

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32661

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20699

研究課題名（和文）2作動性鎮静薬の鎮静催眠作用回路の解明

研究課題名（英文）Neuronal circuit for sedative/hypnotic actions of alpha-2 adrenergic agonist

研究代表者

山形 朋子（Yamagata, Tomoko）

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：90584433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、アドレナリン 2受容体作動性鎮静薬であるデクスメドトミジンの作用機序を、薬理遺伝学・光遺伝学手法により、神経回路レベルから解明することを目指した。特定の神経細胞群を活動依存的に可視化する遺伝学的手法（TRAP）により、2作動性鎮静薬であるデクスメドトミジン投与によって活性化される細胞群を見出した。さらに、それらの細胞群の薬理的・光遺伝学的操作により、鎮静および睡眠覚醒への関与を因果的に検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2作動薬のデクスメドトミジンは、術前・術後の鎮静薬として臨床の場でひろく使われているが、どのように鎮静作用が出現するのか、また、なぜこの薬による鎮静が深いノンレム睡眠様の脳波を誘発し、かつレム睡眠を抑制するかは不明なままである。本研究は、鎮静時に活性化される神経回路についてその睡眠・覚醒への役割を検証した。鎮静と睡眠・覚醒の神経基盤について明らかにしたという点で、学術的に意義がある。

研究成果の概要（英文）：Dexmedetomidine, an alpha 2 agonist, is widely used in clinical practice as a pre- and post-operative sedative, but it remains unclear how it exerts its sedative effects and why it induces deep non-REM sleep-like EEG and inhibits REM sleep. To this end, this study aimed to elucidate the neuronal mechanism of sedation by dexmedetomidine (DEX), an adrenergic 2-receptor agonist, using pharmacogenetic and photogenetic methods. By using a genetical method to visualize specific neuronal cell populations in an activity-dependent manner (TRAP), we identified cell populations that are activated by DEX. We further manipulated those cell populations pharmacogenetically and optogenetically and examined the causal role of those cells on sedation and sleep/arousal.

研究分野：神経生物学

キーワード：睡眠 鎮静 2作動薬 デクスメドトミジン マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アドレナリン $\alpha 2$ 受容体作動性鎮静薬 ($\alpha 2$ 作動薬) のデクスメデトミジンは深いノンレム睡眠様の脳波を伴った鎮静をもたらすが、その機序は不明である。研究代表者はこれまでに、光遺伝学的手法によりマウス視床下部の視索前野の GAD2 神経細胞群を活性化すると、デクスメデトミジンによる鎮静および睡眠から覚醒が促進されることを突き止めた。

2. 研究の目的

本研究は鎮静と睡眠、覚醒の関係を紐解くべく、 $\alpha 2$ 受容体を介した鎮静作用の発現に関わる神経回路が、睡眠/覚醒を促す神経回路とどのような関係にあるのかを明らかにすることを目的とした。目的の達成のため、細胞活動依存的な遺伝子発現が可能な TRAP マウスと、脳内へのウイルス局所注入法を用いて、 $\alpha 2$ 受容体のアゴニスト、アンタゴニスト、断眠覚醒時および断眠後の深い睡眠に応答する神経細胞群を、解剖学的手法により広く探索することとした。さらに、それらの鎮静作用、睡眠・覚醒促進のための候補細胞群に対し、薬理遺伝学・光遺伝学手法を用いて特異的に活性化・抑制することで、因果的にその関与を検証することとした。以上により、鎮静作用回路と睡眠促進回路の共通回路に関して知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

【1】 鎮静時に活性化される神経細胞群を可視化する

活動したニューロン特異的に遺伝子を発現させることができる Fos-Cre (TRAP) マウス系統、および、蛍光レポーターマウス系統 (Ai9) を交配して、Fos-Cre; Ai9 マウス系統を作出した。そのマウスに、 $\alpha 2$ 作動薬デクスメデトミジンによる鎮静時に TRAP アクティベータである 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) を注入し、鎮静時に活性化された細胞群に特異的に赤色蛍光標識タンパク質の発現を誘導した。マウスを還流して蛍光顕微鏡で脳切片を撮像し、画像処理ソフトウェア ImageJ により蛍光発現細胞を特定することで、鎮静時に活性化された神経細胞群の局在を調べた。

【2】 鎮静時に活性化される神経細胞群と、麻酔時・睡眠時・覚醒時に活性化される細胞群を比較する

1と同様の手法を用いて、イソフルラン麻酔時、断眠覚醒時、夜間覚醒時、睡眠時、断眠後の回復睡眠時に活性化された神経細胞群を探索した。さらに、鎮静時の TRAP により赤色蛍光タンパク質の発現を誘導したのちに、睡眠時に還流して cfos 発現細胞を緑色蛍光タンパク質で標識することにより、鎮静時活性化細胞と睡眠時活性化細胞の二重蛍光標識を行った。

