pressure

研究代表者

Liu Qinghua (Liu, Qonghua)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・教授

研究者番号：90723792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：眠気とは何なのか？眠気の正体は未だ明らかにはされていない。我々は、眠気は脳内の特定領域・神経細胞の神経活動の変化によってコードされているという仮説を立て、その神経細胞の同定を組織科学的手法によって試みた。また、全身麻酔の意識消失に関わる脳内の特定領域・神経細胞の一部は、睡眠誘導に参与しているという仮説を立て、その神経細胞の探索を行った。さらに、眠気の正体に迫るために、食後の眠気が実験動物(マウス)でも人為的に誘発できるのかを検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眠気の正体に迫るために、活性化した神経細胞を高い時間解像度で組織科学的に可視化する手法を用いて全脳スクリーニングを行った。この手法は、様々な脳機能の研究に応用することができる可能性が考えられた。全身麻酔のメカニズムおよび食後の眠気のメカニズムの理解から、睡眠の謎に迫ろうと試みた。本研究で得られた知見は、今後の研究の基盤となりうる。

研究成果の概要(英文)：What is drowsiness? The true nature of drowsiness has not been clarified. We hypothesized that sleepiness is encoded by changes in neuronal activity in specific regions/neurons in the brain, and attempted to identify these neurons by histological methods. We also hypothesized that some of the specific regions and neurons in the brain involved in the loss of consciousness during general anesthesia are involved in sleep induction, and we searched for such neurons. To further investigate the true nature of drowsiness, we tested whether postprandial sleepiness can be artificially induced in experimental animals (mice).

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 神経細胞 神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトは眠らずにはいられない。眠気とは何なのか？眠気の正体は未だ明らかにはされていない。眠気の強弱は、睡眠の恒常性維持機構と概日リズムによって調節されていると考えられている。例えば、不眠はその時間が長くなれば長くなるほど、強烈な眠気となって襲ってくる。この現象は、睡眠の恒常性維持機構が働くことにより、不足した睡眠量を補おうとする結果である。睡眠の恒常性維持機構はどのようにして機能するのであろうか？我々は、脳内には眠気の統合センシングシステムが存在するのではないかと考えている。眠気の統合センシングシステムとは、眠気を検知し、その情報を処理、そして伝達する脳内システムである。この眠気の統合センシングシステムが睡眠の恒常性機構の一端を担っていると考えている。しかし、哺乳動物において眠気の統合センシングシステムは同定されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、眠気の正体に迫るために、眠気を視覚的および機能的に捕えることにより眠気の統合センシングシステムの理解を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. Fos catFISHによる眠気に関わる神経細胞の探索

基本的には、Ishii et al., Neuron, 2017の方法に従った。

マウスの明期開始から6時間断眠操作を行うことによって眠気を増加させ、その後、マウスの入眠を目視で確認した。睡眠開始の5-10分後に4%PFAを用いた灌流固定を行い、マウス脳を採取した。眠気に関わる神経細胞を脳全体で探索するために、40-50umの連続切片をクリオスタットで作製し、数回の洗いの後、スライドグラスに貼り付け、乾燥させた後に-80°Cで保存した。Fosのプロローブはintronとcoding RNAに対するプロローブを用いた。

### 2. 全身麻酔で活性化する神経細胞の探索

基本的には、Sakurai et al., Neuron, 2016の方法に従った。全身麻酔(1.5%イソフルラン曝露)を1.5時間以上行った後に、4%PFAを用いた灌流固定を行い、マウス脳を採取した。採取したマウス脳の脳切片は、Fosの抗体を用いて免疫染色した。

### 3. CANEシステムによる活性化した神経細胞の標識、操作

基本的には、Sakurai et al., Neuron, 2016の方法に従った。全身麻酔(1.5%イソフルラン曝露)を1.5時間以上行い、その後、標的となる脳領域の活性化した神経細胞を標識した。なお、神経活動を操作するためにCANEシステムにDREADDを応用し、全身麻酔で活性化した神経細胞を標識・操作した。

