

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21456

研究課題名（和文）脳の脈管系の機能の制御におけるレム睡眠の役割の解明

研究課題名（英文）The roles of sleep in the regulation of the the vascular system of the brain

研究代表者

林 悠（Hayashi, Yu）

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・客員教授

研究者番号：40525812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：レム睡眠（急速眼球運動睡眠）の役割はよく分かっていない。本研究では、脳の脈管系に注目したアプローチから、レム睡眠の未知の作用の発見に挑んだ。睡眠中のマウスの脳内微小環境を観察する技術を確立したことで、レム睡眠中に大脳皮質の毛細血管の血流が、様々な領域において覚醒時の約2倍にも上昇すること、そして、この血流上昇にはアデノシン受容体A2Aが必要であることを見出した。さらに、特定の疾患のマウスモデルではこの血流上昇が大きく損なわれることも見出した。また、レム睡眠中に起こる血流上昇について、老廃物除去に重要な役割を担う可能性を検証するための実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の毛細血管血流は自動調節の機構により安定的なレベルに維持されると考えられているが、我々の研究から、レム睡眠中は他の睡眠覚醒状態とは大きく異なることが判明した。神経細胞の平均発火頻度は覚醒時とレム睡眠とで同程度であることから、neurovascular couplingとは異なる何らかの機構が働くと考えられる。レム睡眠の異常は様々な精神・神経疾患で見られる。本研究結果は、レム睡眠の異常がこうした疾患の悪化に寄与する可能性を示唆する。従って、異常なレム睡眠を補正する治療は睡眠障害のみならず、精神神経疾患の予防治療の観点からも重要であると考えられ、そうした視点をもたらした点において有意義である。

研究成果の概要（英文）：The role of REM (rapid eye movement) sleep is not well understood. In this study, we attempted to uncover effects of REM sleep from approaches focusing on the vascular system of the brain. By establishing a technique to observe the microenvironment in the brain of sleeping mice, we found that during REM sleep, capillary blood flow in the cerebral cortex increases approximately twice as much as during wakefulness in various regions, and that the adenosine receptor A2A is required for this increase in blood flow. We also found that this blood flow elevation is greatly impaired in mouse models of certain diseases. In addition, we established an experimental system to test the possibility that the blood flow elevation that occurs during REM sleep may play an important role in the removal of waste products.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 毛細血管 脳血流

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の睡眠はレム睡眠とノンレム睡眠から構成される。ノンレム睡眠中は、成長ホルモン分泌の増加 (Takahashi et al., J Clin Invest 47:2079, 1968) や、グリンパティックシステムの活性化 (Xie et al., Science 342:373, 2013) など、様々な変化が起こり、恒常性維持・新陳代謝に貢献する。一方、対照的にレム睡眠に関しては、その機能はほとんど何も分かっていなかった。脳血流は、神経細胞に酸素や栄養を届けるとともに、不要な老廃物を回収する役割を担う。脳血流は正常な神経機能に必須であり、その制御異常はアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症・進行に寄与する (Sweeney et al., Nat Neurosci 21:1318, 2018)。私たちは、脳血流とレム睡眠の關係に着目した。これまで、睡眠・覚醒に伴う脳血流のダイナミクスを解明するために、様々なアプローチ (ポジトロン断層法、機能的核磁気共鳴画像法やドップラー超音波等) がとられてきた。その結果、手法ごとに相反する結論が出されてきた (Braun et al., Brain 120: 1173, 1997; Zoccoli et al., Sleep Med Rev 6:443, 2002; Bergel et al., Nat Commun 9:5364, 2018)。これは、手法ごとのデータ処理・正規化の手順の違いや観測される血管の種類の違いから生じた可能性が高い。そこで私たちは、血液と神経細胞の間の物質交換の場である毛細血管を流れる赤血球を、二光子励起顕微鏡を用いて直接観測する技術の確立に取り組んだ。その結果、観察した大脳皮質のすべての領野において、頭頂葉の毛細血管の赤血球の流速を観察した結果、レム睡眠中の顕著な上昇が見られた。同様の傾向が、視覚野や体性感覚野など、観察した全ての領野で見られた。私たち自身による本発見を元に、本研究では、これまでレム睡眠との關係性が注目されてこなかった脈管系に注目した。

2. 研究の目的

レム睡眠の役割はよく分かっていない。これまでの研究の多くは、神経活動やシナプス可塑性など、神経細胞に注目したものであった。本研究では、脳の脈管系に注目したアプローチから、レム睡眠の未知の作用の発見に挑む。私たちはこれまでに、レム睡眠中に大脳の毛細血管の血流が、その他の状態と比べて大幅に上昇することを明らかにした。この発見を踏まえ、本研究では、このレム睡眠中の急激な血流上昇が、どのようなメカニズムによってもたらされるのか、および脈管系に対してどのような作用を及ぼすかの解明を目指した。

3. 研究の方法

慢性頭蓋窓は、以前の報告 (Holtmaat ら、2009 年) に従って作られた。成体マウス (2-3 ヶ月齢) をイソフルランで麻酔し (導入は 3%-5%、維持は 2%-2.5%)、脳定位固定装置に設置した。体温はヒーティングパッドを用いて 32-35 度に維持した。歯科用ドリル等を用いて頭頂皮質上の円形領域を開頭した。ガラス製カバースリップを硬膜上に置き、シアノアクリレート接着剤で密封した。EEG 電極 (ステンレス製スクリュー) を大脳皮質 (開頭した反対側の半球および小脳にそれぞれ硬膜外から埋め込んだ)。EMG 電極はテフロン加工されたステンレス製ワイヤーを両側から縫工筋に挿入し、両端をハンダ付けして固定した。最後に、長方形のアルミニウム製ヘッドプレートを頭蓋骨に置き、歯科用セメントで取り付けた。

正立二光子励起顕微鏡上での観察は、以前の報告 (Miyazaki ら、2020) に従って実施した。手術を終えたマウスの環境への馴化のため、頭部を固定した状態で、1日3時間、少なくとも

も7日間、馴化処置を施した。血漿を可視化するために、FITC-dextran を観察の数時間前に静脈注射した。

4. 研究成果

まず、我々が発見した睡眠中におこる急激な大脳皮質毛細血管の血流の上昇のメカニズムに関して研究を進めた。これまでに、睡眠中の大脳皮質血流の急激な上昇がアデノシン A2A 受容体遺伝子のノックアウトマウスでは起こらないことを発見した。また、断眠によって生じるリバウンド睡眠の際には、皮質血流のさらなる顕著な上昇が起こることも判明したが、そのような条件下でも上述のノックアウトマウスでは皮質血流上昇が起きないことも見出した。さらに、A2A 受容体に対するアゴニストを用いた薬理学的実験では、アゴニスト投与直後に脳血流が上昇すること、しかも、その作用が上述のノックアウトマウスでは失われていることを見出した。このことから、アデノシン A2A 受容体遺伝子のノックアウトマウスで見られた血流の異常が、発生過程での異常に起因するものではない可能性が高まった。従って、睡眠中に、A2A 受容体のリガンド分子の細胞外の濃度が上昇し、それが血流上昇のトリガーとなっている可能性が明らかとなった。また、大脳皮質の血流上昇に関与する細胞種の特定に成功した。この細胞種を遺伝学的に破壊したところ、大脳皮質のレム睡眠中の血流上昇が大きく減少した。なお、これまでに得られていた研究成果の一部について、国際的な科学誌で発表した (Tsai et al., Cell Reports, 2021)。

本研究では、我々が発見した睡眠中におこる急激な大脳皮質毛細血管の血流の上昇が、どのような生理的な役割を担っているのかの解明にも取り組んだ。生理的な役割の解明へ向け、脳の間質液中の老廃物のクリアランスに重要であると考えられているグリアリンパ系に注目した。グリアリンパ系は脳の血管周囲腔などを経て老廃物を間質から除去している。レム睡眠中の大脳皮質の毛細血管血流の顕著な上昇には、毛細血管の上流にある動脈の拍動が関与している可能性が高い。この血管の拍動が血液のみならず、血管に隣接する血管周囲腔などの液体の流れもレム睡眠中に活性化していると考えた。そこで、無麻酔下で脳の血管周囲腔の液体の流れを可視化する方法を確立した。具体的には、脳血管の血漿をラベルして可視化した状態で、大脳皮質の毛細血管を局所的に破壊し、血管周囲腔に色素を漏洩させ、その部位で蛍光強度の減衰の速さから、クリアランスの速さを推定した。また、特定の疾患のモデルマウスでも大脳皮質のレム睡眠中の血流上昇が大きく減少していることを見出した。この疾患においてはレム睡眠中に本来起こる大脳皮質の毛細血管血流の上昇が起こらないことが、脳機能の低下をもたらしている可能性が生じた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 7件）

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 該当する
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 0
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 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 0
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 Yamazaki Risa, Toda Hirofumi, Libourel Paul-Antoine, Hayashi Yu, Vogt Kaspar E., Sakurai Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Evolutionary Origin of Distinct NREM and REM Sleep	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpsyg.2020.567618	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 該当する

1. 著者名 Lazarus Michael, Hayashi Yu, Honjoh Sakiko, Vogt Kaspar E., Eban-Rothschild Ada, Liu Qinghua, Sakurai Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Editorial: The Gating and Maintenance of Sleep and Wake: New Circuits and Insights	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00773	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Miyazaki Shinichi, Leproux Philippe, Couderc Vincent, Hayashi Yu, Kano Hideaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Multimodal nonlinear optical imaging ofCaenorhabditis eleganswith multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering, third-harmonic generation, second-harmonic generation, and two-photon excitation fluorescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Physics Express	6. 最初と最後の頁 072002 ~ 072002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1882-0786/ab9711	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 該当する

1. 著者名 Kashiwagi Mitsuaki, Hayashi Yu	4. 巻 15
2. 論文標題 The existence of two states of sleep as a common trait in various animals and its molecular and neuronal mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Physiology	6. 最初と最後の頁 197 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cophys.2020.03.007	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 -

1. 著者名 Tsai Chia-Jung, Liu Chih-Yao, Lazarus Michael, Hayashi Yu	4. 巻 18
2. 論文標題 Sleep architecture of adenosine A2A receptor-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sleep and Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 275 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s41105-020-00260-2	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 -

〔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〕

Researchmap https://researchmap.jp/h-z-k
--

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
---------	---------