

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830002

研究課題名(和文) 大脳皮質アデノシン系による局所睡眠の制御

研究課題名(英文) Regulation of local sleep by cortical adenosine

研究代表者

大山 薫(OHYAMA, Kaoru)

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：30713044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：徐波は睡眠欲求の指標と考えられているが、その発生メカニズムは不明である。本研究では自由行動下のマウスを用いて、覚醒・睡眠時の大脳皮質の細胞外電位の測定を行い、徐波発生時とそれ以外(覚醒)の状態において神経活動が単一細胞レベルおよびネットワークレベルでどのような様態を示すのかを調べた。徐波睡眠では神経細胞は同期したりリズム的な活動を示すこと、興奮性細胞ではバースト発火率の増加が見られたが抑制性細胞では変化がなかった。しかし神経ネットワークレベルでは、覚醒時と比べ徐波睡眠ではネットワークが弱くなっており、逆に細胞内カルシウム流入量は大きく、覚醒時とノンレム睡眠時で大脳皮質の活動様態が大きく異なる。

研究成果の概要(英文)：Slow wave sleep is an indicator of sleep need, which mechanism has not yet been uncovered. We investigated single-unit activity of cortex from freely behaving mice to understand how neuronal activity and network of neurons change across waking and slow wave sleep. Activity of neurons showed rhythmic and synchronized activity during slow wave sleep and more bursting for excitatory neurons. In spite of the synchronicity, network of neurons was weaker in slow wave sleep than in waking. Combination of calcium imaging and modeling of unit activity showed that burst of neurons increase influx of calcium into cells. These results suggest that unit activity in cortex could be a good evaluation for calcium activity in cortex.

研究分野：神経生理学 睡眠

キーワード：睡眠 マウス 電気生理 徐波

1. 研究開始当初の背景

覚醒レベルは脳波を用いて測定することができる。覚醒レベルの低下により脳波の周波数は遅くなる。また、睡眠の大部分を占めるノンレム睡眠では徐波と呼ばれる遅い波が現れる。徐波を制御する脳内メカニズムの一つとして、大脳皮質アデノシンによる神経ネットワークの修飾が考えられる。遺伝子改変マウスにおける脳波の測定実験(Bjornessら,2009,未発表)により、アストロサイト・ニューロン間のアデノシン系が徐波を制御することが報告された。一方、ラットを用いた電気生理学実験(Vyazovskiyら, Nature, 2011)では、徐波が発生するノンレム睡眠時に局所のニューロン集団が同期した活動(OFF ピリオド)を示すことが報告された。これらの研究は、アストロサイト・ニューロン間のアデノシン系が神経活動を修飾することで、徐波を制御していることを間接的に示唆しているが、直接の証拠はない。さらに、ニューロン集団の活動様式の変化は分かっているが、神経ネットワークレベルでの制御様態は不明である。上記の点を明らかにするためには、徐波発生時の神経活動をアデノシン制御により操作できる実験動物の系を用いて、神経ネットワークレベルでの解析を行う実験系が必要であると考えられる。これを解決するために、マウスにおいて、in vivoでの複数の単一ニューロン活動の同時記録と分子遺伝学を組み合わせた実験系を確立し、ノンレム睡眠時の大脳皮質局所の神経ネットワークを明らかにすることにした。

2. 研究の目的

睡眠覚醒サイクルは脳表脳波の測定により判別され、ノンレム睡眠時は大脳皮質全体の活動の同期性が一様に高まり、脳が休んでいる状態と考えられてきた。しかしラットの覚醒・睡眠時における多数の皮質ニューロン活動の同時記録により、ノンレム睡眠時に前頭葉局所のニューロン群が一斉に数百ミリ秒間発火が停止する期間(OFF ピリオド)とそれに伴う局所徐波の発生の存在が明らかになった(Vyazovskiyら, Nature, 2011)。また、ノンレム睡眠時の大脳皮質の神経細胞の活動は実際には活発であり(Steriade et al., 2001)、ON ピリオドの発火頻度は覚醒時とほぼ変わらない。本研究では、覚醒時とノンレム睡眠時で大脳皮質神経細胞の単一ニューロン発火およびニューロンのネットワークの変化を調べること、ノンレム睡眠時の大脳皮質の役割を検証した。

