

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03353

研究課題名（和文）脳幹に広がる新規な神経ネットワークの同定により明らかにする睡眠構築の意義

研究課題名（英文）Elucidation of the function of the sleep architecture based on the identification of novel brainstem neuronal circuits

研究代表者

林 悠（HAYASHI, Yu）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：40525812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、我々がマウスにおいて同定した脳幹の睡眠構築を制御する神経回路を人為的に操作することで、長期的に睡眠構築に介入した際に、脳機能に生じる影響や、その分子メカニズムの解明に取り組んできた。その結果、睡眠構築を操作したマウスでは様々な行動の異常がみられることや、大脳皮質・海馬の遺伝子発現の異常があることが判明した。さらに、睡眠構築を制御するニューロンの作動原理の解明を進めた結果、レム睡眠やノンレム睡眠をコントロールするニューロン群が複数同定され、睡眠構築への介入がもたらす様々な作用の神経基盤の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠構築は、疾患や発達障害、さらには睡眠薬の影響を大きく受ける。こうした長期的な睡眠構築の異常がもたらす影響についてはよくわかっていない。ヒトでの前向きな調査研究では、睡眠構築の特徴によっては、認知症を発症するリスクや様々な要因で死亡するリスクが高まることが近年報告されたが、因果関係は明らかでない。本研究で私たちはマウスにおいて、最新の神経科学ツールを用いて睡眠構築に介入することで、様々な影響が生じることを見出した。これらの知見は、一部の動物で複雑に進化した睡眠構築という謎多い生理現象の意義を理解する重要な手掛かりを与えるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have been working to elucidate the effects of intervening the sleep architecture for long periods on brain functions and their molecular mechanisms in mice. To this end, we chronically manipulated the neural circuits that control sleep architecture. As a result, we found that mice in which sleep architecture was manipulated show various behavioral abnormalities and that there are abnormalities in gene expression in the cerebral cortex and hippocampus. In addition, as a result of further clarification of the operating principles of neurons that control sleep architecture, several groups of neurons that control REM and non-REM sleep have been identified, revealing part of the neural basis for the various effects of interventions on sleep architecture.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠

1. 研究開始当初の背景

睡眠構築 (sleep architecture) とは、二種類の睡眠、レム (急速眼球運動) 睡眠とノンレム睡眠が、一晩の間に交互に現れるパターンを指す言葉である。睡眠構築は、疾患や発達障害、さらには睡眠薬の影響を大きく受ける。こうした長期的な睡眠構築の異常がもたらす影響についてはよくわかっていない。ヒトでの前向きな調査研究では、睡眠構築の特徴によっては、認知症を発症するリスクや様々な要因で死亡するリスクが高まることが近年報告されたが、因果関係は明らかでない。私たちはこれまで、睡眠構築を一時的に操作できるマウスを作出したことで、睡眠構築の制御機構や、周期的に出現するレム睡眠の意義の解明に取り組んできた。一方、疾患や発達障害のように、睡眠構築の異常が長期にわたって続く場合に、脳機能に及ぼす影響は依然不明である。睡眠は強い homeostatic な制御を受ける上、補償機能が多く備わっているため、急性の実験で得られた発見が、慢性的な状況下で当てはまらないことがしばしばある。したがって、睡眠構築の長期的な変化が脳に及ぼす影響を解明することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、私たちが睡眠構築制御を司る脳幹の神経ネットワークの解明を進める中で、新たに樹立した、一過的ではなく、生涯にわたって、睡眠構築のパターンが大きく変化したマウスを用いることで、正常な睡眠構築が脳機能に果たす役割を明らかにすることを目指した。その際、分子レベルから神経回路レベル・行動レベルまで解析を行い、睡眠構築の重要性を解明するとともに、睡眠構築を生み出す神経回路の動作原理の解明も目指した。