【3】 鎮静時および睡眠時に活性化された細胞群について因果的に検証する

1、2で標識された鎮静時活性化細胞が、鎮静作用・睡眠促進作用を有するかどうかを光遺伝学的に検証した。鎮静時活性化細胞群を狙って、光駆動型イオンチャネルが TRAP 条件下でのみ神経細胞に発現するようデザインされたアデノ随伴ウイルス (AAV-hSyn-flox-ChR2) を脳内局所微量注入し、脳波・筋電記録デバイスをマウス頭蓋に装着した。手術からの回復後に、鎮静条件下で TRAP 操作を行い、ウイルス発現ののち、脳波・筋電計測下で、光照射による ChR2 発現細胞の活性化を行い、鎮静時応答細胞の活性化による覚醒度の変化を調べた。

4. 研究成果

【1】の $\alpha 2$ 作動薬および【2】のイソフルラン麻酔による鎮静作用時における TRAP 操作により、視床下部 (図 1、視索前野、視索上核、室傍核、外側視床下部、背外側視床下部)、視床 (視床室傍核)、扁桃体 (扁桃体中心核)、大脳皮質 (体性感覚野) などの領野で、鎮静作用時に活性化される細胞群があることが明らかになった。

さらに、【1】、【2】により、鎮静作用時と睡眠時・回復睡眠時とで活性化された脳領域を比較したところ、まず全体として、鎮静作用時と睡眠時で活性化される脳領域の一致率は想定よりも低く、そもそも2条件での共発現が見られる領域は限定的であった。一方で、覚醒時ないしは $\alpha 2$ 拮抗薬投与による覚醒時に活性化された領域を鎮静時と比較したところ、鎮静・覚醒いずれの条件でも活性化された領域はあったものの、全体的な発現傾向は鎮静時と覚醒時で異なっていた。すなわち、鎮静時に活性化される領域は睡眠時とも覚醒時とも異なっていた。

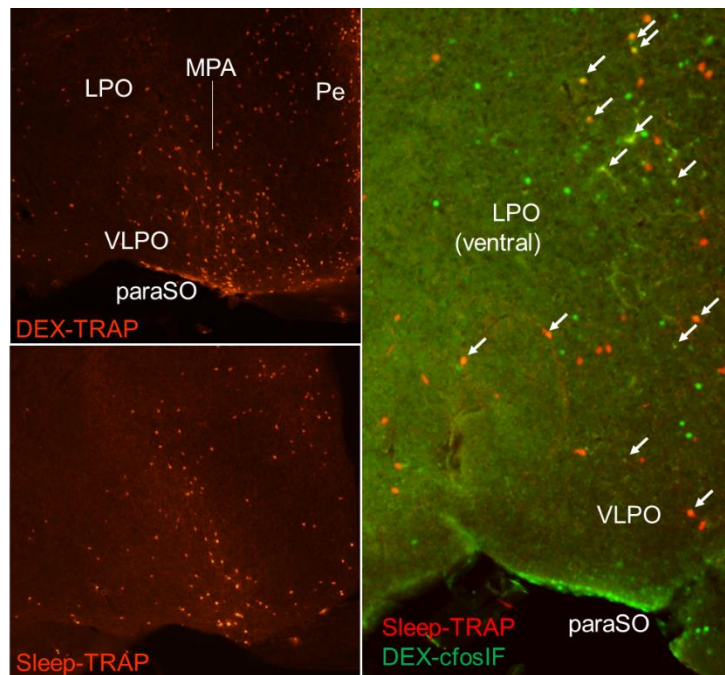


図1. 睡眠時、鎮静時に活動した視床下部 (LPO, VLPO, MPA, Pe), 視索上核周辺部 (paraSO) の細胞

【3】による、鎮静時に活性化される細胞群は睡眠を促進するか、という因果的な検証のために、先行研究において麻酔時に活性化され、かつ睡眠を誘発したとの報告がある視索上核、これまで研究代表者らにより睡眠覚醒への寄与が確かめられてきた視索前野を光再活性化したところ、短期的な応答としては明確に覚醒が誘発された (図2)。すなわち、鎮静時に応答した細胞群は睡眠を促進しなかった。ただし、現在の方法では異なる神経核をまとめて活性化している可能性が高く、手法の改善の余地がある。今後は逆行性ウイルスを用いた神経回路特異的な光遺伝学的検証、およびファイバーの形状を特殊な形状にするなどのハード面での改良により、鎮静・睡眠促進集団が見つかる可能性はある。ただし、これまでの結果から暫定的な結論を出すと、視床下部の視索前野・視索上核周辺部において鎮静作用時に活性化されている細胞群は、直接的に睡眠を促進する細胞群ではなく、さらに、神経細胞レベルでは鎮静作用回路と睡眠促進回路が大きく異なる可能性がある。

