

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07788

研究課題名(和文) 睡眠障害モデルマウスをプラットフォームとした包括的ストレス疾患改善の基盤研究

研究課題名(英文) Basic study of stress related disorders based with stress-induced sleep disorder model mice

研究代表者

宮崎 歴 (Miyazaki, Koyomi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：70358125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自で開発した持続型慢性ストレス負荷をマウスに与えることで作成されるストレス性睡眠障害モデルマウスを用いて、脳内応答機序、全身性の免疫応答反応、神経変性疾患に及ぼす当該ストレスの影響評価、および新規ストレス改善物質の探索とその物質のストレスに及ぼす影響評価を行った。その結果、神経変性疾患に対して慢性的な睡眠障害が憎悪因子として働くこと、全身性の炎症の亢進、腸内フローラの変化を伴うストレス疾患が生ずる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we originally developed continuous chronic stress exposure system of mice. This system can induce chronic sleep disorder in mice, which shows typical sleepiness in active time and intermittent sleep during resting time. In this study we analyzed 1) which area in a brain is activated by chronic stress exposure, 2) whether chronic stress affects on immune system in whole body, 3) the effects of sleep disorder on neurodegenerative diseases, and 4) screening of natural compound which can improve the health condition in stressed animal and evaluation of the effect of compounds in mice. As a result, we found that chronic sleep disorder promoted the oxidative stress in a brain and progression of neurodegenerative disorders, induced an inflammation in whole body, and dramatically changing of intestinal flora in model mice.

研究分野：動物生理学

キーワード：ストレス 睡眠障害 サーカディアンリズム メンタルシンドローム 腸内フローラ 体温

1. 研究開始当初の背景

現代では人々が 24 時間型生活習慣と慢性的精神ストレスにさらされ、睡眠障害を伴う体調不良だけでなく、精神疾患へとつながる深刻な社会問題が生じている。厚生労働省の調査によれば、日本では 5 人に 1 人が何らかの睡眠に関する悩みを抱えており、特に 20～40 歳代の働き盛り世代の 23% が睡眠時間短縮や環境によるストレスを原因とした睡眠障害を訴えている。ストレス性疾患は睡眠障害だけでなく、炎症性大腸炎に代表される消化器疾患、過食や飽食によるメタボリックシンドロームとの併発も頻発しており、包括的な疾患としてとらえたアプローチが重要であることは明白である。しかし、それぞれの疾患に関する研究は独立して進行しており、ストレスにより発症する包括的な疾患としての概念が未だ確立されておらず、相互の関連性にかかる研究は国内外においてまだほとんど進んでいない。

研究代表者は、平成 23-25 年度、基盤研究 (C)「ストレス性睡眠障害モデルを用いた不眠症改善物質のスクリーニング系開発とその応用」にて水上の回転かごで飼育するという新規なマウスに負荷するストレス法 (PAWW ストレス: Perpetual Avoidance from Water on a Wheel) を確立した。PAWW ストレス負荷されたマウスの日内行動、睡眠脳波解析、日内体温変化などの性状解析を行った結果、PAWW ストレスは一日の行動リズムを大きく乱し、マウスは昼夜を通して輪回し行動をすること、睡眠リズムも同様に乱れること、さらにマウスはこのストレスに馴化しないため、継続負荷できることから、PAWW ストレス負荷マウスは慢性ストレス性睡眠障害モデルマウスとして活用できると考え、成果報告した (K. Miyazaki, PLOS One, 2013)。

本研究を進める過程において、申請者は睡眠障害モデルマウスでは睡眠リズムの乱れと同時に日内活動量の極端な低下が認められる事を見いだした。活動量の低下はうつ様行動の指標の一つとも考えられ、ストレス性睡眠障害がうつ様行動を引き起こしている可能性を示唆した。

2. 研究の目的

現代社会でのストレスの増加、夜型生活、高齢化などによる睡眠障害は深刻な社会的問題であり、睡眠障害や睡眠のリズムの乱れるリズム障害には、こころの病気、さらには肥満や糖尿病、高血圧などのメタボリックシンドロームが随伴する事が多く、睡眠障害とともに治療する必要がある。申請者はこれまでストレスにより生ずる睡眠障害モデルマウスを作成しその性状解析を行ってきた。本研究課題では、そのモデルマウスで睡眠リズム障害を引き起こすメカニズムにアプロ-

