

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06520

研究課題名(和文)レム睡眠P波発生メカニズムの電気生理学的探究

研究課題名(英文)Elucidation of generating mechanism of P-waves during REM sleep

研究代表者

常松 友美 (Tsunematsu, Tomomi)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：80726539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、何故眠るのか？睡眠は、生存に必須の本能行動のひとつと考えられているが、なぜ、睡眠が必要なのかは、実は、解明されていない。特に、夢を見ているとされるレム(急速眼球運動)睡眠の機能は、未だ、明らかにされていない。本研究では、レム睡眠の機能を解明するため、その足がかりとして、レム睡眠時に特徴的に観察される局所フィールド電位であるP波に着目し、P波発生メカニズムを電気生理学的に詳細に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は人生のおよそ3分の1の時間を眠って過ごす。睡眠を知り、より良い睡眠をとることは、人生の3分の1の質を上げるだけではない。睡眠不足が日常生活のパフォーマンスを落とすことから、より良い睡眠のおかげで、起きている生活もより豊かになる。しかしながら、睡眠の意義のみならず、睡眠を惹起するメカニズムも依然分かっていない点が多い。本研究では、睡眠のうち、夢を見ているレム睡眠時の脳幹の神経活動を明らかにした。さらに、ノンレム睡眠とレム睡眠では、脳内の情報伝達の方向が逆向きになることを示唆する結果を得た。本研究は、睡眠の機能にも迫る結果を得ており、睡眠の意義を明らかにしていく可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Why we have to sleep? Surprisingly, nobody knows the answer exactly so far although sleep is an absolutely essential instinctive behavior to maintain normal health in animals. In particular, the function of REM (rapid eye movement) sleep, which is considered to be dreaming, has not been clarified yet. In this study, the generation mechanism of P-wave, which are local field potentials that are characteristically observed during REM sleep, was analyzed in detail electrophysiologically to ultimately intend to elucidate the physiological function of REM sleep.

研究分野：睡眠脳科学

キーワード：睡眠 レム睡眠 P波 ノンレム睡眠 脳幹

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は乳類の睡眠覚醒ステージは、レム睡眠とノンレム睡眠からなる。1日8時間の睡眠をとると仮定すると、我々は実に生涯の3分の1もの時間を眠って過ごすことになる。睡眠は、本能行動のひとつであるにも関わらず、「何のために眠るのか?」「何故夢を見るのか?」、という多くの根本的な問いに的確に回答することは未だ難しい。海馬や大脳皮質等の神経活動を記録したこれまでの報告から、ノンレム (NREM) 睡眠は記憶の定着に重要であるとする知見が蓄積されてきている。一方、夢を見ているとされるレム (REM) 睡眠の生理的意義は、実は、ほとんど分かっていないのが現状である。

レム睡眠時には、五感からの入力完全に遮断されているにも関わらず、覚醒時と同様に、脳の電氣的活動が脱同期しており、休息のためのいわゆる「睡眠」とは一線を画している、風変わりな脳状態である。近年、光遺伝学や化学遺伝学的手法を用いることで、睡眠覚醒ステージを制御する神経回路やメカニズムが、急速に明らかになってきており、レム睡眠を制御する神経核も解明されつつある。これらの神経核のほとんどが、脳幹に局在していることが明らかになり、したがって、脳幹はレム睡眠の制御に重要な役割を果たしていることが予想される。さらに、脳幹では、レム睡眠中に観察される特徴的な脳波が存在する。脳幹の一部である橋 (Pons) で発生する Ponto-Geniculo-Occipital (PGO) 波である。PGO 波は、ネコで発見され、およそ 100 ミリ秒のスパイク状の波形をしている。当初、同様の波形が外側膝状体 (Lateral Geniculate Nucleus) や後頭葉 (Occipital Cortex) でも記録されたことから、PGO 波と命名された。その後、ラットでも報告されたのだが、橋でのみ観察されるため、げっ歯類では P 波と呼ばれている。マウスでは、P 波の測定に成功した例は皆無に等しく、これまで、マウスには P 波は存在しないとすら考えられてきている。