### 4. マウスにおける食後の眠気の誘発

マウスの暗期（活動期）に人為的な摂食によって睡眠が誘発できるのかを検討した（成果参照）。

#### 4. 研究成果

##### Fos catFISHによる眠気に関わる神経細胞の探索

眠気をコードする神経細胞は、断眠中から睡眠開始直後まで活動し、睡眠誘発に関わる神経細胞は、睡眠開始の前後のみで活動するという仮説を立てた。Fos の catFISH は intron-probe がサンプリングの直前（5分前程度）で活動した神経細胞を標識し、cRNA-probe がサンプリングの30分前程度に活動していた神経細胞を標識することができる。

つまり、眠気をコードする神経細胞は、intron と cRNA の両方の probe で標識され、睡眠の誘発に関わる神経細胞は intron probe のみで標識することができるのではないかと考えた。現在のところ、上記の仮説に該当するような神経細胞は同定できなかった。この結果から、次の2点の可能性が考えられる。まず、catFISH の感度の問題（Fos の発現が一過性で弱い場合、可視化できるレベルに達していない可能性がある）。次に考えられる可能性は、活性化したニューロンではなく、抑制されたニューロンが存在し、それらが眠気をコードしている（神経細胞の抑制によって眠気が増加する可能性）。

##### 全身麻酔で活性化する神経細胞の探索

全身麻酔（イソフルラン）は意識消失作用を有する。したがって、全身麻酔の意識消失に関わる神経細胞を同定すれば、その神経細胞が睡眠誘発もしくは眠気にも関与している可能性を考えた。そこで、Fos の免疫組織化学染色による全身麻酔で活性化した神経細胞の全脳での網羅的な探索を行った。Fos を発現した脳領域の中で、これまでに全身麻酔の意識消失に関与するとはほとんど着目されていない2箇所の脳領域を脳幹と視床下部で同定した。これらの脳領域の神経細胞は、全身麻酔を曝露している間、持続的に活動するのかを検証するために、全身麻酔を30分間かけたマウス脳を採取し、その薄切切片を用いて Fos の catFISH を行った。その結果、これらの脳領域で Fos を発現している神経細胞の大部分は、intron と cRNA の両方の probe で標識された。したがって、これらの神経細胞は全身麻酔中に持続的に活動していることが明らかとなった。

##### CANE システムによる活性化した神経細胞の標識、操作

前述の実験で同定した、全身麻酔で活性化する視床下部の一部と脳幹の一部の神経細胞を CANE システムを用いて標識することができるのかを検討した。その結果、どちらの脳領域でも活性化した神経細胞の標識に成功した。また、脳幹部の標識に関しては、CANE システムに DREADD を応用し、h3MDq で全身麻酔で活性化した神経細胞を標識し、マウスの活動期（暗期）に CNO 投与によってその神経細胞を人為的に活性化した。その際、脳波と筋電を測定し、睡眠解析を行った。その結果、全身麻酔で活性化する脳幹の神経細胞の一部を活性化することにより、強力に睡眠を誘発できる可能性を見出した。現在、サンプル数を増やして、結果を検証中である。

##### マウスにおける食後の眠気の誘発

我々ヒトは、食後、もしくは満腹感を得た後に眠気を感じることもあるが、その神経メカニズムの詳細は明らかにされていない。本研究では、食後の眠気のメカニズムの理解によって、眠気の正体に迫れるのではないかと考えた。しかし、マウスのような実験動物でも食事によって眠気が増加するのかは明らかにされていない。そこで、マウスに満腹感を与え、睡眠誘発ができるのかを検討した。その結果、マウスの活動期に、体重に対し一定量の餌を経口ゾンデで胃に投与することにより、睡眠が誘発できる可能性を見出した。現在、サンプル数を増やして確認中であるが、投与後、30分から1時間で睡眠を開始する。また、その際に活性化する脳領域を同定するために、Fosの全脳マッピングを行った。その結果、脳幹領域の一部で特徴的な活性化が認められたため、この領域が食後の眠気に関わっている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻井勝康
2. 発表標題 食と睡眠
3. 学会等名 日本睡眠学会第47回定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	櫻井 勝康  (Sakurai Katsuyasu)  (70507920)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授   (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------