チするとともに、精神疾患やメタボリックシンドロームの特徴を併せ持つモデルマウスの可能性を探る。また、睡眠障害を改善する物質を探索しながら、これまでの薬と組み合わせながら睡眠障害を改善することで精神疾患やメタボリックシンドロームがどのように改善するのか、総合的な改善方法を時間治療の観点からめざす。

3. 研究の方法

3-1. 睡眠障害モデルマウスの作成

マウスは産総研において兄妹交配を続けている C3H-HeN-AIST または BalbC-CrSLC マウスを購入して使用した。マウスは 22℃、湿度 50%、照明サイクルは 8:00～20:00 点灯の明期：暗期 12:12 で飼育した。餌としては通常飼料 (CE-2、日本クレア) を自由摂食で与えた。睡眠障害モデルマウスの作成に当たっては、回転輪付けケージ (メルクエスト、SW-15S) にて一匹飼いで回転輪に馴化後、睡眠障害モデルマウス作成ケージ (メルクエスト、SW-15S-SD) にマウスを移し、給餌給水とも馴化時と同じく、自由摂食及び飲水で行った。アルツハイマー早期発症型マウスでも同様のストレス負荷を行った。

3-2 マウスの不安情動解析

睡眠障害モデルマウスの不安情動をオープンフィールドテストで評価した。オープンフィールドテストは 60 cm × 60 cm の白色の箱の中にマウスを置き、その後 8 分間の歩行軌跡をビデオレコードしその行動パターンから動物の不安情動を評価するものである。薄明下で 3 時間ほど馴化させた睡眠障害モデルマウスとコントロールマウスを用いて、変法のオープンフィールドテストを行った。12 週齢のマウスを用いて、ストレス負荷直前の 0 日ストレス負荷後 10 日後の 2 回セッションを行いビデオ記録した。マウスの外周域 40% および内周域 60% の滞在時間、総走行距離を行動解析ソフト (SMART3) で解析した。

3-3 マウスの免疫組織化学

睡眠障害モデルマウス作製ケージにて 2 日または 14 日および普通の回転輪ケージにて 14 日飼育した C3H-HeN-AIST について、麻酔下にて灌流固定し脳を取り出した。後固定、シヨ糖液置換を行った後、OCT コンパウンドに脳を包埋して凍結保存した。40um 厚で薄切し、PBS で OCT コンパウンドを除き、ブロッキングを行った。一次抗体として抗 cFos 抗体 (SantaCruze 社) を反応させ、ABC-Elite キット (Vectastain 社) および DAB 溶液にて抗原を可視化した。発色を終えた切片をスライドグラスに張り付け、c-Fos の陽性領域

を顕微鏡下で観察した。

アルツハイマー発症型マウスにおいては、同様に切片を作成した後、海馬領域におけるアミロイド^βのプラーク形成を抗体を用いて観察した。

3-4 マウスの白血球および脳内における炎症関連遺伝子・酸化ストレス関連遺伝子の発現

PAWW ストレスを 10 日負荷して睡眠障害を引き起こしたマウスから血液および脳の各部位を採取し、白血球からは Lymphocyte RNA purification kit (TAKARA) で、脳部位からは RNAiso (TAKARA) を用いて total RNA を精製し、cDNA を合成、定量 PCR 法にて免疫関連遺伝子 IL-1、IL1-ra、IL-1β、脳内酸化ストレス関連遺伝子アディクシンの遺伝子発現変化を調べた。

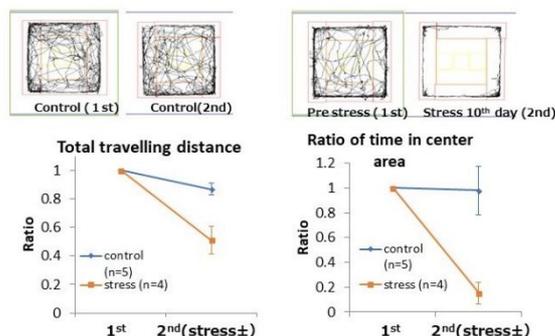
3-5 マウスの腸内フローラ解析

PAWW ストレス負荷群とコントロール群にマウスを分け、0 日および 4 週後の糞便を採取した。糞便よりゲノムを抽出し、腸内フローラを構成する細菌群の同定を解析した。

4. 研究成果

4-1. ストレス性睡眠障害モデルマウスの不安障害、気分障害性向の検証

ストレス性睡眠障害モデルマウスの不安情動を変法のオープンフィールドテストで解析した。ストレス負荷前およびストレス負荷 10 日後の総歩行距離および中央領域への侵入頻度を負荷無しのマウスと比較した結果、いずれの項目においても、継続的なストレスの負荷群において低下が認められた(図 1)。この結果より、継続的なストレス負荷により睡眠障害を引き起こされたマウスにおいては、不安情動の亢進が認められることが明らかとなり、うつテストにおいても、有意差は認められないがその傾向が高いことも確認された。つまり、当該モデルマウスでは、代謝のみならず、精神的ダメージも確認され、不安改善などを旨とした技術開発のために、本モデルマウスを使用することが可能であ



ると考えられた。

図 1. モデルマウスでのオープンフィールドテ

ト

4-2. ストレス性睡眠障害モデルマウスの発症に関わる神経核の探索

ストレス性睡眠障害モデルマウスの脳における睡眠障害行動の責任部位を見つけるため、c-Fos をマーカーとして急性期神経活動応答

をしている脳内領域を免疫組織科学的な手法により検討を行った。脳の全体の部位を 40 μm に薄切し、免疫反応をおこなった。ストレス

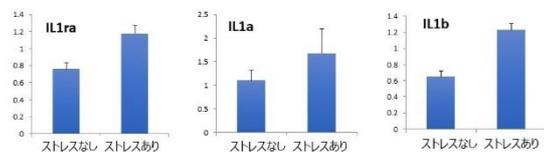
暴露時に中脳に置ける広い範囲、視床下部に応答領域が応答していることは確認されたが、数値的な解析を行うためには個体間の差異

が大きく、有意な差を見つける所までには至らなかった。今後は、薄切領域を統合的に観察しデータ化する手法の検討も重要である。

海馬領域に置ける酸化ストレス応答性をマーカータンパク質アディクシンの発現動態を解析したところ、海馬においてストレス暴露により酸化ストレスの亢進が認められたことから、記憶学習などへのストレスの影響を見いだすことが出来る可能性もある。さらには脳内酸化ストレスに関わるような神経性疾患と睡眠障害との関連性があることが予想された。

4-3 ストレス性睡眠障害モデルマウスのストレス関連疾患傾向の解析

睡眠障害モデルマウスにおける炎症性的変化を検証するために、ストレス負荷したマウスから白血球を単離し、血球における免疫応答関連遺伝子の発現変化を解析した。その結果、睡眠障害モデルマウスでは IL-1、IL1-ra、IL-1β の遺伝子発現がいずれも上昇していることが確認された(図 2)。このことはストレス性睡眠障害の状態にあるマウスの体内のいずれかの組織において炎症があることを示唆するものである。近年、ストレスの応答性が免疫系シグナルを介して、脳



内に伝わっているという報告もある。そこで、脳内のこれら ILs の遺伝子発現を確認したが、大脳皮質における遺伝子発現には差異は認められなかった。

図 2. 白血球における炎症関連遺伝子の発現変化

アルツハイマー発症型マウスに対して、PAWW ストレスを負荷し、睡眠を障害させる実験を行った。中途覚醒の頻度により睡眠障害

の強い群と弱い群の2群に分け、ストレス負荷していないマウスとアルツハイマー発症および進行の状態を海馬におけるタウ沈着の程度により評価して、比較検討した。その結果、中途覚醒の現れる頻度が高いほど海馬におけるアミロイドの沈着蓄積が顕著となり、ストレスによる睡眠障害が、アルツハイマーの発症の憎悪化因子として働く可能性が示唆された。

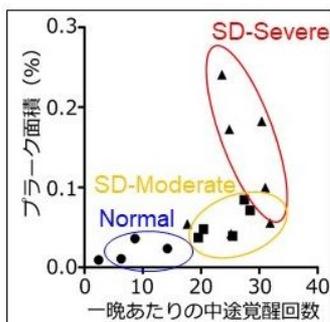


図3. ストレス負荷したアルツハイマーモデルマウスにおける中途覚醒頻度とアミロイド蓄積

慢性的ストレスを負荷したマウスにおいては、睡眠リズムの障害のみならず、体のいずれかの組織において炎症があるデータが得られていた。ストレスにより惹起される炎症として、ストレス性大腸過敏症や大腸炎などである。そこで PAWW ストレス負荷マウスにおいて消化器系への影響を評価する為に、ギガシークエンサーによる腸内フローラの網羅的解析を行い、そのバイオームの構成や定量的解析を行った。その結果、ストレスを誘導することによりその構成を大きく変えることが分かった。その変化は、ストレス負荷2週間ほどから認められるようになり、4-6週間で変換が完了することが分かった。これらの変化を示すバクテリア群について、今後ストレス評価のためのマーカーになる可能性がある。

4-4 ストレス軽減する天然化合物の探索

ストレスと炎症が相互に影響を与える可能性があることから、炎症を改善することでストレス緩和効果が認められる可能性がある。また、抗炎症性を持つ物質が経験的にサーカディアンリズムなどの神経系支配行動に影響を与えるデータが多いことから、抗炎症効果を持つ物質をキノコ類、食用性植物より単離してサーカディアンリズムへの影響や抗炎症活性をもつ物質の探索を行った。その結果、アガリスクに含まれるリノール酸が抗炎症効果を持つことやある植物Xの抽出物がリズムや抗炎症性を持つことを見出し、今後は植物X由来の抽出物やリノール酸などのストレス性睡眠障害モデルマウスへ投与しその効果をみる準備が整った。

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3件)

Shimizu Takashi, Watanabe Kaya, Anayama Nozomi, Miyazaki Koyomi. Effect of lipopolysaccharide on circadian clock genes Per2 and Bmal1 in mouse ovary. J Physiol Sci. 67, 623-628, DOI: 10.1007/s12576-017-0532-1

Eiko N. Minakawa, Koyomi Miyazaki, Kazushi Maruo Hiroko Yagihara, Hiromi Fujita, Keiji Wada, Yoshitaka Nagai Chronic sleep fragmentation exacerbates amyloid deposition in Alzheimer's disease model mice. Neuroscience letter, 653, 362-369, 2017 DOI: 10.1016/j.neulet.2017.05.054

Papawee Saiki, Yasuhiro Kawano, Van Griensven LJLD, Koyomi Miyazaki. The anti-inflammatory effect of Agaricus brasiliensis is partly due to its linoleic acid content. Food Function, 8,4150-4158, 2017 DOI: 10.1039/c7fo01172e

[学会発表](計5件)

小林桃子、渡佳耶、宮崎歴、宮本明夫、古林与志安、榛葉繁紀、清水隆 マウス妊娠黄体の形成と維持における時計遺伝子 Bmal1 の関与 第109回日本繁殖生物学会大会 2016

皆川栄子、宮崎歴、丸尾和司、八木原紘子、藤田寛美、和田圭司、永井義隆 中途醒の加はアルツハイマー病モデルマウスのアミロイド病理を化させる 日本睡眠学会第42回定期学術集会 2017

宮崎歴 天然化合物のパワーを生かしたところからだを守る技術の開発 第1回沖縄県学官連携セミナー 2017

Koyomi Miyazaki Bioassay of Functional Food Development for Circadian Rhythm and Sleep Disorder TISTR and AIST Mini Joint Symposium (招待講演)(国際学会) 2017

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 小動物飼育装置及び小動物飼育方法
 発明者: メルクエスト、産業技術総合研究所
 権利者: メルクエスト、産業技術総合研究所
 種類: 特許
 番号: 特願 2016-101237
 出願年月日: 2016年05月20日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

[https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-pas/
index.html](https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-pas/index.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

宮崎 歴 (MIYAZAKI Koyomi)

産業技術総合研究所 バイオメディカル
研究部門 研究グループ長

研究者番号：70358125

(2)連携研究者

大石 勝隆 (OISHI Katsutaka)

産業技術総合研究所 バイオメディカル
研究部門 研究グループ長

研究者番号：50338688