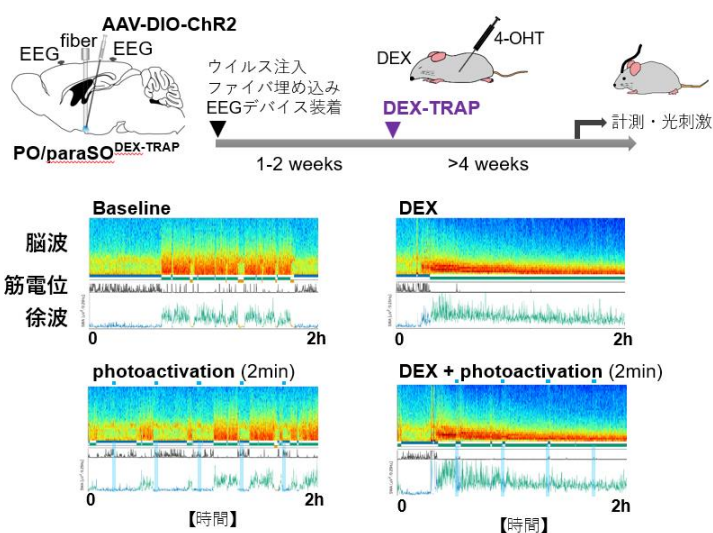


図2. 鎮静時に活性化された視索上核細胞の光再活性化は覚醒を促進した

研究活動スタート支援により、 $\alpha 2$ 受容体作動薬による鎮静の脳内機序を探るための研究基盤の整備、すなわち、マウス系統の樹立、慢性脳波計測システム、薬理・光遺伝学的実験のセットアップが完了した。今後は、構築した実験系を用いて、鎮静・睡眠の促進神経回路を探るという視点に加えて、本研究の実施により新たに立てられた仮説、すなわち、 $\alpha 2$ 作動薬などによる鎮静時の意識低下は、特定の神経細胞群が促進するのではなく、覚醒時に活性化されていた神経細胞の活動が抑制されることにより生じるとの機能仮説を検証していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hannah Alfonsa, Richard J. Burman, Paul J. N. Brodersen, Sarah E. Newey, Kashif Mahfooz, Tomoko Yamagata, Marios C. Panayi, David M. Bannerman, Vladyslav V. Vyazovskiy, Colin J. Akerman	4. 巻 26
2. 論文標題 Intracellular chloride regulation mediates local sleep pressure in the cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 64-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-022-01214-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomoko Yamagata, Martin C. Kahn, Jose Prius-Mengual, Elise Meijer, Merima Sabanovic, Mathilde C. C. Guillaumin, Vincent van der Vinne, Yi-Ge Huang, Laura E. McKillop, Aarti Jagannath, Stuart N Peirson, Edward O. Mann, Russell G. Foster, and Vladyslav V. Vyazovskiy	4. 巻 118
2. 論文標題 The hypothalamic link between arousal and sleep homeostasis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2101580118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2101580118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Lukas B. Krone, Tomoko Yamagata, Cristina Blanco-Duque, Mathilde C. C. Guillaumin, Martin C. Kahn, Vincent van der Vinne, Laura E. McKillop, Shu K. E. Tam, Stuart N. Peirson, Colin J. Akerman, Anna Hoerder-Suabedissen, Zoltan Molner, Vladyslav V. Vyazovskiy	4. 巻 24
2. 論文標題 A role for the cortex in sleep-wake regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1210-1215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-021-00894-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Linus Milinski, Simon P. Fisher, Nanyi Cui, Laura E. McKillop, Cristina Blanco-Duque, Gauri Ang, Tomoko Yamagata, David M. Bannerman, Vladyslav V. Vyazovskiy	4. 巻 19
2. 論文標題 Waking experience modulates sleep need in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-021-00982-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Paul J. N. Brodersen, Hannah Alfonsa, Lukas B. Krone, Cristina Blanco Duque, Angus S. Fisk, Sarah J. Flaherty, Mathilde C. C. Guillaumin, Yi-Ge Huang, Martin C. Kahn, Laura E. McKillop, Linus Milinski, Lewis Taylor, Christopher W. Thomas, Tomoko Yamagata, Russell G. Foster, Vladyslav V. Vyazovskiy, Colin J. Akerman	4. 巻 -
2. 論文標題 Somnotate: An accurate, robust, and flexible sleep stage classifier for the experimentalist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.10.06.463356	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tomoko Yamagata, Stuart N. Peirson, Edward O. Mann, Russell G. Foster, Vladyslav V. Vyazovskiy
2. 発表標題 Rapid state reversibility from deep dexmedetomidine sedation induced by photoactivation of lateral preoptic GAD2 neurons in mice
3. 学会等名 SfN2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Toho University Department of Anatomy https://www.toho-funatolab.jp/ 理研CBS 思考・実行機能研究チーム https://www.kentaromiyamoto-lab.com/

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