

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590281

研究課題名(和文) 青斑核ノルアドレナリンニューロンの選択的破壊法を用いた睡眠・覚醒の神経機構の解明

研究課題名(英文) Study for the neuronal mechanisms in sleep/wake regulation by specific ablation of the noradrenergic neurons in the locus coeruleus

研究代表者

高橋 和巳 (Takahashi, Kazumi)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90325952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：イムノトキシン法によりLC-NAニューロンを選択的に破壊したマウスの覚醒・睡眠パターンを解析した結果、覚醒の出現頻度は多くなり、覚醒の平均持続時間が短くなった。浅い徐波睡眠の出現回数は多くなったが、平均持続時間に差はなかった。この結果は、LC-NAニューロンが覚醒の維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。一方で、徐波睡眠中に音刺激を与えたところ、頸部筋電活動に反応が見られる頻度が青斑核破壊によって増大したことから、LC-NAニューロンは外界からの刺激による覚醒反応の一部については抑制的に働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We made a specific lesion of the noradrenergic (NA) neurons of the locus coeruleus (LC) by applying immunotoxin to the transgenic mice expressing the alpha-subunit of human interleukin-2 receptor. During both light period and dark period, duration of each bout of wakefulness decreased and number of wakefulness increased in the NA-LC-ablated mice. In response to the sound stimuli applied during sleep, the occurrence probability of EEG desynchronization, the sign of wakefulness, was unchanged, while that of transient EMG activity with short latency was increased in the NA-LC-ablated mice. These results suggest that the NA-LC neurons have a role to maintain or stabilize the state of wakefulness.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：睡眠 覚醒 ノルアドレナリン 青斑核 マウス イムノトキシン

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに無麻酔のラット/マウスにおいて睡眠・覚醒ニューロン群の単一ユニット活動を記録し、睡眠・覚醒状態に関連した自発発火パターン、特に各状態間の移行期の活動変化の様子に注目して解析を行ってきた。その結果、青斑核(LC)のノルアドレナリン(NA)ニューロン群は上記の覚醒ニューロン群の中でも覚醒状態の開始期に最も早く活動を開始することが明らかになり、この群が覚醒の開始に重要な役割を果たすことが示唆された。また、睡眠の開始期には NA-LC ニューロンを含む覚醒ニューロン群の活動が有意に減弱もしくは完全に停止するが、それは視索前野の睡眠ニューロンが活動を開始する前であることがわかった。このことは睡眠の開始は睡眠ニューロンの活性化で始まるのではなく、覚醒ニューロン群の脱促進の連鎖が引き金となっている可能性を示している。また、NA-LC ニューロンは視索前野に投射し、この部位の覚醒ニューロンには興奮性、睡眠ニューロンには抑制性的の影響を与えていることが示されている。中脳の覚醒系ニューロンに対しては抑制性的の作用が知られている。

2. 研究の目的

本研究課題では、連携研究者の小林によって開発されたイムノトキシンを用いた選択的細胞破壊技術を NA-LC ニューロンに適用し、この破壊による睡眠・覚醒行動および睡眠・覚醒ニューロン群の活動を調べることで睡眠・覚醒の神経機構における NA-LC ニューロンの役割と重要性をさらに明らかにする。これまでも青斑核を対象とした局所破壊は試みられてきたが、破壊操作のニューロン選択性、破壊の完全性、補償性作用による二次的な変化の有無という点で疑問が残らざるを得なかった。このイムノトキシン法では、LC ニューロンで発現するドーパミン-水酸化酵素(DBH)の遺伝子プロモーターの制御下に、ヒトインターロイキン-2 受容体 サブユニット(IL-2R)を発現するトランスジェニックマウス(Tg)を利用する。このマウスの LC に組換え体イムノトキシン(IL-2R を選択的に認識する抗体可変部と細菌毒素の融合タンパク質)を注入することによって、LC ニューロンを選択的に破壊することができる。破壊後に軸索の再生等の二次的変化は観察されないため、LC ニューロンの役割の研究に有益である。

3. 研究の方法

麻酔下で Tg マウス及び野生型マウス(WT)の頭部に脳波電極の埋め込み手術を行い、回復後に自由行動下で睡眠・覚醒状態を記録する環境に慣れさせた(図1)。青斑核にイムノ

トキシンを局所注入する前と注入後2週間において脳波・筋電図を明期・暗期それぞれ10時間記録し、睡眠・覚醒状態を判定した。ユニット活動の記録では、マウスの頭部に固定具を無痛的に装着し、無麻酔下でガラス電極によって視床下部のオレキシンニューロンヒスタミンニューロンの活動を記録した。各トラックの記録終了後に電極から記録部位に色素を流し標識した。記録実験終了後、脳切片を作成し、チロシン水酸化酵素抗体を用いた免疫染色法によって LC-NA ニューロンのみが破壊されていることを確認した。



