

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06141

研究課題名（和文）睡眠構築を生み出す神経基盤の解明とその応用

研究課題名（英文）Analyses on the neural bases of the sleep architecture and its applications

研究代表者

林 悠 (Hayashi, Yu)

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：40525812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,400,000円

研究成果の概要（和文）：私たちの睡眠は、一晩の間に、レム睡眠とノンレム睡眠を行き来する。そのパターンを、「睡眠構築」と言う。睡眠構築は、一部の脊椎動物に固有の現象であり、その制御機構は不明な点が多い。本研究では、まず、ノンレム睡眠からレム睡眠への移行に関わるニューロンを複数同定することに成功した。また、レム睡眠の維持に必須なニューロンの同定にも成功した。これら一連のニューロン群の機能を遺伝学的に操作することで、睡眠構築の異常なマウスを作出し、正常な睡眠構築が行動制御に重要であることも示唆した。さらには、睡眠構築を改善するための治療法の開発を目指し、これらの神経細胞の機能に関わる遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の概日リズムや睡眠覚醒リズムのメカニズムの理解の躍進とは対照的に、睡眠構築の理解は進んでいないのが現状である。今回、レム睡眠を正負に制御する2種類の神経回路を同定・解析したことは、哺乳類固有の睡眠構築の制御機構を理解するための端緒となると期待される。その過程で得た、睡眠構築破綻マウスは、個体機能を維持する上で正常な睡眠構築がどのような役割を果たすかを解明する上で有用なマウスモデルとなると期待される。

研究成果の概要（英文）：Mammalian sleep architecture consists of REM sleep, non-REM sleep, and short arousals. How the pattern of the sleep architecture is determined and how it affects the individual's health remains largely unknown. Previously, we identified neurons in the brainstem that negatively regulate REM sleep. DREADD-activation of these neurons resulted in a sleep architecture in which REM sleep is skipped. To further elucidate how the sleep architecture is regulated, we aimed to elucidate how these neurons convey these effects by analyzing the downstream targets. Moreover, we identified neurons in the brainstem that play an essential role in the positive regulation of REM sleep. Genetic ablation of these neurons resulted in a severely deteriorated sleep architecture. These results reveal the neural mechanism underlying the regulation of the mammalian sleep architecture.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 マウス 遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちの睡眠は、一晩の間に、レム睡眠とノンレム睡眠を行き来する。そのサイクルのパターンを、「睡眠構築」と言う。睡眠構築は、精神疾患や発達障害や認知症、さらには睡眠薬の影響を大きく受ける。例えば、うつ病では入眠後早くレム睡眠に入り、一方、自閉症ではレム睡眠の量が低下する。また、睡眠構築は加齢によっても変化し、具体的には、レム睡眠や深いノンレム睡眠の減少し、睡眠の断片化が見られるようになる。正常な睡眠構築を生み出す神経メカニズムや、睡眠構築の異常が個体機能に及ぼす影響は明らかになっていなかった。

睡眠構築を大きく特徴づけるのは、周期的に現れるレム睡眠である。このレム睡眠の役割は大きな謎であった。レム睡眠を強制覚醒により阻害しようとする、睡眠そのものが断片化し、刺激もストレスになる。私たちはこれまでに、レム睡眠を抑制するニューロンを同定し、神経活動操作を可能とする DREADD 法と組み合わせることで、レム睡眠を任意のタイミングで阻害できるマウスを開発した。解析の結果、レム睡眠を阻害し続けると、ノンレム睡眠中の徐波と呼ばれる脳活動が次第に低下した (Hayashi ら, *Science*, 2015)。徐波とは、4Hz 以下のゆっくりとした周波数の脳波で、ノンレム睡眠の深さの指標となる。例えば、成長ホルモンは徐波の強い深いノンレム睡眠中に分泌される (Gronfier ら, *Sleep*, 1996)。また、徐波自体が神経可塑性や記憶学習に関与することも知られる (Marshall ら, *Nature*, 2006; Chauvette ら, *Neuron*, 2012)。本研究から、レム睡眠が周期的に現れる正常な睡眠構築が、良質な睡眠ひいては脳機能に重要であることが判明した。

