

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～ 2011

課題番号：20590243

研究課題名(和文) 睡眠行動障害に関する生理薬理学的研究

研究課題名(英文) Pharmacophysiological study on sleep behavior disorder

研究代表者 児玉 亨 (KODAMA TOHRU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：20195746

研究成果の概要(和文)：

中脳腹側領域は GABA 細胞が豊富であり、睡眠の制御や運動に重要である。中脳腹側部の睡眠覚醒サイクルにおける GABA 量、ヒスタミン量は覚醒量と有意に正相関したがドーパミンは差がなかった。中脳腹側部のドーパミン細胞付近の破壊は不眠を、中脳-橋境界部の破壊は睡眠時の筋緊張を亢進した。また短期間のドーパミンアゴニストの投与は周期性四肢運動障害の改善を見るが、長期投与すると症状は悪化する傾向にあった。一方、パーキンソン病および過眠症状を示す症例の脳脊髄液中のオレキシン量はドーパミンよりヒスタミンとの関連が強かった。

研究成果の概要(英文)：

GABA neurons are abundant in the midbrain ventral area and are important in control of sleep and leg movement. GABA and histamine levels in the ventral midbrain significantly correlated to the amount of arousal, however, dopamine did not. The lesion of the ventral midbrain dopamine cells caused insomnia and the lesion of the ventral midbrain-pons junction increased the muscle tone during sleep. Short-term administration of dopamine agonists improved the symptom of PLMD / RLS, but, long-term treatment tended to make it worse. Amount of orexin in the cerebrospinal fluid of hypersomnia patients showed stronger correlation with histamine than with dopamine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：睡眠・覚醒

1. 研究開始当初の背景

中脳腹側領域は GABA 細胞が豊富であり、睡眠の制御や運動に重要である。われわれの予備実験でこの部位の GABA レベルが運

動の制御のみならず睡眠段階変化と関連していることが明らかになっている。ナルコレプシー症状の病因とされているオレキシンニューロンはこの GABA 領域に豊富

に興奮性投射し運動を抑える作用がある。一方、中脳にある黒質ドーパミン神経細胞の脱落が病因となるパーキンソン病では睡眠時の運動障害として75-98%のパーキンソン病患者においてレストレスレッグス症候群(RLS)、周期性四肢運動障害(PLMD)、レム睡眠行動障害(RDB)を併発すると報告されている。

さらに、オレキシニューロンの脱落がパーキンソン病の症状と相関している所見を得ている。これらの情報を鑑みるに一見関連性のないパーキンソン病とナルコレプシーだが、両者とも遺伝因子に加えて環境因子の影響により細胞変成が起こるのが誘因で一部病態を共有しているのではないかと考えられる。

解剖学的には順行性および逆行性ラベルにより、中脳腹側領域は前脳基底核・視床下部へ、そして下降性に脳幹のアセチルコリン神経核へと中脳腹側領域と睡眠発現機構と関係は比較的よく知られている。しかし、この領域の睡眠および睡眠関連運動障害に対する詳細な生理メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

研究目標 1：腹側中脳ドーパミン領域での睡眠段階に伴う神経伝達物質変化を調べる。

研究目標 2：睡眠関連運動障害に関連する神経伝達物質(特にGABAとの関係)を同定する。ラットを用いてGABA関連薬物の投与群とコントロール群で睡眠の変化・行動異常の出現頻度を比較する。

研究目標 3：脊髄液中のオレキシニン量を測定しオレキシニンシステムのパーキンソン病への関連を評価する。各種睡眠疾患患者から同意を得て採取された脊髄液サンプルバンクからパーキンソン病患者のオレキシニン量、神経伝達物質量を測定、他疾患患者と比較する。

研究目標 4：パーキンソン病とオレキシニンシステムの関係に関連遺伝子操作により調べる。パーキンソン発症関連遺伝子进行操作したマウスで行動の変化、オレキシニン合成能の違いを検討する。

3. 研究の方法

実験 1：ラットを用いた睡眠実験

ラットに睡眠段階判定用の電極とマイクロダイアリシス用のガイドカニューレを装着。術後回復を待って実験に供する。実験終了後、灌流固定。採取部位を同定する。生理的な神経伝達物質の変化は10-20%ととても小さいため、半側を目標部位に、対側を対照部位に設定した実験を行い、日内変動、睡眠深度の違いによるデータのばらつきを減らす。

睡眠段階による神経伝達物質の変化

睡眠段階記録下に5分ごとにダイアリシスサンプルを回収、冷凍保存する。オフラインで高速液体クロマトグラフィーを用いてアミノ酸、カテコールアミンを測定する。

薬物投与による睡眠時行動異常と神経伝達物質

同様に睡眠段階記録下にマイクロダイアリシスプローブを介してGABAアゴニスト、アンタゴニストを目標部位に投与、睡眠段階の変化、筋活動の変化、異常行動を調べる。同時にダイアリシスサンプルを回収し薬物投与により実験部位周辺でどのような神経伝達物質動態の変化があるか併せて調べる。

