

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640025

研究課題名(和文)代謝疾患メカニズム解明に向けた、慢性的睡眠不足モデルマウスの開発

研究課題名(英文)Development of a mouse model of chronic sleep loss to elucidate the mechanism of metabolic disorder

研究代表者

高田 陽子 (Takata, Yohko)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号：60435740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、睡眠覚醒調節システムとエネルギー代謝システムの関連性の解明に貢献できる慢性的睡眠不足モデルマウスを開発することを主目的とした。

脳の一部を特異的に損傷させることで、少なくとも1ヶ月、持続的に睡眠量が40%以上減少するマウスを偶然に見出した。慢性的に短眠状態を示すこのマウスをモデルマウスとし、摂餌量と体重を定期的に測定した。モデルマウスの摂餌量は対照群と比べて多く、また体重は施術から3週目に増加し始めた。本研究課題で作製した慢性的睡眠不足モデルマウスが、短眠とエネルギー代謝の関連性を研究する上で有用な動物であることが期待できる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a mouse model of chronic sleep loss to elucidate the relationship between sleep-wake regulatory system and energy metabolism. We found that lesions of specific brain areas led to sleep reduction in mice, resulting in remarkably short sleep. Their sleep time was 40% or more shorter than the control group for at least one month. When we monitored food intake and body weight of the mouse with reduced sleep, we found that their food intake was larger than that of the control group. Moreover, the body weight of the lesioned mice increased from the third week after surgery. Our newly developed mouse model of chronic sleep loss may be useful to study the effect of reduced sleep on energy metabolism.

研究分野：神経科学

キーワード：慢性的短眠 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

睡眠不足は代謝やホルモン調節に悪影響を与え、糖尿病や心臓病など生活習慣病のリスクが高まる。睡眠不足と代謝異常の関連性を示すデータが蓄積される一方、慢性的不眠症状を示す適切な動物モデルが存在しないため、メカニズムの詳細は分かっていない。

我々は、動物の脳波を基にした睡眠判定システムや、ウイルスベクターを用いて部位特異的に遺伝子を欠失させる Cre/loxP 技術や RNA 干渉技術などを開発し、自由行動下の動物を対象にシステムレベルの睡眠研究を行い、アデノシンおよびアデノシン A2A 受容体 (A2AR) が睡眠覚醒調節に果たす役割を証明してきた。さらに、薬理遺伝学的手法 (DREADD; 後述) を用いたマウス側坐核内の A2AR 陽性神経の神経活動操作の結果、Gq-DREADD による神経活動活性化が睡眠量を増加させ、Gi-DREADD による神経活動抑制が睡眠量を減少させることを見出した (未発表)。特定の神経活動の抑制による睡眠量の減少は現在まで報告がない。また、64% におよぶ睡眠量の減少は極めて顕著である (一日 8 時間の睡眠時間が約 3 時間へ減少した状況に相当)。側坐核の神経活動操作により、慢性的睡眠不足モデルマウスを作出できると我々は考える。

2. 研究の目的

本申請課題は、慢性的睡眠不足が肥満や心疾患リスクを高める代謝調節崩壊を惹き起こすメカニズム解明の第一歩として、側坐核の神経活動操作により慢性的睡眠不足モデルマウスを作製する。そして、作製したモデルマウスの摂餌量や体重、代謝に関連する血液成分の変化を長期記録し、睡眠覚醒系が各代謝系に与える影響を解析し、ヒトを対象とした研究結果と比較する。

3. 研究の方法

(1) 慢性的睡眠不足モデルマウスの作製

① イベルメクチンによる睡眠阻害処置

抗生物質イベルメクチンは、無脊椎動物のみが持つグルタミン酸依存性塩化物イオンチャネル (GluCl) に結合し、塩化物イオン (Cl-) を細胞内に流入させて細胞膜を過分極に導くことが報告されている (図 1)。すなわち脳内標的部位に GluCl を発現させ、イベルメクチンを作用させることにより、任意の神経活動の抑制が可能となる。本研究では、

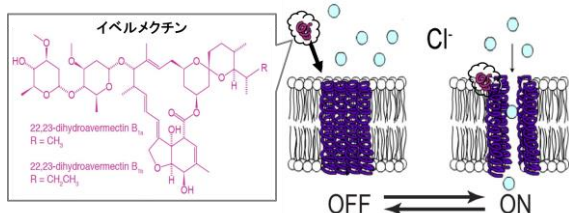


図1. イベルメクチン依存性塩素チャンネル

アデノ随伴ウイルスを用いて GluCl を A2ARp-Cre マウスの側坐核に導入し、FLEX システムによって Cre 依存的に発現させる。その後、イベルメクチンを投与して側坐核の A2AR 神経を特異的に抑制させ、睡眠の阻害を行う。