レム睡眠が深いノンレム睡眠の生成に貢献する、という上述の発見を踏まえると、睡眠構築の制御機構を理解する上で、特に、レム睡眠の開始と終了のメカニズムの解明が重要と考えられる。これまでに、脳幹橋の Atoh1 陽性のニューロンの活動を DREADD により誘導することで、レム睡眠が強く抑制されることを発見した。ただし、Atoh1 陽性ニューロンは数が多く、他機能のニューロンも含まれる可能性があった。また、レム睡眠を抑制するニューロンが見つかった脳幹橋は、古典的な破壊実験からは、むしろ、レム睡眠の誘導に関わるとされてきた (Sakai ら, *Arch Ital Biol*, 2001)。したがって、脳幹橋の領域のニューロン群の詳細な機能プロファイリングを行うことで、レム睡眠の開始と終了双方に関わる神経回路が明らかとなり、睡眠構築を生み出す神経基盤の理解が大幅に進むものと期待された。

2. 研究の目的

本研究では、睡眠構築を規定する主要因であるレム睡眠について、その出現がどのように制御されているかの解明を目指した。そのために、これまでに同定した、レム睡眠を抑制するニューロン群について、より特異性の高い分子マーカーを探索し、投射先を明らかにすることで、これらのニューロンによる睡眠制御のメカニズムの解明に取り組んだ。また、レム睡眠を促進するニューロンに関しても、これまでに同定した候補分子マーカーを元に、Cre ノックインマウスを作製し、レム睡眠制御への関与を検証した。そして、これら睡眠構築を制御するニューロンの破綻により、認知能力などにどのように影響するかも、行動実験により検証した。さらに、将来の応用を見据え、睡眠構築の操作を可能とする分子標的の探索を行った。そのために、上記のレム睡眠制御ニューロンに発現することが判明したマーカー遺伝子に着目した。

3. 研究の方法

遺伝子組換えマウスを用いた特定の神経細胞群の遺伝子操作・神経活動操作や、脳波筋電図の解析による睡眠計測には、過去の私たちの研究と同じ手法を適用した (Hayashi ら, *Science*, 2015)。

4. 研究成果

(1) ノンレム睡眠を促進し、レム睡眠を抑制するニューロン群の遺伝学的同定

私たちは、これまでに、脳幹において、胎児期 11 日目ごろに小脳菱脳唇から生じるニューロン群が、ノンレム睡眠を促進し、レム睡眠を抑制する作用があることを見出した。ところが、これらのニューロン群が、成体期にどのような分子マーカーを発現するかは不明であり、成体期にこれらのニューロンだけを遺伝学的にラベルすることは困難であった。そこで、成体マウスにおいて、この領域およびその背側・腹側の対照領域の組織からトータル RNA を精製し、マイクロアレイ法によりトランスクリプトームの比較を行った。その結果、目的の領域に選択的に発現する遺伝子を多く同定することに成功した。その中でも、最も顕著な差がみられた候補遺伝子について解析を進めた結果、この候補遺伝子が、胎児期 11 日目ごろに小脳菱脳唇から生じるニューロンに選択的に発現することが確認された。この遺伝子のプロモーターの制御下で Cre を発現するノックインマウスを得て、その脳幹の領域に局所的にアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入することで、これらのニューロンに特異的な遺伝子発現に成功した。そこで、これらのニューロンの機能を調べるために、DREADD 法による神経活動操作を実施した。アデノ随伴ウイルスベクターの微量注入により、これらのニューロンに hM3Dq 遺伝子を導入し、神経活動を上げたところ、ノンレム睡眠が大幅に増え、逆にレム睡眠と覚醒が大幅に減少した。一方、これらのニューロンに、シナプス放出を阻害する作用があるテタヌス毒素の遺伝子を導入したところ、ノンレム睡眠が減少し、レム睡眠が睡眠に占める割合が増加した。これらの結果から、このニューロン群がノンレム睡眠を促進し、レム睡眠を抑制するニューロン群であるこ

とが判明し、その分子マーカーの同定にも成功した。

(2) 脳幹に広く分布するニューロンのネットワークがノンレム睡眠を促進

続いて、上記のノンレム睡眠促進ニューロンに関して、投射先を明らかにするために、遺伝学的にターゲットしやすくなったことを活かして、神経終末に局在する Synaptophysin-GFP をこれらのニューロンに発現させた。その結果、中脳・橋・延髄などにおいて、Synaptophysin-GFP 由来の蛍光シグナルが検出され、これらのニューロンが、脳幹内に広く投射していることが明らかとなった。そこで、各投射先の部位に存在するニューロンについても、睡眠制御に関わるかを明らかにするために、各投射先部位に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて hM3Dq を導入し、神経活動を増加させたところ、やはり、ノンレム睡眠の増加とレム睡眠の抑制が見られた。従って、脳幹において、ノンレム睡眠を促進するニューロンが複数の部位において見つかり、さらに、それらが神経投射を介してつながっていることが判明した。

