

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23783

研究課題名(和文) 睡眠を制御する脳領域および神経細胞タイプの解明

研究課題名(英文) Elucidation of brain regions and cell types in the regulation of sleep

研究代表者

古部 瑛莉子 (Furube, Eriko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30845566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスにグラム陰性菌の細胞壁を構成するLPSの脳室内投与を行い、炎症性の睡眠・覚醒異常を生じさせた際のSIK3の影響を検討した。野生型マウスにLPSを脳室内投与した結果、覚醒時間が減少し、睡眠深度の指標であるNREMデルタが増加し、NREM睡眠時間の増加、REM睡眠の顕著な減少が見られた。一方で、SIK3のリン酸化機能を向上させたマウスではそれらの変化は減弱していた。免疫組織学検討の結果、SIK3を発現しているのはNeuN陽性の神経細胞であった。また、野生型マウスにLPSを脳室内投与した結果、視床下部外側野の神経細胞でのHDAC4核移行が抑制されることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
生体が細菌やウイルスに感染すると、サイトカインの産生を促進し、発熱や食欲抑制に加えてNREM睡眠の増加・REM睡眠の減少につながる。本研究で見られたNREM睡眠の増加やREM睡眠の減少、脳波の異常も脳内でのサイトカイン濃度の変化による影響を受けたものであることが考えられる。LPS脳室内投与によるLHでのSIK3下流に存在するHDAC4の活性化の抑制は、SIK3がオレキシン神経による覚醒・睡眠制御および炎症抑制経路に関わっている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of SIK3 on causing inflammatory sleep / wake abnormalities in mice by intracerebroventricular(icv) administration of LPS, which constitutes the cell wall of Gram-negative bacteria. As a result of icv administration of LPS to wild-type mice, wake time decreased, NREM delta, which is an index of sleep depth, increased, NREM sleep time increased, and REM sleep decreased significantly. On the other hand, these changes were diminished in transgenic mice with enhanced SIK3 phosphorylation capacity. Immunohistochemical examination revealed that NeuN-positive neurons expressed SIK3. In addition, as a result of icv administration of LPS, it was found that HDAC4 nuclear translocation in neurons in the lateral hypothalamic area was suppressed in wild-type mice.

研究分野：神経解剖学

キーワード：salt induced kinase 3 炎症 睡眠

1. 研究開始当初の背景

近年、光遺伝学および化学遺伝学の技術の進歩により睡眠-覚醒に関わる詳細な神経回路の研究は進み、睡眠と覚醒の切り替えが前脳基底領域、外側視床下部、青斑核などの特定の神経によって行われ、NREM と REM 睡眠の切り替えは橋や延髄の神経によって行われることが分かってきた。神経回路の研究は進んでいる一方、睡眠と覚醒および NREM 睡眠と REM 睡眠の必要量を規定する恒常的な眠りの調節を行う分子機構は分かっていなかった。そのような中、2016 年に新規睡眠制御分子としてリン酸化酵素 SIK3 が同定された。Sik3 はエキソン 13 領域を欠損するとリン酸化活性が上昇して機能獲得型変異となり、変異型 SIK3 を発現するマウス(Sleepy マウス)は睡眠欲求が強く、NREM 睡眠時間が顕著に増大する表現型となる。その後、SIK3 がシナプス関連蛋白質のリン酸化を介して神経伝達を調節することが示され、シナプス関連蛋白質のリン酸化度合いが断眠による眠気の強さと相関することが分かってきた。シナプスの形態は睡眠覚醒状態と連動して変化していることから、SIK3 によるシナプス関連蛋白質のリン酸化が眠気の実体であり、さらに NREM 睡眠量の制御を行っている可能性が示唆される。しかし、SIK3 が実際に機能する脳部位やニューロンタイプが分かっていないため、具体的にどの神経回路で働くことが眠気につながり、NREM 睡眠へ影響を与えるのか不明である。

2. 研究の目的

SIK3 は炎症に関わることも報告されており、SIK3 欠損マクロファージが LPS による炎症性分子である iNOS、IL-6 および IL-12p40 のレベルを増加させ、マウスのエンドトキシンショックを悪化させることが報告されている。SIK3 の基質の一つがクラス IIa ヒストンデアセチラーゼ (HDAC4、HDAC5、HDAC7、および HDAC9) であることが報告されており、炎症に反応して SIK3 の活性化がマクロファージ HDAC4 の核外輸送を促進することが分かっている。脳内では HDAC4 が広く神経細胞に発現し、シナプス可塑性や生存に関わっていることがわかっている。本研究では、研究を進めていく中で得られた LPS 脳室内投与によって誘導される脳内炎症性の睡眠変化を SIK3 が緩和することから、SIK3 による睡眠覚醒制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

【動物】

C57BL/6N マウス (日本クレア株式会社) および Sleepy マウスを実験に使用した。マウスは、12:12 時間の明/暗サイクルおよび管理された温度・湿度条件下で飼育された。すべての実験は、東邦大学施設内の動物管理使用委員会による承認を得て行った。

【EEG/EMG 電極移植手術】

4 本の EEG 電極ピン (AP: 0.5 mm、ML: 1.3 mm、DV: -1.3 mm; および AP: -4.5 mm、ML: 1.3 mm、DV: -1.3 mm) と 2 本の EMG ワイヤーを備えた EEG/EMG 電極を、イソフルランを使用した麻酔下でマウスに取り付けた。EMG 記録用の 2 本のワイヤーは首の筋肉に挿入した。

【脳室内投与】

脳室内へ LPS 投与を行うために、麻酔下にあるマウスにステンレスカニューレ (25 ゲージ) を設置し、その先端が側脳室 (AP: 0.3 mm、ML: 1.0 mm、DV: -2.5 mm) になるようにしました。手術は EEG/EMG 電極移植手術時に同時に行った。LPS は 055:B5 セロタイプ、300 ng/kg の濃度で流速 3 μ g/分で投与した。

【睡眠覚醒記録】

脳波 (EEG) /筋電図 (EMG) データは MatLab (MathWorks) ベースのプログラムを使用して視覚化および分析され、その後目視による検討を行った。EEG が読み取れない動物は除外した。マウスに 10~16 週齢で EEG/EMG 電極を移植し、14~24 週目に EEG/EMG 信号を記録しました。EEG/EMG データの EEG 信号には 1~30Hz の高速フーリエ変換分析を行った。ノンレム睡眠は EEG に 1-4Hz を多く含み、EMG の振幅が小さい波形とし、レム睡眠は EEG に 6-10Hz を多く含み、振幅の非常に小さい EMG を示す波形とした。覚醒はレム睡眠時の脳波パターンと似た波形を持ち EMG の振幅が大きいものとした。

【免疫組織化学】

マウスを麻酔下にて開胸し、リン酸緩衝生理食塩水を経心還流することで脱血し、4% paraformaldehyde (PFA) を経心灌流し固定した。全脳摘出後、4% PFA 中において 4°C で 24 時間後固定した後、30% スクロース溶液に置換して 4°C で一晩静置した。脳は -80°C で凍結しミクロトームを用いて厚さ 15 μ m の凍結切片を作製した。切片を 5% NGS / 0.3% Triton-X / PBS で 4°C にて 24 時間ブロッッキングを行い、1% NGS/0.3% Triton-X/PBS に希釈した一次抗体と 4°C で二晩反応させた。一次抗体反応後、二次抗体 Alexa Fluor 488 および Alexa Fluor 594 標識抗体を 0.3% Triton-X/PBS で希釈し室温で 120 分間反応させた。核染色には DAPI を使用し、15 分間室温で反応させた。

【統計分析】

ZT 時間内の対応する状態の絶対および相対パワースペクトル分析を行った。相対パワースペクトル分析 (%) の場合、各周波数の EEG パワーは、すべての周波数 (1~30 Hz) にわたる合計パワーのパーセンテージとして表された。絶対 NREMS デルタ密度は NREMS のデルタ帯域によって規定され、ベースライン記録日の ZT8 から ZT11 の間の平均 NREMS デルタに正規化されている。相対デルタ密度 (%) は、NREMS の総 EEG に対するデルタ (1~4 Hz) の比率によって定義した。

4. 研究成果

リン酸化機能向上型 SIK3 発現による脳内炎症時の覚醒・睡眠への影響

まず、野生型マウスに LPS の脳室内投与を行い、脳内炎症による睡眠への影響を検討した。マウスは多相性の睡眠様式であり、一日に何度も眠る。そのため NREM 睡眠に特徴的なデルタ (1~4 Hz) 密度の高い時間が断続的にみられ、その出現頻度は暗期と比べて明期でより出現頻度が多いことがわかる (図 1)。これに対して、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) を脳室内投与すると投与後 14-19 時間デルタパワーの増加が見られるようになった (図 1、2)。これに対し、リン酸化能向上型 SIK3 遺伝子を発現する sleepy マウス 2 では LPS 脳室内投与によるデルタパワーの増加が見られなかった。

覚醒期のスペクトラム解析では、野生型マウスに LPS を脳室内投与すると vehicle 投与群と比較して 8-12Hz 帯のパワー密度が低下していた。一方、LPS を投与された sleepy マウスでは野生型で見られるような差はなかった (図 2)。睡眠時の変化としては野生型マウスに LPS を投与すると NREM 睡眠時間が上昇し、REM 睡眠が顕著に減少していた。NREM 睡眠時のパワー密度は LPS を投与した野生型マウスで 8-16Hz 帯が減少したが sleepy マウスでは変化が見られなかった (図 2、3)。LPS 投与時の REM 睡眠のパワー密度は野生型、sleepy マウス 5-7Hz 帯が上昇しており、また 16-30Hz 帯が野生型、sleepy マウスで減少し sleepy マウスで顕著であった (図 2)。さらに、LPS 投与後から最初の REM 睡眠が開始されるまでの時間を計測したところ、LPS を投与した群では野生型、sleepy とともに vehicle 投与群と比較して遅くなったが sleepy マウスでは野生型と比較して大きく改善していた (図 2)。

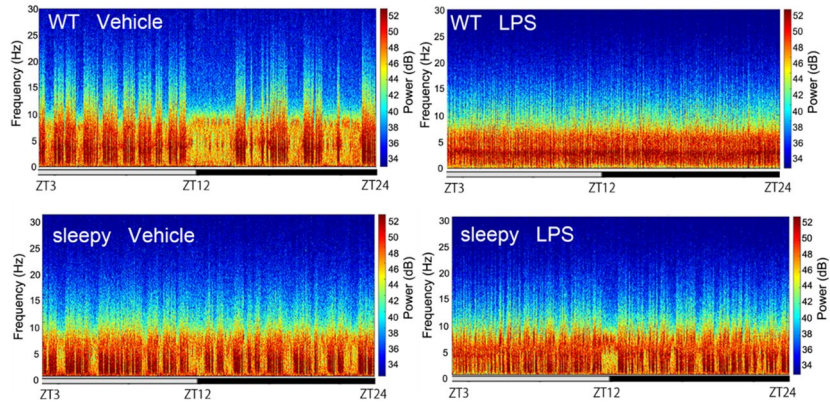
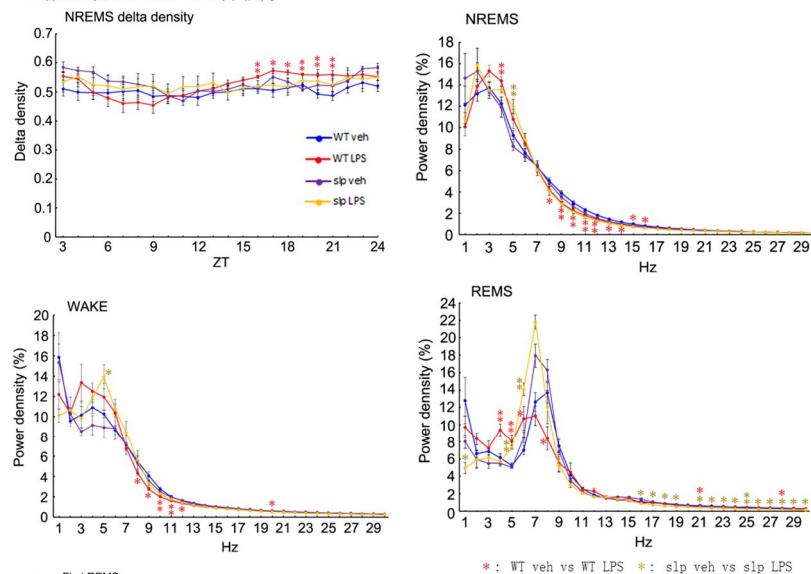


図 1 野生型マウスに LPS を脳室内投与すると投与後 NREM デルタパワーの増加が見られるようになるが (上段)、リン酸化能向上型 SIK3 遺伝子を発現する sleepy マウスではデルタパワーの増加は見られなかった (下段)。



*: WT veh vs WT LPS *: slp veh vs slp LPS

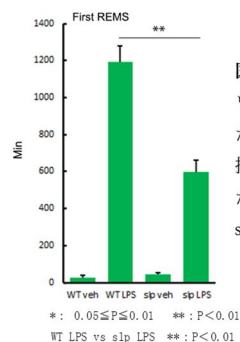


図 2 LPS を脳室内投与すると投与後 14-19 時間に NREM デルタパワーの増加が見られるようになり NREM パワー密度も変化が見られたが、sleepy マウスでは増加が見られなかった (上段、中段)。LPS 投与後最初の REM 睡眠が開始されるまでの時間は、LPS を投与した群で野生型、sleepy とともに vehicle 投与群と比較して遅くなったが sleepy マウスでは野生型と比較して大きく改善していた (左)。

*: 0.05 ≤ P ≤ 0.01 **: P < 0.01
WT LPS vs slp LPS **: P < 0.01

通常、SIK3 の脳内での発現細胞は神経細胞である。しかし末梢では炎症時にマクロファージで発現が誘導されるため、LPS を脳室内投与した時の SIK3 発現細胞について免疫組織学検討を行った。その結果、脳内においては LPS を投与した後も SIK3 を発現しているのは神経細胞であった(Data not shown)。次に SIK3 の下流のシグナル経路の検討を行った。その結果、LPS 投与を行った野生型マウスの外側視床下部で SIK3 のリン酸化標的であるヒストンデアセチラーゼ 4 (HDAC4) の核内移行が抑制されていることが判明した(図 3)。

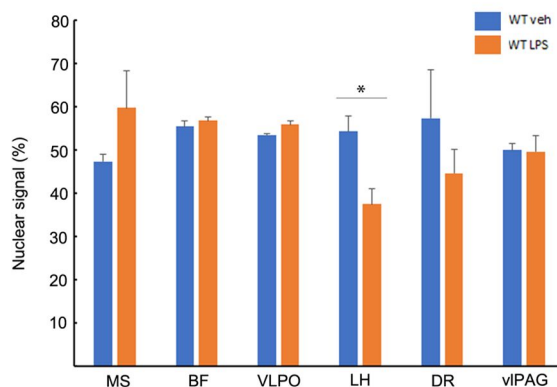


図 3

LPS 脳室内投与 6 時間後、野生型マウスの LH で SIK3 のリン酸化標的であるヒストンデアセチラーゼ 4 (HDAC4) の核内移行が抑制されていた。MS : 内側中隔核、BF : 大脳基底核、VLPO : 腹側外側視索前野、LH : 外側視床下部、DR : 背側縫線核、VIPAG : 腹外側中脳水道周囲灰白質

引用文献

1. Weber, Control of REM sleep by ventral medulla GABAergic neurons., *Nature*, 526: 435–438, 2015
2. Funato, Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice., *Nature*, 539: 378–383, 2016
3. Wang, Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need., *Nature*, 558(7710):435-439, 2018
4. Vivo, Ultrastructural evidence for synaptic scaling across the wake/sleep cycle., *Science*, 355(6324): 507-510, 2017
5. Sanosaka, Salt-inducible kinase 3 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of pro-inflammatory molecules in mice., *Immunology*, 145(2): 268–278, 2015
6. Walkinshaw, Dephosphorylation at a conserved SP motif governs cAMP sensitivity and nuclear localization of class IIa histone deacetylases., *J Biol Chem*, 22;288(8):5591-605, 2013
7. Darcy, Regional and subcellular distribution of HDAC4 in mouse brain., *J Comp Neurol*, 1;518(5):722-40, 2010
8. Irwin, Sleep and inflammation: partners in sickness and in health., *Nature Reviews Immunology*, 19: 702–715, 2019
9. Besedovsky, The Sleep-Immune Crosstalk in Health and Disease., *Physiol Rev*, 99(3): 1325–1380, 2019
10. Lowson, Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression - like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice., *Journal of Neuroinflammation*, 10:54, 2013
11. Clark, Inflammation-sleep interface in brain disease: TNF, insulin, orexin., *J Neuroinflammation*, 21;11:51, 2014
12. Yamanaka, Regulation of Orexin Neurons by the Monoaminergic and Cholinergic Systems., *Biochem Biophys Res Commun*, 303 : 120-129, 2003

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古部瑛莉子
2. 発表標題 リン酸化酵素SIK3が睡眠を制御する脳領域および神経細胞種の同定
3. 学会等名 第157回東邦医学会例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------