② 脳波を利用した断眠装置による睡眠阻害処置

イベルメクチンによる側坐核 A2AR 神経の阻害が慢性的睡眠不足モデルマウスの作出に不十分だった場合、物理的刺激による断眠装置を利用し、長期間の断眠を試みる。具体的には、マウスの頭部に脳波測定用電極を設置し、断眠装置付きケージで飼育する。マウスの脳波は電極、ケーブルを介して睡眠判定システムに送られ、脳波のパターンを基に睡眠・覚醒ステージがリアルタイムで自動判定される。睡眠と判定されるとケージが振動し、マウスの睡眠を阻害する。

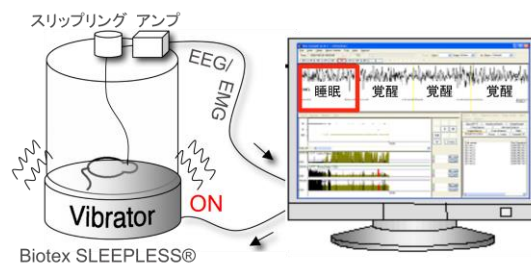


図2. 睡眠脳波解析による自動断眠システム

(2) 脳波をもとに、最適な慢性的睡眠不足モデルマウスを判定

睡眠測定チャンバー内で、(1)で作製した慢性的睡眠不足マウスの脳波・筋電位・行動量を測定し、睡眠解析する。モデルマウスの睡眠量や睡眠の質 (睡眠脳波を構成する周波数分布から判定) を睡眠阻害処置中と処置前とで比較し、慢性的に不眠症状を示すマウスを判定する。

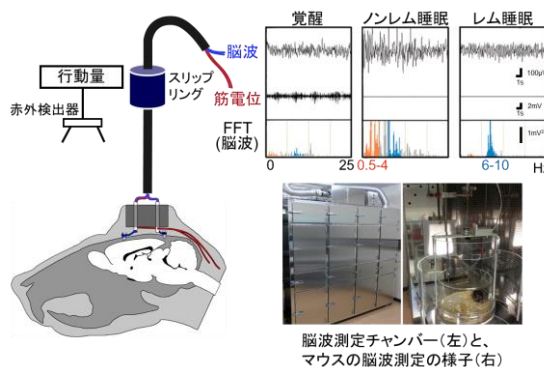


図3. マウスの睡眠測定システム

(3) 慢性的睡眠不足モデルマウスの摂餌量と体重を長期測定

(2)で選択したモデルマウスの摂餌量と体重を4~6ヶ月連続して測定し、慢性的睡眠不足が摂餌量と体重へ及ぼす影響を調べる。用量依存性を調べるため、異なる用量の薬剤を投与する3群を試験群とする。対照群にはvehicleを投与する。自動断眠装置を使用する場合には、試験群に対しては異なる強度もしくは頻度で断眠を行い、対照群に対しては断眠を行わない。また、A2ARp-Creマウスの対照群として野生型マウスにも同様の試験をおこなう。

4. 研究成果

(1)-① イベルメクチンによる睡眠阻害処置

睡眠覚醒調節に重要な役割をなうことが示唆されている、大脳基底核の一部、側坐核のアデノシン A2A 受容体神経をイベルメクチンによって特異的に抑制させて睡眠を阻害する処置をしたマウスの脳波を測定し、睡眠解析を行った。睡眠量の減少は見られたが、慢性的睡眠不足といえる状態には至らなかった。

(1)-② 脳波を利用した断眠装置による睡眠阻害処置

脳波を利用した自動断眠装置による断眠を試みたが、物理的刺激にマウスが慣れてしまい、十分な睡眠阻害ができなかった。

(1)-③ 脳の部位特異的損傷処置による睡眠阻害の発見

別の研究を進める中で、脳の一部を特異的に損傷させることで、睡眠量が著しく少ないマウスができることを見出した(図4)。

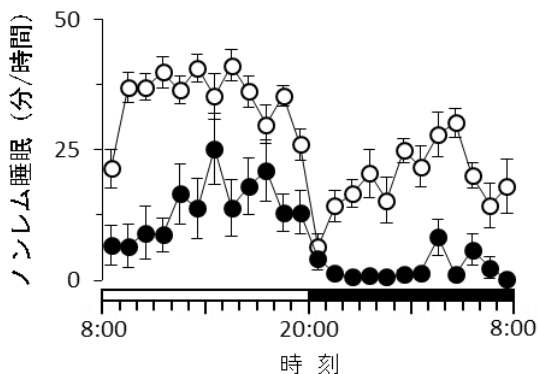


図4. 睡眠不足モデルマウスのノンレム睡眠量の経時変化。  
○: 対照群 (n=8), ●: 睡眠不足モデルマウス (n=10), □: 明期, ■: 暗期。

(2) 脳波をもとに、最適な慢性的睡眠不足モデルマウスを判定

(1)-③のマウスについて、施術から1週間毎に4週間後までの睡眠量を調査した。その結果、1日当りのノンレム睡眠量は、対照群と比べて、処置から1週間後では64%、2~

4週間後では45%程少なかった(図5)。少なくとも1ヶ月、ノンレム睡眠量が40%以上少ない状態が続くことから、このマウスを慢性低睡眠不足モデルマウスとした。

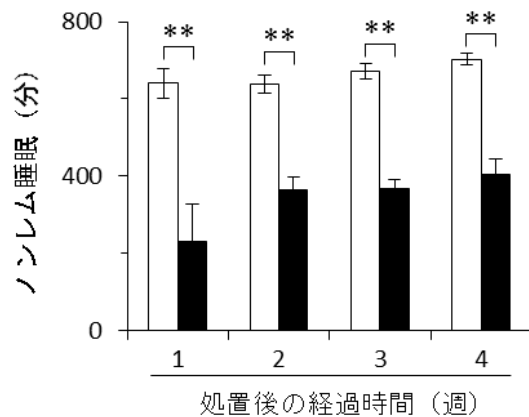


図5. 睡眠不足モデルマウスの24時間当たりのノンレム睡眠量。□: 対照群, ■: 睡眠不足モデルマウス, n=4, \*\*P<0.01.

(3) 慢性的睡眠不足モデルマウスの摂餌量と体重を長期測定

慢性的に短眠状態を示すこのマウスをモデルマウスとし、摂餌量と体重を定期的に測定した。

モデルマウスの摂餌量は施術から2週目で増加傾向を示し、3週目と4週目で対照群と比べて有意に多かった(図6)。

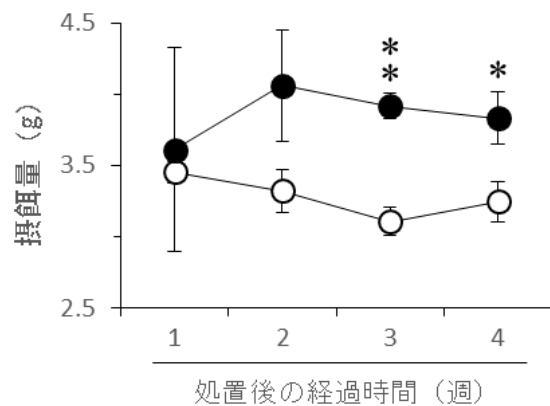


図6. 睡眠不足モデルマウスの摂餌量の変化。  
○: 対照群 (n=4), ●: 睡眠不足モデルマウス (n=3), \*P<0.05, \*\*P<0.01.

一方、モデルマウスの体重は、施術後2週目までは減少を続けたが、3週目から増加し始めた(図7)。但し、本モデルマウスの体重は、対照群と比べ、施術後1週目から4週目まで有意に少なかった。

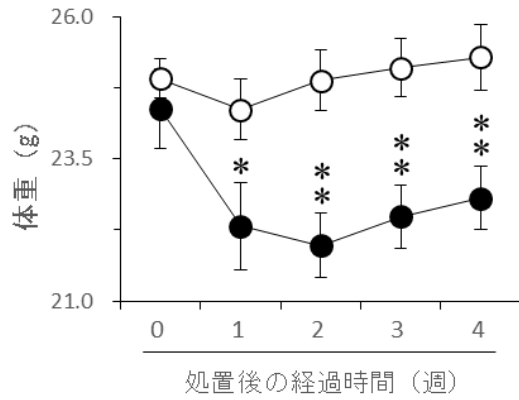


図7. 睡眠不足モデルマウスの体重の変化.

○: 対照群 (n=9), ●: 睡眠不足モデルマウス (n=8), \*P<0.05, \*\*P<0.01.

本研究課題の期間中に研究施設の移設があったため、体重と摂餌量の長期測定はできなかったが、作製した慢性的睡眠不足モデルマウスが、短眠とエネルギー代謝の関連性を研究する上で有用な動物であることが期待できる結果が得られた。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田 陽子 (TAKATA, Yohko)  
 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・  
 研究員  
 研究者番号: 60435740

### (2) 研究分担者

ラザルス ミハエル (LAZARUS, Michael)  
 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・  
 准教授  
 研究者番号: 80469650