(3) 正常なレム睡眠に必須な神経細胞群の同定と解析

上記のように、レム睡眠を抑制し、ノンレム睡眠を促進する神経回路の同定が大幅に進んだ一方で、レム睡眠を促進する神経回路の解析も進んだ。具体的には、脳幹橋被蓋野において、レム睡眠の維持に必須なニューロン群の同定に成功した。この領域に選択的に発現する遺伝子の Cre ノックインマウスを作成し、さらに、Cre 依存的に細胞死を誘導するジフテリア毒素遺伝子を、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて導入したところ、不可逆的な睡眠異常に至った。具体的には、レム睡眠が大幅に減少し、さらに、深いノンレム睡眠も減少し、中途覚醒が増えた。その睡眠構築は、重症化した認知症患者の睡眠構築や、高齢者・睡眠時無呼吸症の患者の睡眠構築と一部共通した特徴を持つものであった。さらに、この睡眠構築が破綻したマウスについて、記憶学習課題をさせたところ、異常な成績が見られたことから、記憶学習能力や認知機能に異常があることが示唆された。

(4) 睡眠構築の治療法の開発へ向けた分子標的の探索

私たちが脳幹橋において同定した睡眠制御ニューロンは、その機能を阻害することで、様々な睡眠構築の異常を生じた。逆に、認知症や加齢に伴い見られる睡眠構築の異常は、これらのニューロンの活動を補正することで、改善できる可能性がある。そこで、(1) で同定した分子マーカーに関して、そのノックアウトマウスを解析することで、この分子マーカーが治療の分子標的の候補にもなりえるか検討した。その結果、ノックアウトマウスでは、レム睡眠が増加しており、レム睡眠増加による睡眠構築改善のための有効な分子標的となり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Kashiwagi, M. and Hayashi, Y. Life Without Dreams: Muscarinic Receptors Are Required to Regulate REM Sleep in Mice. *Cell Reports* 24, 2211-2212 (2018).
2. Miyazaki, S., Liu, C.Y., and Hayashi, Y. Sleep in vertebrate and invertebrate animals, and insights into the function and evolution of sleep. *Neuroscience Research* 118, 3-12 (2017).
3. Yasuda, K., Hayashi, Y., Yoshida, T., Kashiwagi, M., Nakagawa, N., Michikawa, T., Tanaka, M., Ando, R., Huang, A., Hosoya, T., McHugh, T.J., Kuwahara, M., Itohara, S. Schizophrenia-like phenotypes in mice with NMDA receptor ablation in intralaminar thalamic nucleus cells and gene therapy-based reversal in adults. *Translational Psychiatry* 7, e1047 (2017).
4. Ogawa, Y., Irukayama-Tomobe, Y., Murakoshi, N., Kiyama, M., Ishikawa, Y., Hosokawa, N., Tominaga, H., Uchida, S., Kimura, S., Kanuka, M., Morita, M., Hamada, M., Takahashi, S., Hayashi, Y., Yanagisawa, M. Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock. *eLife* 2016; 5: e21055 (2016).
5. Funato, H.,,,,,,,Hayashi, Y.,,,,,,Yanagisawa, M. (32nd of 37 authors). Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature* 539, 378-383 (2016).

[学会発表](計 14 件)

1. 林 悠 レム・ノンレム睡眠制御細胞の同定と操作によるレム睡眠の意義とメカニズムの解析
第 25 回 日本時間生物学会学術大会 シンポジウム「個体に表出する時間生理学」 2018 年 10 月 19 日 長崎県長崎市 長崎大学
2. 林 悠 認知症における睡眠構築の破綻とその作用
第 37 回 日本認知症学会学術集会 シンポジウム「睡眠・生体リズムと認知症」 2018 年 10 月 13 日 北海道札幌市 ロイトン札幌
3. 林 悠 睡眠構築とその破綻のメカニズムや生理的作用

第10回 日本臨床睡眠医学会 (ISMSJ) 学術集会イブニングセミナー 2018年10月5日 兵庫県淡路市 淡路夢舞台国際会議場

4. Yu Hayashi Identification of brainstem REM/non-REM sleep regulating neurons and insights to the function of REM sleep

21st Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences (KSBNS) Symposium “Synaptic Pathophysiology of Brain Disorder” 2018年8月30日 Seoul, Korea

5. 林 悠 レム睡眠とその破綻のメカニズム～マウス遺伝学からのアプローチ～

第33回 日本大脳基底核研究会 2018年8月25日 東京都港区 ベイサイドホテル アジュール竹芝

6. 林 悠 睡眠の分子機構と機能～線虫からのアプローチ～

第41回 日本神経科学大会 2018年7月27日 兵庫県神戸市 神戸コンベンションセンター

7. Yu Hayashi Identification of brainstem REM/non-REM sleep regulating neurons and insights to the function of REM sleep

FENS Forum 2018 Symposium “The mystery of rapid eye movement sleep: New circuits and insights” 2018年7月9日 Berlin, Germany

8. 林 悠 レム睡眠とその破綻のメカニズム

第12回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 2018年7月6日 京都府京都市 ハイアットリージェンシー京都

9. 林 悠 レム睡眠の意義とメカニズムの遺伝学的解析

第55回 日本臨床分子医学会 学術集会 セミナー「神経ネットワーク・脳—無限の小宇宙—を解き明かす試み」 2018年4月13日 京都府京都市 みやこメッセ

10. Yu Hayashi Analyses of neurons regulating REM/NREM sleep and implications for the function & evolution of sleep

2017年10月27日 Bern, Switzerland

11. Yu Hayashi Genetic dissection of the brainstem REM sleep center

第9回 光操作研究会 2017年10月21日 宮城県仙台市 東北大学

12. Yu Hayashi Identification of REM/non-REM sleep regulating neurons and insights to the roles of REM sleep

第41回 日本神経科学大会 (Neuro2017) 2017年7月20日 千葉県千葉市 幕張メッセ

13. 林 悠 レム睡眠の意義とメカニズム～遺伝学・発生学からのアプローチ～

次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム 2016 2016年12月21日 東京都千代田区 一橋講堂

14. Yu Hayashi Genetic identification of the REM sleep central circuit and its developmental origin

第39回日本分子生物学会年会 2016年12月1日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

〔図書〕(計12件)

1. 安垣 進之助, 林 悠. 睡眠学 第2版(朝倉書店). 第1部「睡眠科学」第1章「睡眠の動態」(印刷中).

2. 高木 眞莉奈, 林 悠. 睡眠の意義 - 神経変性疾患の観点から -. 実験医学(羊土社)37(6), 889-893 (2018).

3. 安垣 進之助, 林 悠. ニューロサイエンスの最新情報 - レム睡眠は何のためにあるのか -. Clinical Neuroscience (中外医学社) 37(3), 358-359 (2018).

4. 中井 彩加, 林 悠. 睡眠の役割の研究の最前線 - 記憶学習・老廃物の除去・デルタ波 -. Clinical Neuroscience (中外医学社) 37(1), 33-36 (2018).

5. 大石 陽, 林 悠, 柳沢 正史. 睡眠の制御メカニズムとその破綻に伴う行動異常. 実験医学増刊「脳神経回路と高次脳機能 スクラップ&ビルドによる心の発達と脳疾患の謎を解く」(羊土社) 36(12) (2018).

6. Hayashi, Y. and Liu, Chih-Yao. Brain Evolution by Design: From Neural Origin to Cognitive Architecture. Springer; 1st ed. Chapter 15. The Evolution and Function of Sleep (2017).

7. 高木 眞莉奈, 林 悠. レム睡眠の神経基盤、生理的意義および進化. 医学のあゆみ(医歯薬出版株式会社) 263(9), 740-746 (2017).

8. 高木 眞莉奈, 林 悠. レム睡眠のメカニズムと生理的意義. 生化学(日本生化学学会) 89(6) 911-916 (2017).

9. 林 悠, 鹿糠 実香. 実験医学別冊 マウス表現型解析スタンダード - 系統の選択、飼育環境、臓器・疾患別解析のフローチャートと実験例 - (羊土社). 第4章, 第10節「睡眠と覚醒の表現型解析」(2016).

10. 柏木 光昭, 高木 眞莉奈, 安垣 進之助, 林 悠. レム・ノンレム睡眠と覚醒の制御機構. 学会誌「時間生物学」22(2), 61-64 (2016).

11. 柏木 光昭, 林 悠. 夢を生じるレム睡眠やノンレム睡眠の記憶学習における役割. 生体の科学(医学書院) 67(1), 56-60 (2016).

12. 林 悠, 柏木 光昭, 糸原 重美. レム睡眠とノンレム睡眠との切り替えを司るニューロン

の同定と操作により明らかとなったレム睡眠の意義. 実験医学 (羊土社) 34 (6), 943-945 (2016).

〔その他〕

ホームページ等

<http://hayashi.wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

研究代表者のみ

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。