

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：74415

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500313

研究課題名（和文）アデノシンによる睡眠調節機構

研究課題名（英文）Sleep-wake regulation by adenosine

研究代表者

黄 志力（Huang, Zhi-Li）

財団法人 大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究副部長

研究者番号：10321704

研究成果の概要（和文）：

アデノシン受容体 (receptor, R) は、 A_1R 、 $A_{2A}R$ 、 $A_{2B}R$ と A_3R に分類され、その中で、 A_1R と $A_{2A}R$ が、睡眠の調節に関与することが報告されている。 A_1R の活性化は、コリン性の前脳基底核やヒスタミン性の結節乳頭核、オレキシン神経を抑制し、睡眠を誘発することは広く知られている。我々はノルアドレナリン性の青斑核 (locus coeruleus, LC) に選択的 A_1R 作用薬である N^6 -シクロペンチルアデノシン (CPA) を局所投与すると睡眠が誘発されることを発見した。一方、LC に選択的 A_1R 拮抗薬である 1,3-ジメチル-8-シクロペンチルキサンチン (CPT) を局所投与すると、覚醒が促進される。そして、免疫組織染色を行うと、LC 内に A_1R が大量に発現することが認められた。これらの結果は、 A_1R の活性化が、睡眠を増強し、 A_1R が生理的睡眠の調節に関与していることを示している。しかし、 A_1R 作動薬の脳内投与では、睡眠/覚醒に対する明らかな効果は認められないので、睡眠中枢の腹側外側視索前野 (VLPO) の A_1R を活性化すると、睡眠神経が阻害され、睡眠量が減少するのではないかと仮説を立てた。そこで、選択的 A_1R 作用薬である CPA をラットの VLPO 内へ微小注入したところ、自発的な睡眠覚醒中および 6 時間断眠後の回復睡眠中におけるノンレム (non-REM, NREM) 睡眠とレム睡眠の両方の顕著な減少が認められた。CPA を野生型マウスの VLPO 内に局所投与した場合も、ラットと同様の結果を得た。しかし、 A_1R 欠損マウスの場合には、覚醒は全く認められなかった。一方、選択的 A_1R 拮抗薬である CPT をラットの VLPO 内に微小注入するとノンレム睡眠とレム睡眠が両方とも増加した。さらに、免疫組織化学染色の結果、 A_1R が VLPO 内に僅かに発現することが判明した。これは、アデノシンが VLPO の A_1R を介して睡眠覚醒の自発的及び恒常的制御に関与することを証明した最初の研究である。この研究結果は、従来の A_1R が睡眠を誘発するという通説を覆し、VLPO の A_1R は覚醒の維持に関与することを証明した結果である。従って、 A_1R による睡眠調節はアデノシン作用部位により異なり、それぞれ睡眠と覚醒を個別に誘発することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Adenosine is a critical endogenous sleep-promoting substance involved in the regulation of sleep. Among the four subtypes of adenosine receptors, A_1 receptor (A_1R) and/or $A_{2A}R$ subtypes have been reported to mediate the sleep-promoting effect of adenosine. Several lines of evidence suggest that adenosine acts via A_1R at the wake-promoting areas of cholinergic basal forebrain, histaminergic tuberomammillary nucleus, and/or orexinergic lateral hypothalamus to promote sleep. However, systemic or intracerebroventricular administration of an A_1R agonist has no clear effects on sleep promotion. Thus, we

hypothesized that activation of A₁R in some brain regions may inhibit sleep. The ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) has been considered to be a critical region for sleep induction. Our study found that activation of A₁R in the VLPO inhibited sleep and promoted wakefulness, while blockade of A₁R increased non-rapid movement (non-REM, NREM) and REM sleep and brief awakening (<16 s), with the occurrence of sleep fragmentation, indicating that A₁R in the VLPO is involved in the maintenance of physiological wakefulness. When rats were subjected to sleep deprivation, activation of A₁R in rat VLPO reduced NREM and REM sleep during recovery period, increased the latency to NREM and REM sleep, and decreased delta power spectrum of NREM sleep. These results clearly indicate that A₁R in the VLPO is involved in the regulation of spontaneous sleep-wake cycle and sleep homeostasis. Immunohistochemistry staining and RT-PCR revealed that there is an expression of A₁R in the VLPO. These results clearly indicate that A₁R in the VLPO is involved in the regulation of spontaneous sleep-wake cycle and sleep homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：アデノシン、睡眠、遺伝子操作、マウス、ラット、アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