実験 2：遺伝子改変マウスの行動実験

パーキンソンモデル動物であるパエル受容体改変マウスの環境条件を変えながら行動計測する。

①食餌環境:オレキシニンの指標として食餌条件と行動との関係を調べる。

②ストレス環境:神経変成への誘因としてストレスの検討を行う。代謝ケージを用いて集めた尿中の神経伝達物質を測定する。

実験 3：各種疾患患者より合意を得て採取した脊髄液サンプルを採取、各種神経伝達物質量の測定を行う。症状の重症度データと照合し関連を調べる。

4. 研究成果

1) ラットを用いた睡眠実験

中脳腹側領域はGABA細胞が豊富であり、睡眠・運動の制御に重要である。成熟SDラットに睡眠・覚醒モニター用の脳波電極、サンプル採取用プローブを装着し睡眠時の神経伝達物質動態をマイクロダイアリシス法により検討した。さらにマイクロダイアリシスプローブを介してGABAのアゴニスト、アンタゴニストおよびオレキシニンとオレキシニンアンタゴニストを目標部位に投与、睡眠段階の変化、筋活動の変化、異常行動を調べた。

①中脳腹側領域のヒスタミン量と睡眠覚醒
成熟SDラット(n=3)を用いて睡眠覚醒変化に伴う中脳腹側領域におけるヒスタミン量を測定した。中脳腹側領域におけるヒスタミン量は覚醒と有意に正の相関があり(R=0.33, p<0.01) 徐波睡眠とは有意な負の相関があった(R=-0.36, p<0.01)。またヒスタミンは δ 、 θ 、 σ 領域の脳波と負の相関を持った(R=-0.74, -0.75, -0.72, p<0.01)。レム睡眠は中脳腹側領域におけるヒスタミン量と有意に相関しなかった。

②中脳腹側領域オレキシニン投与による睡眠

覚醒の変化

中脳腹測領域へのオレキシン-サポリン投与による破壊は不眠症状を起こした。そこでオレキシンの微量灌流が睡眠覚醒にどのような影響を及ぼすか検討した。

低容量のオレキシン灌流(36 mM, n=3)は覚醒を 19% ± 9.5% 減少させ徐波睡眠を 12.8% ± 2.3% 増加させた。高容量(72 mM, n=4)のオレキシン灌流は覚醒を 32.8% ± 14.2% 減少させ、徐波睡眠とレム睡眠をそれぞれ 12.2% ± 4.4%、58.1% ± 39.6% 増加させた。オレキシンは中脳腹測領域において睡眠促進効果を持つと考えられ、パーキンソン病における睡眠困難症状は中脳腹測領域への病変侵襲と2次的オレキシン減少によって起こっていることが示唆された。

③中脳腹測領域における GABA の役割

中脳腹測領域の外側部破壊は睡眠の減少をおこすが内側部破壊は睡眠への影響がない。また、中脳腹測領域のドーパミン細胞の減少と睡眠の減少は相関しないという結果を得た。そこで、ドーパミン以外の要因、GABA のレベルを検討した。GABA の中脳腹測領域外側におけるレベルは覚醒と有意に正相関し ($R = 0.67$, $p < 0.001$) 睡眠量と有意な負の相関を持った。 ($R = -0.67$, $p < 0.001$)。中脳腹測領域における GABA の量は覚醒時に最大 (0.051 pmol/microL) で徐波睡眠時(0.034 pmol) レム睡眠時 (0.033 pmol) より有意に高かった。GABA_A 受容体アゴニスト (muscimol) の中脳腹測領域への灌流は容量依存性に睡眠を阻害した。

2) 遺伝子改変マウスの行動実験

制限給餌を行うことで、遺伝子改変マウスでは餌の探索を早期に諦めるため行動が抑制された。ドーパミン減少によるオレキシン量の変化が原因と考えられたが有意な違いには至らなかった。

代謝ケージを用いて集めた尿中 GSH/GSSG, 8OH-dG を測定したがストレスによりパーキンソンモデルで有意に神経変成を起こすという結果は得られなかった。

3) 各種疾患患者の脊髄液サンプル中のオレキシン量とヒスタミン量

睡眠専門学術誌 Sleep(2009)32:181-7 に報告した。ヒスタミン分析からオレキシン低下が見られるナルコレプシーだけでなく、オレキシンレベルの比較的高い突発性過眠症でもヒスタミンレベルが下がっている事がわかった。この結果から過眠症状とより強く関連するのがヒスタミンである事が示唆され、パーキンソンでもヒスタミン量と視床下部ヒスタミン細胞の保全を調べる必要性が示唆された。そこでパーキンソン症例の脊髄液中

