

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15463

研究課題名(和文) 自然な回復システム「過眠」を新しいうつ病治療法開発に活用する

研究課題名(英文) Compensatory increase in sleep is a novel therapeutic application for depression

研究代表者

村田 雄介 (Murata, Yusuke)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90461508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、睡眠不足後に誘発される「過眠」を生体の回復システムとみなし、そのシステムの仲介因子の解明を目指した。具体的には断眠処置後、自由に睡眠を取らせたラット海馬の分子生理学的変化を評価した。

その結果、「過眠」により1)神経栄養作用のあるBdnf遺伝子 splicing variants量上昇、2)神経機能を調節するグルタミン酸受容体 mRNA量がサブタイプごとに増加または減少、3) neurotensin mRNA量が早期に減少したが、その後基準値を上回るほどに増加、という変化が得られた。本研究知見から「過眠」による中枢回復システムには複数の生体因子が複雑に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、睡眠不足後に誘発される「過眠」は、確かに脳内に蓄積した損傷を回復させるという一般的理解について、分子生理学的メカニズムの観点から支持するものである。また「過眠」による回復と海馬neurotensinの間の関連が初めて明らかとなった。

これらの成果より、「睡眠不足によるダメージの回復には、やはり十分な睡眠が必要」という厳然たる事実が保証された。またneurotensinを標的とした「過眠模倣物質」、言い換えると「実際に睡眠時間の増加がなくても睡眠を十分に取ったかのような回復反応を促す物質」の創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sleep loss-induced increase in sleep is considered as an innate recovery system, however, the molecular mechanisms remain unclear. Male rats were subjected to sleep deprivation for 96-h, then returned to a normal housing condition for taking a sleep freely. Six hours, 3- or 7-days after, animals were sacrificed and hippocampal tissues were collected in order to quantify various gene transcripts using RT-qPCR. We found three major findings: 1) rebound sleep increased splicing variants levels of brain derived neurotrophic factor gene, 2) the glutamate receptor gene transcripts levels were increased or decreased by rebound sleep dependent of subtypes, 3) the decrease in neurotensin mRNA levels immediately after rebound sleep was increased gradually over the baseline. These findings suggest that the compensatory increased sleep may ameliorate sleep loss-induced damages of neuronal functions via complex and multifactorial processes.

研究分野：精神神経薬理学

キーワード：過眠 睡眠不足 断眠処置 海馬 BDNF グルタミン酸受容体 neurotensin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠は生命維持に必須の営為であり、その適切な管理は生活の質の向上、健康寿命の延伸、疾患リスクの低下など多くのメリットをもたらす。しかしながら、現代人は十分な睡眠がとれておらず、様々な弊害が生じている¹⁾。また、入眠困難や中途覚醒などの睡眠障害は、認知症、パーキンソン病、統合失調症、うつ病など種々の精神・神経系疾患に共通して見られる症状であるとともに、良好な睡眠は病勢のコントロールに重要であることも知られている²⁾。

私たちの先行研究では、睡眠障害を訴えるうつ病患者に抗うつ薬治療を行った際、その初期に1日12時間以上の「過剰な睡眠(過眠)」が見られた症例では、その後の治療の早い段階で良好な抗うつ反応が現れることが明らかとなった³⁾。「過眠」の発現は、それまでに蓄積された睡眠の不足に対する代償的な応答であり、先行研究における抗うつ効果の発現は然るべき反応と考えられる。しかしながら、「過眠」の回復効果に注目した研究は行われておらず、またその回復のメカニズムについても明らかではない。

「過眠」がもたらす回復のメカニズムを解明するためには、実験動物を用いた基礎的検討が重要である。私たちは睡眠不足状態を実験的に誘発する断眠処置により、海馬機能の維持に重要な神経新生が減少すること、また処置終了後の「リバウンド睡眠」により健康レベルを上回るほどに回復することを見出してきた。さらにその神経新生回復反応には脳内セロトニン系の関与が重要であるというデータを得た。これらの予備的知見は、実験的な「過眠」がうつ病治療の新たな選択肢として活用できる可能性を示している。そして、「過眠」による回復システムのメカニズム解明が進めば、その成果に基づく新たなうつ病治療薬の開発が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、断眠処置後に見られる「リバウンド睡眠」を実験的な「過眠」とみなし、その発現からの経過時間別に海馬をサンプリングし、種々の遺伝子発現変化について定量評価した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および断眠処置

雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。搬入から1~2週間の順化後、水上プラットホーム法を用いた断眠処置を実施した。30×30×30 cm³のアクリル製水槽の中央に直径7 cm、高さ10 cmのアクリル製台座(プラットホーム)を設置し、水槽内に高さ8 cmまで水道水を満たした後、ラットを台座中央に配置した。REM睡眠に入り筋弛緩が起きると、ラットは台座上で姿勢を維持できなくなり落水、覚醒して再び台座上に戻る。この手法に基づく断眠処置をコホート1については72時間、コホート2については96時間連続で実施した。なお水槽内の水は24時間ごとに交換し、飼料および水は自由摂取とした。

断眠処置終了後、リバウンド睡眠を誘発させる実験群については通常の飼育条件に戻した。コホート1については7日間、コホート2については6時間、3日または7日間の経過観察を行った。対照群には同週齢の無処置ラット(intact群)を用いた。

(2) 海馬サンプリングと各種遺伝子発現解析

既定の観察期間終了後、各ラットは麻酔下で断頭し、氷上にて直ちに左右の海馬組織を分画、ドライアイス-エタノールで瞬間的に凍結した。後に Isogen II (ニッポンジーン)を用いて total RNA を抽出し、Nanodrop (ThermoFisher)を用いて純度と濃度を、またホルマリン変性アガロースゲル電気泳動により完全性を評価した。RNA サンプルの一部はDNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現の評価に供した。また同サンプルからは、ReverTra Ace@qPCR RT Kit (東洋紡ライフサイエンス)により cDNA を合成し、Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies)、遺伝子特異的なプライマーオリゴDNA、AriaMx システム (Agilent Technologies)を用いて、定量PCRによる mRNA 発現レベルの解析を行った。なお、複数のハウスキーピング遺伝子の発現量を解析した結果、変動幅が最小なものは Actb および Ywhaz 遺伝子であったため、これら2つを reference gene として用いた。そして target gene の相対的発現量については Pfaffl 法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 脳由来神経栄養因子(Bdnf)遺伝子 splicing variants レベルの変化

神経栄養作用により神経細胞の成長や再生を促す Bdnf の遺伝子には複数の splicing variants が存在しており、その発現量は種々の刺激によって変化することが知られている⁴⁾。コホート1のラットについて、海馬 Bdnf 遺伝子 splicing variants レベルを解析したところ、exon 1、exon 2c および exon 9a を除くすべての transcripts レベルについて、断眠処置による減少とリバウンド睡眠による増加を認めた(表1)。

表 1 . 72 時間の断眠処置および 7 日間のリバウンド睡眠後のラット海馬 Bdnf 遺伝子 splicing variants レベル

relative quantity	intact (N=5)	sleep deprivation (N=5)	rebound sleep (N=5)
Bdnf exon 1	1.101 ± 0.072	1.025 ± 0.031	1.225 ± 0.064
Bdnf exon 2a	1.169 ± 0.098	0.823 ± 0.039 **	1.363 ± 0.084 ***
Bdnf exon 2b	1.016 ± 0.062	0.723 ± 0.032 p=0.086	1.315 ± 0.178 p=0.080
Bdnf exon 2c	0.916 ± 0.069	0.680 ± 0.026	0.996 ± 0.147
Bdnf exon 3	1.085 ± 0.062	0.807 ± 0.025 ***	1.285 ± 0.036 **
Bdnf exon 4	0.948 ± 0.023	0.797 ± 0.015 **	1.136 ± 0.046 **
Bdnf exon 5	N.D.	N.D.	N.D.
Bdnf exon 6	1.032 ± 0.021	0.786 ± 0.036 ***	1.211 ± 0.053 **
Bdnf exon 7	N.D.	N.D.	N.D.
Bdnf exon 8	N.D.	N.D.	N.D.
Bdnf exon 9	1.013 ± 0.054	0.812 ± 0.034 *	1.209 ± 0.070 *
Bdnf exon 9a	1.142 ± 0.101	0.971 ± 0.035	1.408 ± 0.204

*, **, ***: p < 0.05, 0.01, 0.001 vs intact

N.D.: not detectable

data are represented as mean ± S.E.

(2) グルタミン酸受容体の複数のサブタイプをコードする遺伝子 mRNA 量の変化

グルタミン酸受容体は脳内の広い範囲に分布しており、様々な脳領域において神経機能を調節している。また同受容体には多数のサブタイプが存在し、イオンチャネル型の NMDA、AMPA およびカイニン酸受容体と G タンパク共役型の代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) に分けられる。コホート 2 のラットについて、グルタミン酸受容体の複数のサブタイプをコードする遺伝子 mRNA レベルを解析したところ、NMDA 受容体のサブユニットである GluN2D および GluN3A、AMPA 受容体のサブユニットである GluA3、mGluR のサブタイプである mGluR4 について群間での有意な変化を認めた (表 2)。

表 2 . 96 時間の断眠処置後 6 時間、3 日または 7 日間のリバウンド睡眠を経たラット海馬グルタミン酸受容体サブタイプの mRNA レベル

relative quantity	intact (N=5)	rebound sleep 6-hr (N=5)	rebound sleep 3-d (N=4)	rebound sleep 7-d (N=5)
GluN2D	0.458 ± 0.042	0.620 ± 0.039 **	0.626 ± 0.009 **	0.548 ± 0.039 p=0.098
GluN3A	0.698 ± 0.039	0.540 ± 0.027 *	0.726 ± 0.054	0.653 ± 0.041 p=0.059
GluA3	0.590 ± 0.057	0.959 ± 0.0289 **	0.949 ± 0.125 **	0.972 ± 0.023 **
mGluR4	0.417 ± 0.018	0.504 ± 0.038 *	0.414 ± 0.026	0.362 ± 0.027

*, **: p < 0.05, 0.01 vs intact

data are represented as mean ± S.E.

(3) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の網羅的解析と neurotensin 遺伝子 mRNA 量の変化

コホート 2 のラットについて、遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、96 時間の断眠処置による変化 550 遺伝子 (ratio > 2.0: 339 遺伝子; ratio < 0.66: 211 遺伝子)、6 時間のリバウンド睡眠による変化 525 遺伝子 (ratio > 2.0: 277 遺伝子; ratio < 0.66: 248 遺伝子)、3 日間のリバウンド睡眠による変化 584 遺伝子 (ratio > 2.0: 271 遺伝子; ratio < 0.66: 313 遺伝子) が検出された。これらの遺伝子のうち、それぞれの実験群で異なる変動が見られた遺伝子について探索したところ、neurotensin 遺伝子が検出された。

そこで、neurotensin 遺伝子の mRNA 発現レベルを、コホート 2 のラット海馬をサンプルとして定量 PCR 法で評価した。その結果、海馬 neurotensin 遺伝子 mRNA レベルは、リバウンド睡眠 6 時間後に減少した後、進行性に増加し、7 日後の時点での増加を認めた (図 1)。

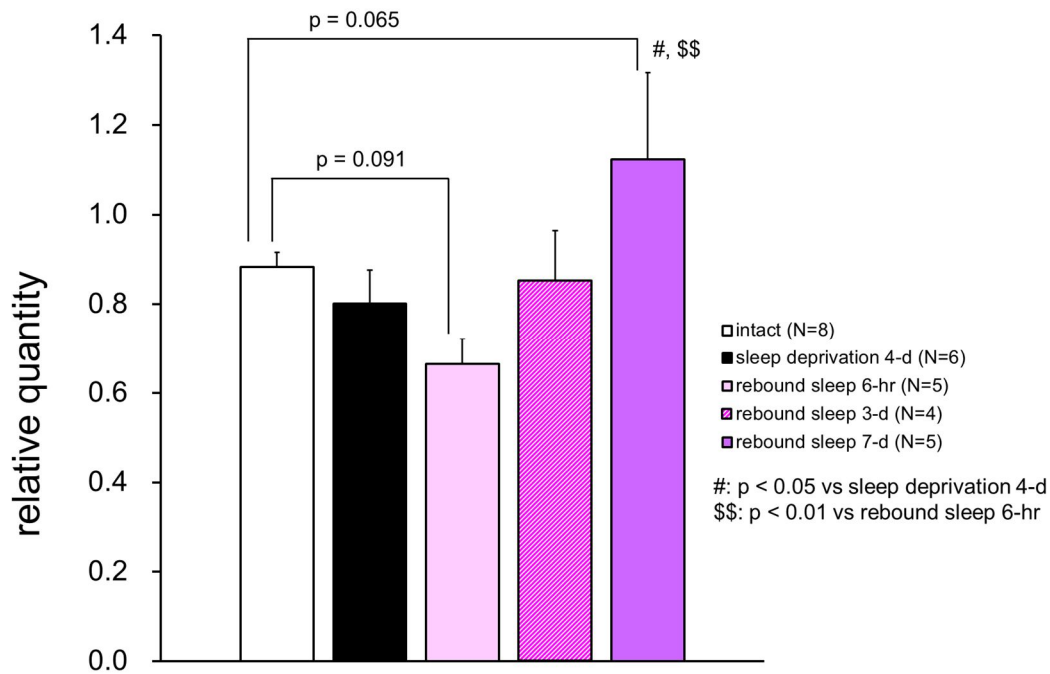


図1 . 96時間の断眠処置直後、6時間、3日または7日間のリバウンド睡眠を経たラット海馬 neurotensin 遺伝子の mRNA レベル

以上の結果から、断眠処置後に誘発される「リバウンド睡眠」は神経の成長や修復に関わる Bdnf 遺伝子の transcript variants レベルの増加、神経機能の調節に重要なグルタミン酸受容体の種々のサブタイプをコードする遺伝子 mRNA レベルの発現制御、そして neurotensin 遺伝子 mRNA の経時的な変動を通じて、睡眠不足により損傷を受けた神経細胞の回復に寄与する可能性が示された。今後、neurotensin の protein レベルに関する定量および海馬内での局在について解明するとともに、neurotensin およびその受容体リガンドの生体投与がどのような行動学的・分子生理学的変化をもたらすかについて評価して行く必要があるだろう。

<引用文献>

- 1) 厚生労働省. 2017年「国民健康・栄養調査」
- 2) Irwin MR, *Annu Rev Psychol.*, 66:143-172, 2015.
- 3) Murata Y et al., *J Affect Disord.*, 150:1209-1212, 2013.
- 4) Aid T et al., *J Neurosci Res.*, 85:525-535, 2007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山絵美莉、村田雄介、平田梨沙、林田美佳、森征慶、寺井大輝、大江賢治、遠城寺宗近
2. 発表標題 睡眠不足の蓄積による中枢神経系のダメージは限られた睡眠時間におけるLavender精油曝露で回復できるか？
3. 学会等名 第139回日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田梨沙、村田雄介、横山絵美莉、森征慶、寺井大輝、大江賢治、遠城寺宗近
2. 発表標題 睡眠不足の蓄積が海馬にもたらす悪影響の経時的変化
3. 学会等名 第139回日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福岡慶祐、村田雄介、音丸智美、平田梨沙、横山絵美莉、森征慶、大江賢治、遠城寺宗近
2. 発表標題 睡眠が疲労および疲労回復マーカーに与える影響
3. 学会等名 第15回 日本疲労学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 音丸智美、村田雄介、福岡慶祐、平田梨沙、横山絵美莉、森征慶、寺井大輝、大江賢治、遠城寺宗近
2. 発表標題 sleep rebound による脳内グルタミン酸受容体発現レベルの経時的変化
3. 学会等名 第140回日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田雄介、福岡慶祐、音丸智美、寺井大輝、原田洸秀、森征慶、大江賢治、遠城寺宗近
2. 発表標題 断眠およびリバウンド睡眠条件下における統合的ストレス応答関連遺伝子の発現プロファイル
3. 学会等名 第140回日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田雄介
2. 発表標題 リバウンド睡眠による海馬ニューロン新生増加作用は脳内セロトニンを介して発現する
3. 学会等名 第28回日本臨床精神神経薬理学会・第48回日本神経精神薬理学会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗山透、村田雄介、白岩真実、橋詰舞、成富由佳、松尾友美、森征慶、大江賢治、遠城寺宗近
2. 発表標題 リバウンド睡眠により誘発される海馬神経新生増加現象を抗うつ薬の亜慢性投与が増強する
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福岡大学薬学部臨床薬物治療学教室ホームページ
<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/yakuchi>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----