様々な薬理実験や行動実験の結果から、アデノシンは、内因性の睡眠物質であると考えられてきた。例えば、ラットやネコ、その他の実験動物にアデノシンやその安定誘導体を投与すると、睡眠が引き起こされる。ネコを用いた実験では、皮質や前脳基底核の細胞外アデノシン濃度が断眠中に増加し、断眠後の回復期に減少した。CNS に出現する 4 種類のアデノシン受容体 (A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃ 受容体) のうち、A₁ と A_{2A} の両方かいずれか一方がアデノシンの睡眠誘発効果を仲介すると報告

されている。A_{2A} 受容体の睡眠誘発における役割は十分に立証されているが、A₁ 受容体の睡眠調節における役割に関しては未だ議論の余地がある。

アデノシン A₁ 受容体の刺激は、前脳基底核 (BF)、脳弓周囲から視床下部外側野、結節乳頭核に分布するコリン作動性神経の覚醒系を阻止することで睡眠を引き起こすと提唱された。しかし、マウスの側脳室へ A₁ 受容体の作動薬を注入してもノンレム睡眠量とレム睡眠量に変化はなく、ラットの体内あるいは脳室内へ A₁ 受容体の作動薬を投与して

も同様であった。従って、我々は、睡眠誘発部位における A_1 受容体の刺激は睡眠を阻害する可能性があるとして仮説を立てた。腹側外側視索前野 (VLPO) は睡眠のプロセスで重要な部分とされる。そこで我々は、自発的な睡眠覚醒調節、および睡眠恒常性における VLPO の A_1 受容体の役割について調査を行った。

2. 研究の目的

生理的な恒常性睡眠調節におけるアデノシンの重要性を明らかにするために、我々は電気生理学、薬理学、神経化学、解剖学、マイクロアレイ、および我々が独自に保持している A_1 , A_2 受容体遺伝子操作マウスや RNAi 遺伝子欠損などの学際的なアプローチを利用した。本研究の成果は、複雑な睡眠恒常性の調節機構の理解を深めるための重要で直接的な証拠を提示し、将来の研究展開への重要な足がかりとなることが期待される。

3. 研究の方法

睡眠中枢と考えられる腹側外側視索前野 (VLPO) は睡眠調節に重要な部分である。そこで本研究では、自発的な睡眠覚醒調節と睡眠の恒常性維持における VLPO の A_1 受容体の役割を調査するために、学際的なアプローチを用いた。アデノシン A_1 受容体の作動薬と拮抗薬を VLPO へ局所投与し、ベースラインと断眠後の睡眠覚醒ステージを判定するために脳波と筋電位を同時に記録した。 A_1 受容体の作動薬あるいは拮抗薬の特異性を判定するために、 A_1 受容体欠損マウスを使用した。

4. 研究成果

選択的 A_1 受容体作用薬である CPA をラットの VLPO 内へ微小注入すると、自発的な睡眠覚醒中及び 6 時間断眠後の回復睡眠中におけるノンレム (non-REM, NREM) 睡眠とレム睡眠の両方の顕著な減少が認められた。CPA を野生型マウスの VLPO 内に局所投与すると、ラットの場合と同様の結果を得た。しかし、 A_1 受容体欠損マウスの場合には、覚醒は全く認められなかった。一方、選択的 A_1 受容体拮抗薬である CPT をラットの VLPO 内に微小注入するとノンレム睡眠とレム睡眠が両方とも増加した。免疫組織化学染色の結果、 A_1 受容体が VLPO 内に僅かに発現することが判明した。これは、アデノシンが VLPO の A_1 受容体を介して睡眠覚醒の自発的及び恒常的制御に関与することを示した最初の研究成果である。