2. 研究の目的

本研究は、レム睡眠の生理的意義の解明を究極的な学術的「問い」とする。そのために、

- 1) マウスにおける P 波の検出
- 2) P 波発生メカニズムの電気生理学的解析
- 3) P 波を中心とした睡眠覚醒における脳幹神経アンサンブルダイナミクスの記録、及び解析を目的とした。

3. 研究の方法

1) マウスでの P 波の測定

イソフルラン麻酔下で野生型マウス (C57BL/6、オス) に対して手術を行った。皮質脳波測定用ネジ電極 2 本とグラウンド用ネジ電極 1 本を頭蓋骨に埋め込み、筋電位測定用多芯ワイヤー 2 本を首の筋肉に縫い付けた。P 波測定用電極として、直径 75 μm のステンレスワイヤーを 2 本、先端を 0.5 mm 離して接着剤で固定した上 (バイポーラ電極) で、内側傍小脳脚核に留置した。頭部固定用に 2 個重ねたナットを頭蓋骨上に留置し、歯科用セメントで固定した。手術後のマウスは、ホームケージに戻し、少なくとも 5 日間の回復期間を置いた。その後、5 日間をかけて、徐々に頭部固定状態に馴化させた上で、記録を行った。記録は、マウスにとっての休息期である昼間に 1日 5 時間程度行い、P 波を測定した。記録後、バイポーラ電極の位置を確認するため、4%パラホルムアルデヒドを用いて、マウスの脳を固定し、脳スライス切片作成後、Neurotrace (green) を用いて、神経細胞の染色を行った。

脳波・筋電位記録からの睡眠覚醒ステージ判定、および、P 波の検出等、解析は全て、Matlab を用いて行った。

2) シリコンプローブを用いた大規模細胞外記録

脳幹からの記録を行う場合は、P 波測定マウスと同様に手術を行い (ただし、バイポーラ電極は留置しない)、5 日間以上の回復期間、5 日間の馴化期間を経て、再びイソフルラン麻酔下で、橋直上周辺の頭蓋骨をはずし、脳表面を露出させた。翌日より、無麻酔頭部固定マウスに対して、32 チャンネル記録電極搭載 4 シャンクのシリコンプローブ電極を橋に刺入させた上で、5 時間程度自由に睡眠させた。その間の神経活動 (マルチユニット) を記録した。刺入した電極の位置は、シリコンプローブに塗布しておいた DiI の色素の位置より、決定した。同様に、P 波を測定しながら、海馬より大規模細胞外記録を行う場合は、手術の際に、内側傍小脳脚核にバイポーラ電極を留置する。5 日間の馴化期間後、イソフルラン麻酔下で海馬直上周辺の頭蓋骨をはずし、脳表面を露出。翌日より、シリコンプローブ電極を海馬に刺入し、多数の神経活動を記録した。

オフラインスパイクソーティングには、フリーソフトである klusta

(<http://klusta.readthedocs.io/en/latest/>) を使用し、その後の解析には、Matlab を用いた。

4. 研究成果

1) 睡眠覚醒に伴う脳幹神経活動

頭部固定状態のマウスに自由に睡眠覚醒させながら、脳幹に 32 チャンネルシリコンプローブを刺入し、多数の神経活動を同時に記録した。スパイクソーティング、及び睡眠覚醒ステージ判定後、睡眠覚醒ステージにおけるシングルユニット活動を解析した。図 1 に示すように、レ

ム睡眠中に発火頻度が増加する神経が多く観察された。このことから、これまでの報告の通り、脳幹に局在する神経は、レム睡眠の制御や維持に重要な役割を担っていることが予想された。

2) マウスにおける P 波の測定

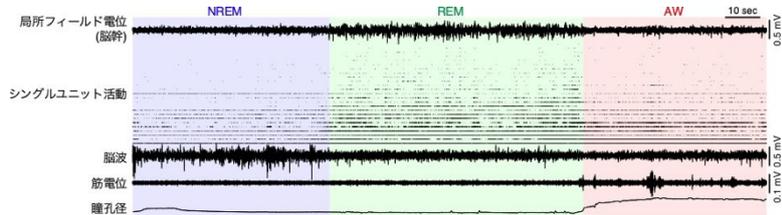


図1 睡眠覚醒ステージにおける脳幹シングルユニット活動

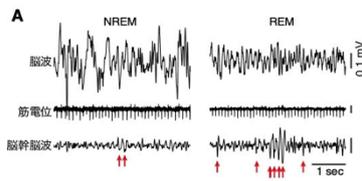
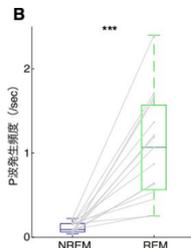


図2 マウスにおけるP波測定

A. 頭部固定マウスでのノンレム睡眠時、レム睡眠時の脳波、筋電位、脳幹脳波。赤の矢印が記録されたP波。

B. 睡眠ステージにおけるP波発生頻度。



2B)。これは、これまでネコやラットで報告されている発生頻度と同程度であった。以上の結果より、世界で初めて、マウスにおいても P 波が存在することを明らかにした。

3) P 波発生時の脳幹神経活動

次に P 波発生に伴う、脳幹神経活動を記録した。頭部固定状態で、32 チャンネルシリコンプローブを脳幹に刺入し、記録を行った。P 波は、シリコンプローブで記録される局所フィールド電位をもとに、測定した。図 3 は、それぞれの細胞の発火頻度を標準化し、発火頻度のピークを時系列順に並べた図である。0 ms が検出された P 波のピークのタイミングを表しており、ノンレム睡眠時(図 3A)、レム睡眠時(図 3B)ともに P 波のピークに先行して最も発火頻度が増加する細胞が観察された。つまり、これらの神経が、同期的に一気に発火することで、P 波を作り出していると考えられる。また、ノンレム睡眠、レム睡眠ともに、神経発火の挙動がよく似ていることから、ノンレム睡眠 P 波とレム睡眠 P 波が同じメカニズムで発生していることが示唆された。

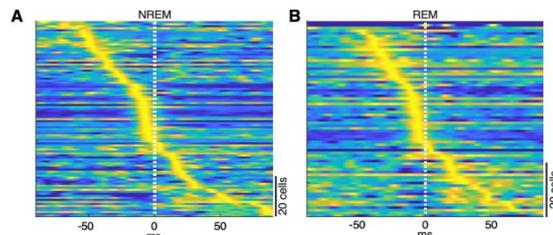


図3 P波に伴う脳幹神経活動

0 msが検出されたP波のピーク。

発火頻度はノーマライズされており、黄が発火頻度が高く、青が発火頻度が低い。

A. ノンレム睡眠で検出されたP波発生時の神経活動。

B. レム睡眠で検出されたP波発生時の神経活動。

4) P 波と他の脳領域神経活動

次に P 波と他脳領域の神経活動の関係を詳細に解析した。内側傍小脳脚核に留置したバイポーラ電極で P 波を測定し、皮質脳波の成分をスペクトログラムにて解析した。その結果、レム睡眠時は P 波の発生に応じて主にシータ波の成分が強くなっているが、ノンレム睡眠時はシータ波よりもやや周波数の高いベータ波の成分が強くなることが観察された。また、P 波を測定しながら、海馬にシリコンプローブを刺入し、海馬のシングルユニット活動を記録した。解析の結果、ノンレム睡眠時は P 波に先行した神経発火が観察され、レム睡眠時は P 波が神経発火に先行するように発生しており、全く逆の挙動を示すことが明らかになった。同じく海馬の神経活動によって発生するリップル波と P 波の関係を解析したところ、ノンレム睡眠時には P 波に先行してリップル波が観察された。この結果は、海馬シングルユニット活動に一致している。一方、レム睡眠時にはリップル波自体が観察されないため、P 波との関係を解析することは出来なかった。

以上の結果より、P 波は睡眠ステージによって、他脳領域神経活動との発火タイミングが全く異なることが明らかになった。ノンレム睡眠時は、少なくとも海馬の神経活動が起こってから、その後に P 波が発生し、レム睡眠時は、P 波が発生してから、海馬の神経活動が活性化することが明らかとなった。さらには、ノンレム睡眠、レム睡眠で P 波の発生と他脳領域の活動の順序が異なることを明らかにした。本研究は、当初ガラス電極を用いた単一細胞外記録法を用いる予定であったが、シリコンプローブを用いた大規模細胞外記録に成功し、当初の予定よりも大いに進展した研究となった。

今後も更なる詳細な実験、および解析が必要ではあるが、睡眠ステージの違いで、脳内情報伝達経路、または情報伝達の方向が全く異なる可能性を示唆する結果となった。これまで、ノンレム睡眠とレム睡眠は、全く異なる脳状態をとり、異なる睡眠であったが、その生理的機能の違いの有無は意見の分かれるところであった。本研究は、睡眠ステージ変化に応じて、脳内機

能的コネクションが全く異なる可能性を示唆しており、睡眠研究界に一石を投じる研究となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- 1) Yague JG, **Tsunematsu T**, Sakata S (2017)
Distinct Temporal Coordination of Spontaneous Population Activity between Basal Forebrain and Auditory Cortex.
Front Neural Circuits 11: Article 64, 1-14. 査読有
DOI: [10.3389/fncir.2017.00064](https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00064)

〔学会発表〕 (計 10 件)

- 1) **Tomomi Tsunematsu**, Arno Onken, Shuzo Sakata
Neural ensemble dynamics during P-waves in mice
9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies, March 2019
- 2) **Tomomi Tsunematsu**
Neural ensemble dynamics during REM sleep and P-waves in mice
The 7th Annual IIIS Symposium, ~ Solving the mystery of sleep ~, December 2018
- 3) **Tomomi Tsunematsu** and Shuzo Sakata
Pontine neural ensemble dynamics during P-waves in mice
Neuroscience 2018, November 2018
- 4) **常松友美**, 坂田秀三
マウスにおけるレム睡眠 P 波発生機序の電気生理学的解析
日本睡眠学会第 43 回定期学術集会 2018 年 7 月
- 5) **Tomomi Tsunematsu** and Shuzo Sakata
The Dynamics of Brainstem Neuronal Activity during P-waves in Mice
11th FENS Forum of European Neuroscience, July 2018
- 6) **常松友美**
多種多様な手法を用いた睡眠研究
第 7 回東北脳科学ウィンタースクール 2018 年 2 月
- 7) **常松友美**, 坂田秀三
Characterization and optogenetic manipulation of P waves during REM sleep in mice
生理学研究所研究会@東北「脳の階層的理解を目指して」 2017 年 11 月
- 8) **Tomomi Tsunematsu**
Characterization and optogenetics manipulation of P waves during REM sleep in mice
9th Optogenetics Research Society Japan International Symposium, October 2017
- 9) **常松友美**, 坂田秀三
Characterization and optogenetic manipulation of sub-second brain waves during REM sleep in mice
第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月
- 10) **常松友美**, 坂田秀三
Characterization and optogenetic manipulation of sub-second brain waves during REM sleep in mice
日本睡眠学会第 42 回定期学術集会 2017 年 6 月

〔図書〕 (計 1 件)

- 1) **常松友美**, 森澤陽介, 松井広
睡眠の光操作とグリア細胞機能の役割
Clinical Neuroscience Vol. 36 08 月号 光が拓く神経科学の未来—オプトジェネティクスと光イメージング 925-928 中外医学社
2018 年 8 月 1 日

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

1) NHK 仙台放送 てれまさむね 「健康いちばん」
崩れた生活リズムを整えるには？

2019年1月8日

ホームページ: <https://researchmap.jp/tsune/>

<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/member-TomomiTsunematsu.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。