オレキシン、ヒスタミン、ドーパミン、ノルエピネフリンなどの神経伝達物質を測定、検討したところオレキシンとヒスタミンの間に弱い相関が観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Honda, Y., Kodama, T., Tanaka, I., Tokuno, H., Usui, S. Photic environments affect development of circadian rhythms in common marmosets., *J. Sleep Research* 19 (2010) 185 (査読あり)
2. Lai, Y.-Y., Kodama, T., Schenkel, E., Siegel, J.M Behavioral response and transmitter release during atonia elicited by medial medullary stimulation, *J. Neurophysiol.* 104 (2010) 2024-33 (査読あり)
3. Kanbayashi T, Kodama T 他 6 名 Csf Histamine Contents in Narcolepsy, Idiopathic Hypersomnia and Obstructive sleep Apnea syndrome. *Sleep* 32 (2009) 181-187. (査読あり)
4. Soya, A., Song, Y.H., Kodama, T., Honda, Y., Fujiki, N., Nishino, S. CSF histamine levels in rats reflect the central histamine neurotransmission. *Neuroscience Letters*, 430, (2008), 224-229 (査読あり)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 26 件)

1. Suppression of muscle tone by the medulla: distinct roles of nucleus gigantocellularis and magnocellularis Kodama, T., Lai, Y.-Y., Siegel, J. M. 40th Neurosciences 2010-11-14 San Diego
2. コモン・マーモセットの視覚弁別学習に対する発育期光環境の影響
田中いく子、徳野博信、守屋敬子、本多芳子、児玉亨、臼井節夫
第 17 回日本時間生物学会学術大会 2010-11-21 東京
3. 恒常明および恒常暗におけるコモン・マーモセット概日リズムの発達
臼井節夫、本多芳子、児玉亨、田中いく子、徳野博信
第 35 回日本睡眠学会学術大会 2010-07-02 名古屋
4. 非接触ストレスフリー生理・行動計測による客観的・精神疾患診断法の提案-モデル動物と臨床をつなぐ試み
小柴麻美子、油井邦夫、山内秀雄、田中いく子、本多芳子、児玉亨、徳野博信、臼井節夫、石橋英俊、青木伊知男、田中聡久、田中あか

ね、松田浩珍、中村俊
Neuro 2010-09-03 神戸
5. Differential activity of monkey anterior cingulate neurons depending on the rival's identity and animacy during competitive games.
Kuwait, M., Hosokawa, T., Kodama, T., Watanabe, M.
Society for Neuroscience 2010-11-17
San Diego, California, USA
6. Photic environments affect development of circadian rhythms in common marmosets.
Honda, Y., Kodama, T., Tanaka, I., Tokuno, H., Usui, S.
20th Meeting of the European Sleep Research Society 2010-09-16 Lisbon, Portugal
7. ラット視床下部におけるオレキシン mRNA の日内変動パターン
田中進、児玉亨、本多芳子、臼井節夫、本多真
34th 日本睡眠学会 2009-10-25 大阪
8. GABA release from the substantia nigra pars reticulata and pedunclopontine tegmental nucleus is facilitated by orexin.
Koyama, Y., Takahashi, K., Honda, Y., Kodama, T.
The 6th Congress of Asian Sleep Research Society 2009-10-26 Osaka
9. 様々な疾患におけるヒスタミン値の測定
伊藤若子、神林崇、児玉亨、細川敬輔、菊池結花、林由理子、清水和美、藍澤里香、千葉茂、清水徹男
34th JSSR 2009-10-26 大阪
10. 恒常明あるいは恒常暗で育てられたコモン・マーマセット行動リズムの発達
臼井節夫、本多芳子、児玉亨、田中いく子、徳野博信
日本睡眠学会第 34 回定期学術集会／第 6 回アジア睡眠学会／第 16 回日本時間生物学会学術大会合同大会 2009-10-27 大阪
11. 生育時環境誘導多動モデル（ラット）へのリタリンの効果
児玉亨、本多芳子、渡邊正孝、臼井節夫
日本睡眠学会第 34 回定期学術集会／第 6 回アジア睡眠学会／第 16 回日本時間生物学会学術大会合同大会 2009-10-26 大阪
12. Orexin facilitates GABA release from the substantia nigra pars reticulata to the pedunclopontine tegmental nucleus that regulates muscle tonus.
Takahashi, T., Kodama, T., Honda, Y., Koyama, Y.
Neuroscience2009 2009-10-18 Chicago
13. Role of GABAergic mechanism in the