3. 研究の方法

(1)マウスとデータの取得

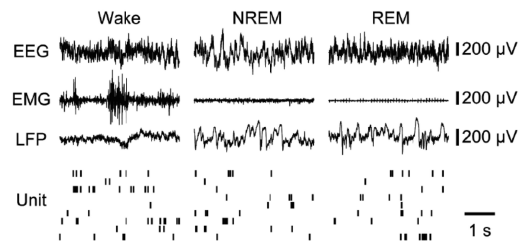
テトロード電極を用いて自由行動下のマウス7匹の大脳皮質第一次運動野から単一神経活動を記録した。同時に脳波記録用のネジ電極および筋電図も記録した。

(2)解析方法

覚醒、ノンレム睡眠の判定は脳波のスペクトル解析を行い、徐波のパワーが大きく筋電が小さい期間をノンレム睡眠、徐波のパワーが小さく筋電が大きい期間を覚醒とした。シータ派がでており筋電の小さい期間は解析から除いた。テトロード電極を用いて記録した細胞外電位はスパイクソーティングを行いMATLABを用いて解析した。

4. 研究成果

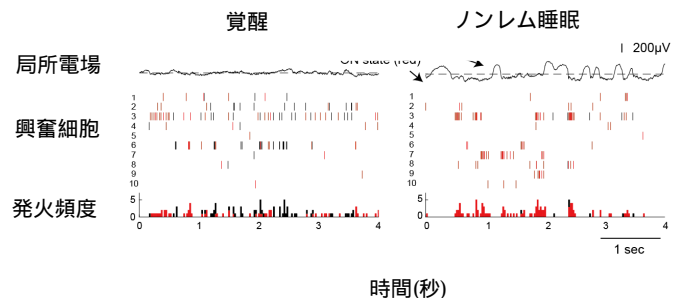
(1)自由行動下のマウスから覚醒・睡眠時の脳波、筋電、局所電場、細胞外電場を記録する方法を確立した(図1、5、雑誌論文1に該当)。



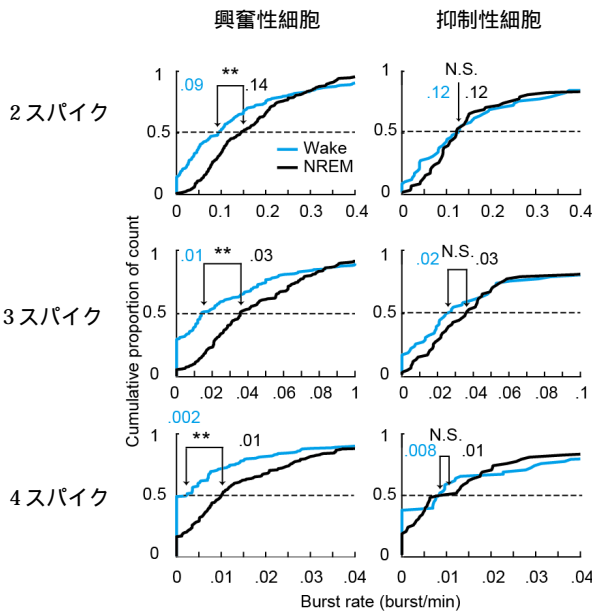
(図1) Kandaら、Neuroscience Research, in pressより改訂

覚醒(WAKE)時には速く小さい振幅の脳波(EEG)と、大きい筋電(EMG)が観察された。ノンレム睡眠時には遅く振幅の大きい徐波と呼ばれる波がEEGに観察された。レム睡眠ではEEGのシータ派に加えレムアトニアと呼ばれる筋肉の弛緩が見られた。

(2)ノンレム睡眠時は、神経活動の発火パターンがリズムミクになる(図2)。さらに覚醒時と比較するとバースト発火の割合が増加していた。バースト発火の増加は興奮性細胞のみで見られ、抑制性細胞ではバースト発火の割合に覚醒、ノンレム睡眠で差がなかった。(図3)

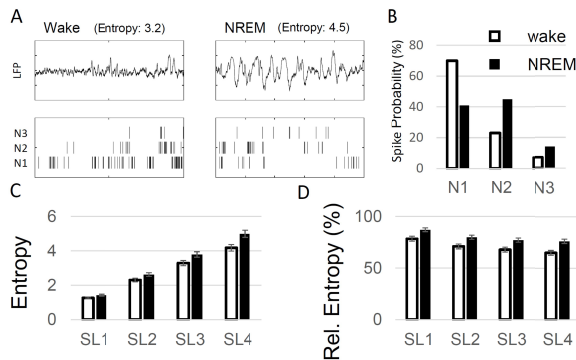


(図2)



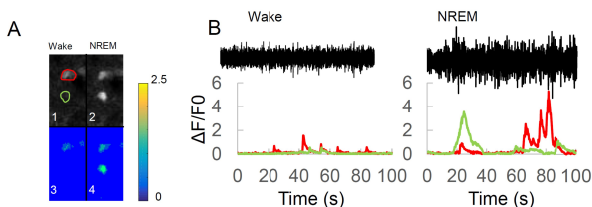
(図 3)

(3) ノンレム睡眠時の大脳皮質神経細胞のネットワークは、覚醒時と比べるとネットワークが弱くなっていることを明らかにした(図 4)。

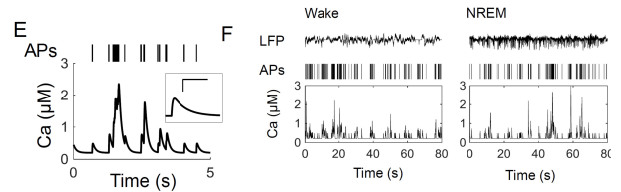


(図 4)

(4) ON 発火による細胞内カルシウム流入のモデルを行うと、細胞内カルシウム流入量はノンレム睡眠のほうが覚醒時より大きかった(図 5)。同機構の共同研究員らの実験により、カルシウムイメージングを用いた細胞内カルシウム量はノンレム睡眠のほうが覚醒時よりも大きく、スパイク発火によるモデルと一致した(図 6)。



(図 5)



(図 6)

(5) 本研究結果により、大脳皮質の神経活動が覚醒・ノンレム睡眠でダイナミックに変わること、トニックでランダムな覚醒時の活動から、ノンレム睡眠では同期したりリズム的な活動にその活動パターンを変えることを示した。エントロピーを用いた解析により、ニューロンネットワークはむしろノンレム睡眠では弱くなっていた。しかし、細胞内カルシウム量の流入はノンレム睡眠で増加しており、スパイク発火パターンがカルシウム流入量の指標として用いることが可能であることを示した。本研究成果を国際学術雑誌へ投稿するために準備を行っている。

(6) 本研究で明らかになったニューロンネットワークの変化は、覚醒時には大脳皮質が情報処理を行っており、ノンレム睡眠時にはその情報処理の負荷から開放されていると推察できる。これを明らかにするために、今後はマウスが運動課題を行っている最中と運動課題後の睡眠時の神経活動を調べることを予定している。また、睡眠による運動課題の学習と神経活動の関係にアデノシンがどのように影響しているのかも並行して調べることを予定している。

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 1 件)

1. Takeshi Kanda, Kaoru Ohyama, Hiroki Muramoto, Nami Kitajima, Hiroshi Sekiya, Promising techniques to illuminate neuromodulatory control of the cerebral cortex in sleeping and waking states, Neuroscience Research, 査読有り, in press, DOI: 10.1016/j.neures.2017.04.009

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

大山 薫 (OHYAMA, Kaoru)
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：30713044