この研究結果は、従来の A_1 受容体が睡眠を誘発するという通説を覆し、VLPO の A_1 受容体は覚醒の維持に関与することを証明した結果である。従って、 A_1 受容体の睡眠調節への関与は、アデノシンの作用部位に応じて異なり、それぞれ部位特異的に睡眠と覚醒を誘発する。本研究では、ラットの VLPO に A_1 受容体があり、それが活性化すると覚醒が促進し、阻害されると睡眠が引き起こることが明らかとなった。このことは、VLPO の A_1 受容体が生理状態の覚醒の維持や睡眠の恒常性調節に関わっていることを明瞭に示している。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Huang ZL, Urade Y and Hayaishi O, The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr Top Med Chem*, 査読有 2011, 11(8):1047-57. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401496>
- ② Lazarus M, Shen HY, Cherasse Y, Qu WM, Huang ZL, Bass C, Winsky-Sommerer R, Semba K, Fredholm B, Boison D, Hayaishi O, Urade Y, Chen JF. Arousal effect of caffeine depends on adenosine A_{2A} receptors in the shell of the nucleus accumbens, *J Neurosci*, 査読有 2011, 31(27):10067–10075. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6730-10.2011
- ③ Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Matsumoto N, Huang ZL, Goda Y, Urade Y. Effects of synthetic cannabinoids on electroencephalogram power spectra in rats. *Forensic Sci Int*. 査読有 2012 Feb 10;215(1-3):179-183. DOI: 10.1016/j.forsciint.2011.05.005
- ④ Masaki M, Aritake K, Tanaka H, Shoyama Y, Huang ZL, Urade Y. Crocin promotes non-rapid eye movement sleep in mice. *Mol Nutr Food Res*. 査読有 2012 Feb;56(2):304-308. DOI: 10.1002/mnfr.201100181
- ⑤ Chen CR, Tan R, Qu WM, Wu Z, Wang Y, Urade Y, Huang ZL. Magnolol, a major bioactive constituent of the bark of *Magnolia officinalis*, exerts anti-epileptic effects via GABA-benzodiazepine receptor complex in mice, *Br J Pharmacol*, 査読有 2011, 164(5):1534-46. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01456.x
- ⑥ Yan MM, Xu XH, Huang ZL, Yao MH, Urade Y, Qu WM. Selection of optimal epoch duration in assessment of rodent sleep-wake profiles. *Sleep Biol Rhythm*, 査読有 2011; 9: 46-55. DOI: 10.1111/j.1479-8425.2010.00484.x
- ⑦ Huang ZL, Urade Y and Hayaishi, Key roles of the histaminergic system in sleep-wake regulation. *Sleep Biol Rhythm*, 査読有 2011, 9 (Suppl. 1): 34–37. DOI: 10.1111/j.1479-8425.2010.00471.x
- ⑧ Qu WM, Xu XH, Yan MM, Wang YQ, Urade Y, Huang ZL. Essential role of dopamine D₂ receptor in the maintenance of wakefulness, but not in homeostatic regulation of sleep, in mice. *J Neurosci*, 査読有 2010, 30(12):4382-4389. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4936-09.2010

[学会発表] (計 5 件)

- ① Z.-L. Huang, W.-M. Qu, Yoshihiro Urade (2011) Dopamine D2 receptors in the basal ganglia are essential in the maintenance of wakefulness. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, July 13-18 2011, Florence, Italy
- ② Zhi-Li Huang, Wei-Min Qu, Yoshihiro Urade, Osamu Hayaishi (2011) Key roles of the histaminergic system for the somnogenic effect of prostaglandin D2 and adenosine. Worldsleap 2011, Oct. 16-20, Kyoto, Japan
- ③ Zhi-Li Hung, Wei-Min Qu, Yoshihiro Urade, (2010) Roles of histaminergic systems in sleep-wake regulation, 2010 Beijing international sleep medicine forum, Apr.18, Beijing, China

④ 黄 志力、曲 衛敏、松本直実、裏出良博 (2010) Key role of dopamine D₂ receptor in the maintenance of wakefulness, but not in homeostatic regulation of sleep, in mice、日本睡眠学会第 35 回定期学術集会、7 月 1 日 - 2 日、名古屋

⑤ Zhi-Li Huang, Wei-Min Que, Yoshihiro Urade₂(2009) Dopaminergic D₁ and D₂ receptors play a key role in the arousal effect of modafinil, 9th World Congress on Sleep Apnea, March 28, Seoul, Korea

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称：自立神経調節剤

発明者：裏出良博、黄 志力、他 6 名

権利者：月桂冠株式会社

種類：特許

番号：特願 2009-288305

出願年月日：2009 年 12 月 18 日

国内外の別：国内

名称：睡眠改善薬

発明者：裏出良博、黄 志力、他 3 名

権利者：株式会社クレイ沖縄

種類：特許

番号：特願 2010-62620

出願年月日：2010 年 3 月 18 日

国内外の別：国内

名称：睡眠改善剤および鎮静剤ならびにそれらの使用

発明者：裏出良博、黄 志力、他 5 名

権利者：大阪バイオサイエンス研究所

種類：特許

番号：特願 2010-118339

出願年月日：2010 年 5 月 24 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obi-dept2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黄 志力 (Huang, Zhi-Li)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究副部長

研究者番号：10321704

(2) 研究分担者

裏出 良博 (Yoshihiro Urade)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究部長

研究者番号：10201360