lateral substantia nigra in sleep regulation.
Kodama, T., Hsieh, K.-C., Nguyen, D., Siegel, J. M., Lai, Y.-Y.
Neuroscience2009 2009-10-18 Chicago
14. D5 dopamine receptor is involved in the functional modification of dopamine transporter.
林崎 誠二、平井 志伸、伊東 由美、本多芳子、有銘 預世布、曾良 一郎、児玉亨、岡戸晴生、高田 昌彦
Neuroscience2009 2009-09-18 名古屋
15. A novel behavioral and endocrinological analysis with PCA for examining the development of social mind in primates.
杉浦 寧、三村 喬生、望月 大二郎、徳野 博信、臼井 節夫、田中 いく子、本多 芳子、児玉 亨、石橋 英俊、中村 俊、小柴 満美子
Neuroscience2009 2009-09-18 名古屋
16. Behavioral patterns related to social interaction with peers in developing marmosets.
妹尾 綾、三村 喬生、岩渕 奈穂子、石崎美由紀、望月 大二郎、徳野 博信、臼井 節夫、田中 いく子、本多 芳子、児玉 亨、石橋 英俊、中村 俊、小柴 満美子
Neuroscience2009 2009-09-18 名古屋
17. Peer-social response in 4 juvenile marmosets represented the emotional development traits depending on family structure.
清水 航記、三村 喬生、白川 由佳、石橋 英俊、田中 いく子、本多 芳子、臼井 節夫、児玉 亨、徳野 博信、中村 俊、小柴 満美子
Neuroscience2009 2009-09-18 名古屋
18. Role of the substantia nigra in the control of sleep and motor activity in sleep
Lai, Y.-Y., Nguyen, D., Hsieh, K., Kodama, T., Siegel, J. APSS 2009-06-09 Seattle
Photic environments in early life affects emotional development in common marmosets.
奥谷 晃久、臼井 節夫、田中 いく子、本多 芳子、鈴木 美穂、田島 広景、山崎和行、池田 正太、岩渕 奈穂子、石崎美由紀、望月 大二郎、中村 俊、小柴 満美子、徳野 博信、児玉 亨
Neuroscience2009 2009-09-18 名古屋
19. IGFBP3 蛋白のラット脳室内投与による、オレキシン神経細胞の変化
深沢みゆき、児玉亨、本多芳子、Mignot, E.、本多真
第 33 回日本睡眠学会定期学術会議
2008-06-25 福島
20. Increase in glutamate and reduction GABA level in the histaminergic posterior hypothalamus region promotes waking.

John, J, Kodama, T., Siegel, JM.
SFN 38th Annual Meeting
2008-11-17 Washington, DC
21. 海洋性哺乳類の半球睡眠に関する神経伝達物質
Kodama, T., Lapierre, JL., Kosenko, PO., Lyamin, OI., Mukhametov, LM., Siegel, JM.
第33回日本睡眠学会定期学術会議
2008-06-25 福島
22. 筋緊張維持経路における上位中枢としての橋抑制野の延髄への制御
Kodama, T., Honda, Y., Siegel, JM., Lai, YY. 第33回日本睡眠学会定期学術会議
2008-06-25 福島
23. 生育時における長期メチルフェニデート投与による脳内ドーパミン変化
児玉亨、本多芳子、桑波田卓、渡邊正孝、臼井節夫
第33回日本睡眠学会定期学術会議
2008-06-25 福島
24. メチルフェニデートによるサル認知課題遂行時の注意集中レベル変化
桑波田卓、児玉亨、本多芳子、渡邊正孝 第33回日本睡眠学会定期学術会議 2008-06-25 福島
25. 生育期のメチルフェニデート長期連続投与による行動変化(2)
児玉亨、本多芳子、渡邊正孝、臼井節夫
第33回日本睡眠学会定期学術会議
2008-06-25 福島
26. 生育時の光環境によるコモン・マーモセットの行動リズムの変化
臼井節夫、本多芳子、児玉亨、田中いく子、徳野博信 第33回日本睡眠学会定期学術会議 2008-06-26 福島
27. 3種類の光環境下でのコモン・マーモセット行動リズムの発達
臼井節夫、本多芳子、児玉亨、田中いく子、徳野博信
第15回日本時間生物学会学術大会
2008-11-09 岡山市

[図書] (計3件)

1) 睡眠・覚醒調節とアミノ酸・ペプチド
児玉亨 睡眠学 朝倉書店
2009 88-97
2) 脳内活性物質の測定法
児玉亨 睡眠学 朝倉書店
2009 309-313
3) 神経活動の時系列解析と睡眠研究への応用
児玉亨 睡眠学
2009 318-324

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
児玉 亨 (KODAMA TOHRU)
財団法人医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
研究者番号：20195746

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし