

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20675

研究課題名（和文）摘出脳を用いた概日リズム中枢と睡眠制御領域の相互作用の解明

研究課題名（英文）Interaction between circadian rhythm and sleep regulation.

研究代表者

山口 翔（Yamaguchi, Sho）

北海道大学・医学研究院・博士研究員

研究者番号：50964491

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、爬虫類の一種、オーストラリアドラゴンを用いて概日リズム研究を行った。生体を用いた実験では、動物を恒暗条件下に入れ、行動と睡眠・覚醒の記録を行った。その結果、ドラゴンの行動および睡眠・覚醒は恒暗条件下においても明瞭な概日リズムを示すことを発見した。また、スライス脳標本の作製を行い、神経活動記録を試みた。本研究により、オーストラリアドラゴンが概日リズム研究にも有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、オーストラリアドラゴンの行動および睡眠・覚醒が恒暗条件下においても明瞭な概日リズムを示すことを明らかにした。この結果は、オーストラリアドラゴンが概日リズム研究においても有用であることを示す。これは、今後、展開を予定している爬虫類を用いた概日リズム研究の重要な基盤となる。将来的には、種を超えた概日リズム制御機構の解明に寄与し、概日リズム関連疾患の理解や治療法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted research on the circadian rhythms using a species of reptile, the Australian dragon. We placed them under constant darkness conditions and recorded their behaviors, as well as sleep-wake cycles. As a result, we discovered that the behaviors and sleep-wake cycles of the dragons exhibit clear circadian rhythms even under constant darkness conditions. Additionally, we prepared brain slice samples and attempted neural activity recordings. This study demonstrates the utility of the Australian dragon in circadian rhythm research.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 睡眠 爬虫類

1. 研究開始当初の背景

多くの動物が一日の決まった時間に睡眠を取るが、そのタイミングの制御には概日リズムが重要である。概日リズムはスライス脳標本でも維持され、この系を利用することで概日リズムの研究は大きく進展した。一方で、睡眠研究は *in vivo* 標本を用いて、複数の脳領域が睡眠制御に関わることを明らかにしてきた。しかし、概日リズムが睡眠のタイミングを決定する神経機構は殆どわかっていない。脳内に存在する概日リズム中枢の破壊が睡眠覚醒リズムの破綻や睡眠行動の断片化を引き起こし、一方で、概日リズム中枢の活動が睡眠状態依存的に変化することから、概日リズム中枢と睡眠制御脳領域は相互に影響することが示唆されている。しかし、睡眠制御領域の同定に用いられてきた *in vivo* 標本は適用できる手法が限られており、複数領域の同時計測が困難であることから、概日リズム中枢と複数存在する睡眠制御領域の生理学的な相互作用は不明なままである。この課題に挑むためには、そのような技術的制約を解決できる新たな実験系が必要である。

そこで、申請者は爬虫類であるオーストラリアドラゴン (*Pogona vitticeps*, 以下ドラゴン) に着目した。ドラゴンの脳は低酸素条件に強く、摘出した全脳から数日間にわたり自発的な神経活動を記録できる。この特徴から、ドラゴンの摘出全脳標本であれば、脳領域間のつながりを維持したまま、さまざまな計測手法および操作を自由に組み合わせて長時間適用することができる。もし、この摘出全脳標本で概日リズムを再現することができれば、概日リズム中枢の入出力を評価することが可能となる。しかし、ドラゴンを用いた概日リズム研究は乏しく、その行動や睡眠・覚醒が概日リズムを示すのかは明らかではない。

以上のことから、本研究では、ドラゴンの *in vivo* 標本を用いて、行動および睡眠・覚醒の概日リズムを探索するとともに、*in vitro* 標本を用いて神経活動の概日リズム抽出を試みる。これらの実験を通して、爬虫類を用いた概日リズム研究の基盤形成を行う。

2. 研究の目的

本研究では、近年、睡眠研究に導入されたオーストラリアドラゴンを用いて、行動および睡眠・覚醒の概日リズムの観察を行う。また、*in vitro* 標本から神経活動の記録を行い、概日リズムの抽出を試みる。以上を通して、爬虫類を用いた概日リズム研究の基盤形成を行う。

3. 研究の方法

(1) 生体を用いた概日リズム解析

脳に電極を留置したオーストラリアドラゴンを 30 に保温したインキュベーターに入れ、12 時間明期：12 時間暗期の明暗条件あるいは、光が全くつかない恒暗条件下で、動画撮影と局所場電位の記録により、動物が示す行動の概日リズムの検出を行った。

行動リズム解析

動物の入ったケージの真上に設置したカメラで動画を撮影し、得られた動画データに対して、フレーム間差分法を適用することで、動物の活動を検出した。

体表色変動の解析

動画データから、機械学習を利用した動物の追跡ソフトウェア DeepLabCut を用いて、動物の背中の一部を追跡した。その座標データをもとに、背中の一部の輝度を取得した。

睡眠・覚醒リズム解析

動物の背側脳室隆起に留置した電極から、局所場電位の記録を行った。このデータに対し、周波数解析を行うことで、動物の睡眠状態の解析を行った。

(2) スライス脳標本からの神経活動記録

オーストラリアドラゴンのスライス脳標本を作製し、多点電極アレイによる神経活動の記録を行った。

4. 研究成果

(1) 生体を用いた概日リズム解析

行動リズム解析

恒暗条件下に入れた動物の行動量を算出したところ、明暗条件下での行動量と比べて、大きく減少していた。しかしながら、行動量が明期に高く、暗期に低いという昼行性の行動パターンは、恒暗条件下においても観察された。Lomb-Scargle periodograms により、行動リズムの周期長を算出したところ、計測を行った 7 匹すべてで、約 24 時間周期の有意なピークが検出された。このことから、ドラゴンの行動が内在の概日リズムによって制御されていることが示唆された。

また、恒暗条件下での測定後に明暗条件下に戻したところ、恒暗条件下で減少した行動量が、元の明暗条件下での行動量と同程度まで回復した。この結果から、光条件がドラゴンの行動量に影響することが明らかになった。

体表色変動の解析

本研究で計測したドラゴンの行動では、計測を行ったすべての個体で有意な概日リズムが検出された。一方で、ドラゴンの体表色変動の概日リズムを調べた先行研究では、11匹中5匹と約半分の割合でしか概日リズムが観察されなかった。この割合の差が、計測するパラメーターの差によるものなのか、実験に使用した動物の個体差なのかを調べるために、本研究でも恒暗条件下に入れた動物の動画データをもとに、背中の一部の輝度値の変動を算出した。その結果、計測を行った7匹のうち4匹という約半分の割合で体表色変動の概日リズムが観察された。この割合が先行研究と一致していたことから、行動と体表色変動の概日リズムを示す割合の差は、実験に使用した動物の個体差ではなく、計測するパラメーターによる違いであることが示唆された。

睡眠・覚醒リズム解析

ドラゴンの背側脳室隆起から記録した局所場電位に対して、周波数解析を行い、睡眠時に特徴的な低周波活動を抽出することで、睡眠・覚醒状態の評価を行った。明暗条件下において、ドラゴンは夜間に入眠して明け方に覚醒する単相性の睡眠を示す。恒暗条件下においても、この特性はほとんど変化せず、本来夜である時間帯に、単相性の睡眠をとり、睡眠・覚醒のリズムは、24時間周期を維持した。上記の特徴は、計測を行った5匹中すべての個体で観察された。

(2) スライス脳標本からの神経活動記録

ドラゴンの視床下部周辺のスライス脳標本作成を行い、24時間以上連続して、多点電極アレイによる神経活動の記録を行った。その結果、特定の領域から記録を行った際に、約24時間の周期で発火頻度が変化する傾向がみられた。

本研究によって、ドラゴンの行動および睡眠・覚醒に内在の概日リズムがあることが明らかとなった。また、スライス脳標本においても神経活動リズムが観察されることが示唆された。以上の結果から、ドラゴンは、概日リズム研究にも有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamaguchi Sho T, Hatori Sena, Kotake Koki T, Zhou Zhiwen, Kume Kazuhiko, Reiter Sam, Norimoto Hiroaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Circadian control of sleep-related neuronal activity in lizards	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	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) 10.1093/pnasnexus/pgad481	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 -

1. 著者名 Mori D, Ikeda R, Sawahata M, Yamaguchi S, Kodama A, Hirao T, Arioka Y, Okumura H, Inami C, Suzuki T, Hayashi Y, Kato H, Nawa Y, Miyata S, Kimura H, Kushima I, Aleksic B, Mizoguchi H, Nagai T, Nakazawa T, Hashimoto R, Kaibuchi K, Kume K, Yamada K, Ozaki N	4. 巻 14
2. 論文標題 Phenotypes for general behavior, activity, and body temperature in 3q29 deletion model mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	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) 10.1038/s41398-023-02679-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 -

1. 著者名 Matsui Futaba, Yamaguchi Sho T., Kobayashi Riho, Ito Shiho, Nagashima Sakimi, Zhou Zhiwen, Norimoto Hiroaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Ablation of microglia does not alter circadian rhythm of locomotor activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Brain	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/s13041-023-01021-1	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 -

〔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 山口 翔、羽鳥 聖七、小竹 皓貴、周 至文、乗本 裕明
2. 発表標題 恒暗条件におけるAustralian dragonの睡眠
3. 学会等名 日本睡眠学会第45回定期学術集会・第30回日本時間生物学会学術大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 羽鳥聖七、山口翔、松井双葉、周至文、乗本裕明
2. 発表標題 Sleep homeostasis in lizards and the role of cortex
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長嶋咲未、小竹皓貴、山口翔、周至文、乗本裕明
2. 発表標題 一過的な低温条件への曝露が爬虫類の行動リズムに与える影響の解析
3. 学会等名 日本睡眠学会第45回定期学術集会・第30回日本時間生物学会学術大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口翔、羽鳥聖七、小竹皓貴、周至文、乗本裕明
2. 発表標題 Circadian rhythm in the Australian dragon
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長嶋咲未、小竹皓貴、山口翔、周至文、乗本裕明
2. 発表標題 Exploration of reptilian circadian rhythm
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川 晋太郎, 新屋 惣, 銅谷 理緒, Yared Beyene Yohannes, 小出 将士, 羽鳥 聖七, 山口 翔, 乗本 裕明, 池中 良徳, 中山 翔太, 石塚 真由美
2. 発表標題 Detection of anticoagulant rodenticides in wild Habu (<i>Protobothrops flavoviridis</i>) of Amami island and sensitivity test of several reptile species to anticoagulant rodenticides.
3. 学会等名 第29回日本野生動物医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 羽鳥聖七、山口翔、松井双葉、周至文、乗本裕明
2. 発表標題 Sleep homeostasis in lizards
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023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
---------	---------