3. 研究の方法

私たちはこれまでに、ノンレム睡眠とレム睡眠のバランスを制御する神経回路の同定と解析を進めてきた。例えば、脳幹の SubLDT (sublaterodorsal tegmentum) のレム睡眠を抑制するグルタミン酸作動性ニューロン群や、dDpMe (dorsal deep mesencephalic nucleus) のレム睡眠を抑制する GABA 作動性ニューロン群を同定した (Hayashi et al., Science 350:957, 2015)。さらに、こうしたニューロンの分子マーカーや投射先などの解明を進めていく過程で、遺伝子にコードされる神経毒を活用することで、レム睡眠とノンレム睡眠のバランスが長期的に変動したマウスも作出することに成功した (Kashiwagi et al., Current Biology, 30:1002, 2020; Liu et al., 未発表)。こうしたマウスが示す表現型は、睡眠構築の意義を解明する上で、重要な手掛かりを与えるものと期待される。そこで、これらのマウスの表現型を行動レベル、細胞レベル、遺伝子レベルのあらゆる階層で解析した。行動レベルでは、行動テストバッテリーに当該マウスをかけた。さらに、分子レベルでは、大脳皮質や海馬など、複数の脳部位において、朝敵に睡眠構築が異常となったマウスと、対照マウスの遺伝子発現レベルを RNA-sequencing により比較した。さらに、細胞レベルでの解析を進めるために、RNA-sequencing のデータ解析を進め、どの細胞種が特に大きな影響を受けたかを解析した。

また、我々がこれまでに同定した睡眠構築制御細胞の作動原理を進める過程で、新たに同定したレム睡眠の量を制御するニューロン群について、これらのニューロン群がどのようなメカニズムにより睡眠構築をコントロールするかを解析した。これらの細胞群は、脳に広く投射しており、それぞれの投射が果たす役割を検討した。そのために、これらの細胞に特異的に蛍光タンパ

ク質を発現させて、投射先を網羅的に調べた。さらに、同定された投射先について、化学遺伝学ツールを用いることで、どの投射先が睡眠構築の制御に関わっているかを検証した。一方、ニューロンの操作のみならず、自然な睡眠覚醒リズムの中での、これらのニューロンの活動様式の解明にも取り組んだ。そのためには、c-Fos、Ca⁺⁺イメージング、電気生理学的手法などを用いた。電気生理学的手法を用いた細胞種特異的な活動記録の際には、光感受性受容体である Channelrhodopsin-2 を Cre 依存的に睡眠構築制御ニューロンに発現させ、光刺激に対する応答により当該ニューロンを同定した。電気生理学的な記録は、ガラス電極を用いたユニットレコーディングで行った。この手法は、長時間の活動は困難なものの、時間分解能よく1細胞の活動を正確に記録できた。

4. 研究成果

まず、睡眠構築を長期的に操作したマウスを行動テストバッテリーにかけた結果、当該マウスでは、様々な行動に異常があることが判明した。これらの行動への影響の少なくとも一部は、睡眠構築の異常がもたらしたと考えられる。しかしながら、当該ニューロンが持つ別の生理的な作用を介したものである可能性も残る。これらの可能性を区別するために、光遺伝学を用いて特定の睡眠状態のときにのみ、特定の脳部位の活動に（睡眠構築そのものを変化させることなく）介入することの影響の解析にも着手した。

続いて、睡眠構築が長期的に異常となったマウスと対照マウスの大脳皮質や海馬などの total RNA を得て、RNA-sequencing を実施して遺伝子発現パターンを比較した。その結果、レム睡眠を長期的に減少したマウスと、増加したマウスとで、逆方向に発現量が変動した遺伝子を複数同定することに成功した。これらの遺伝子は、睡眠構築の機能解明につながる重要な遺伝子であると期待される。さらに、こうした候補遺伝子について、免疫組織染色などによってさらに検討を進めた結果、複数の候補遺伝子が同一の細胞種に発現することを見出した。この細胞種は、睡眠構築を長期的に操作したマウスにおいて数などに変化が生じていることも明らかとなった。したがって、この細胞種については、レム睡眠の機能と深く関わる可能性が期待される。

また、睡眠構築制御ニューロンの動作原理については、もともと同定していたニューロン群の投射先や投射元のニューロンを探索する過程において、新たに睡眠構築制御に関わるニューロンを同定することにも成功した。一部のレム睡眠促進細胞について、光遺伝学的手法によって、投射先に特異的な操作を行ったところ、特定の投射先を操作した際にレム睡眠の量の大幅な変化が生じたことから、重要な投射先候補領域を見出すことに成功した。さらに、投射先のニューロンそのものを、化学遺伝学ツールを用いて阻害した際に、同時に、投射先の部位のニューロンを別の化学遺伝学ツールによって同時に抑制した際の影響を調べた。すると、操作を実施した投射先の部位によっては、誘導されるレム睡眠の量または質に影響が生じることが示唆された。これらの結果は、睡眠構築を支配する脳幹の神経ネットワークの動作原理の解明につながるものと期待される。また、自然な睡眠覚醒サイクルでの睡眠構築制御ニューロンの活動様式の計測を進めた結果、特定の睡眠状態のときに活動するニューロンが多く検出された。この結果は、これらのニューロンが睡眠構築を制御するメカニズムの解明のみならず、睡眠構築の人為的な操作を施したマウスの表現型を解釈する上でも重要な知見であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kawano Taizo, Kashiwagi Mitsuaki, Kanuka Mika, Chen Chung-Kuan, Yasugaki Shinnosuke, Hatori Sena, Miyazaki Shinichi, Tanaka Kaeko, Fujita Hidetoshi, Nakajima Toshiro, Yanagisawa Masashi, Nakagawa Yoshimi, Hayashi Yu	4. 巻 42
2. 論文標題 ER proteostasis regulators cell-non-autonomously control sleep	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112267 ~ 112267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasugaki Shinnosuke, Okamura Hibiki, Kaneko Ami, Hayashi Yu	4. 巻 -
2. 論文標題 Bidirectional relationship between sleep and depression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2023.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamura Hibiki, Yasugaki Shinnosuke, Suzuki-Abe Haruka, Arai Yoshifumi, Sakurai Katsuyasu, Yanagisawa Masashi, Takizawa Hotaka, Hayashi Yu	4. 巻 9
2. 論文標題 Long-Term Effects of Repeated Social Defeat Stress on Brain Activity during Social Interaction in BALB/c Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0068-22.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi Mitsuaki, Kanuka Mika, Tanaka Kaeko, Fujita Masayo, Nakai Ayaka, Tatsuzawa Chika, Kobayashi Kazuto, Ikeda Kazutaka, Hayashi Yu	4. 巻 14
2. 論文標題 Impaired wakefulness and rapid eye movement sleep in dopamine-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00879-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsai Chia-Jung, Nagata Takeshi, Liu Chih-Yao, Suganuma Takaya, Kanda Takeshi, Miyazaki Takehiro, Liu Kai, Saitoh Tsuyoshi, Nagase Hiroshi, Lazarus Michael, Vogt Kaspar E., Yanagisawa Masashi, Hayashi Yu	4. 巻 36
2. 論文標題 Cerebral capillary blood flow upsurge during REM sleep is mediated by A2a receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109558 ~ 109558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi Mitsuaki, Kanuka Mika, Tanaka Kaeko, Fujita Masayo, Nakai Ayaka, Tatsuzawa Chika, Kobayashi Kazuto, Ikeda Kazutaka, Hayashi Yu	4. 巻 14
2. 論文標題 Impaired wakefulness and rapid eye movement sleep in dopamine-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00879-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakai Ayaka, Fujiyama Tomoyuki, Nagata Nanae, Kashiwagi Mitsuaki, Ikkyu Aya, Takagi Marina, Tatsuzawa Chika, Tanaka Kaeko, Kakizaki Miyo, Kanuka Mika, Kawano Taizo, Mizuno Seiya, Sugiyama Fumihito, Takahashi Satoru, Funato Hiromasa, Sakurai Takeshi, Yanagisawa Masashi, Hayashi Yu	4. 巻 216
2. 論文標題 Sleep Architecture in Mice Is Shaped by the Transcription Factor AP-2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 753 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/genetics.120.303435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Chih-Yao, Tsai Chia-Jung, Yasugaki Shinnosuke, Nagata Nanae, Morita Miho, Isotani Ayako, Yanagisawa Masashi, Hayashi Yu	4. 巻 165
2. 論文標題 Copine-7 is required for REM sleep regulation following cage change or water immersion and restraint stress in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 14 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maezono Sakura Eri B., Kanuka Mika, Tatsuzawa Chika, Morita Miho, Kawano Taizo, Kashiwagi Mitsuaki, Nondhalee Pimpimon, Sakaguchi Masanori, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Hayashi Yu	4. 巻 7
2. 論文標題 Progressive Changes in Sleep and Its Relations to Amyloid- Distribution and Learning in Single App Knock-In Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0093 ~ 20. 2020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0093-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林 悠
2. 発表標題 Genetic and imaging approaches to elucidate the roles of REM sleep
3. 学会等名 記憶研究会2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 悠
2. 発表標題 睡眠に注目した新規な脳恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 悠
2. 発表標題 レム睡眠の意義とメカニズム ~ マウスの遺伝学・イメージングからのアプローチ ~
3. 学会等名 第71回 日本薬理学会北部会次世代薬理学セミナー2020 in 仙台 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 悠
2. 発表標題 Crucial roles for REM sleep in maintaining brain homeostasis as revealed from genetic and imaging approaches
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020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

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