図1 睡眠・覚醒記録実験の様子

4. 研究成果

LC-NA ニューロンを破壊したマウスの覚醒・睡眠パターンを解析した結果、明期・暗期いずれにおいても覚醒、浅い徐波睡眠、深い徐波睡眠、レム睡眠それぞれの総時間は、TgとWTの間で差がなかった。覚醒の出現頻度はイムノトキシン注入後5日目からTgでWTより多くなり、覚醒の平均持続時間は注入後2日目からTgでWTより短くなった。浅い徐波睡眠の出現回数は注入後2日目から8日目までTgがWTより多くなったが、平均持続時間に差はなかった(図2)。これらの結果は、LC-NA ニューロンが覚醒の維持に重要な役割を果たしていることを示唆しており、その選択的破壊が覚醒の維持を困難にし、短い覚醒を頻発させたものと考えられる。一方で、徐波睡眠中に覚醒刺激として音刺激を与えたところ、Tgにおいて頸部筋電活動に反応が見られる頻度がイムノトキシン注入後に増大した(図3)ことから、LC-NA ニューロンは外界からの刺激による覚醒反応の一部については抑制性的の制御を行っている可能性が示唆された。また腹側視索前野の睡眠時に活動するニューロンや、視床下部後部のオレキシンニューロン、ヒスタミンニューロンなどの単一ニューロン活動を記録したが、TgとWTの間で有意な違いは見られなかった。

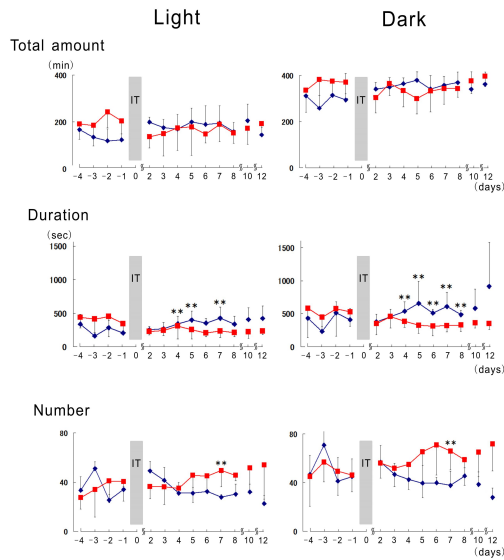


図2 青斑核破壊による覚醒時間の変化
 明期(左列)暗期(右列)ともに覚醒の持続時間が短くなった。

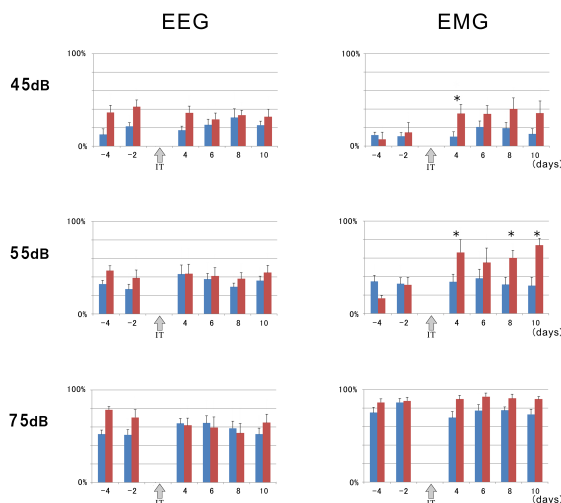


図3 音刺激に対する筋電反応の出現確率
 青斑核破壊により、睡眠中の音刺激への反応確率が上昇した。

5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 9 件)

高橋和巳
 睡眠・覚醒調節ニューロン群それぞれの違い第37回日本睡眠学会定期学術集会、平成24年6月29日、横浜市

今野浩平、末次隆宏、若林貴成、加藤渚、高橋和巳、小林和人、小山純正
 青斑核のノルアドレナリンニューロンの選択的破壊がマウスの睡眠・覚醒サイクルに与える影響について
 第37回日本睡眠学会定期学術集会、平成24年6月29日、横浜市

今野浩平、末次隆宏、若林貴成、加藤渚、高橋和巳、小林和人、井樋慶二、小山純正
 イムノトキシンによる青斑核ノルアドレナリンニューロンの選択的破壊がマウスの睡眠・覚醒サイクルに与える影響について
 第35回日本神経科学大会、平成24年9月20日、名古屋

高橋和巳
 Roles of noradrenergic and histaminergic neurons in arousal mechanisms 第90回日本生理学会大会、平成25年3月16日、東京都

K. TAKAHASHI, K. KONNO, T. SUETSUGU, T. WAKABAYASHI, N. KATO, K. KOBAYASHI, K. ITOI, Y. KOYAMA
 Effects of specific immunotoxic lesion of the noradrenergic neurons in the locus coeruleus on the state of wakefulness in mice
 Annual Meeting of Society for Neuroscience, 平成25年11月11日、San Diego

高橋和巳、今野浩平、井樋慶二、小林和人、小山純正
 青斑核ノルアドレナリンニューロンの特異的破壊による覚醒反応の解析
 第38回日本睡眠学会定期学術集会、平成25年6月27日、秋田市

高橋和巳、今野浩平、川村尚貴、井樋慶二、小林和人、永福智志、小山純正
 睡眠・覚醒調節における青斑核ノルアドレナリンニューロンの役割
 第45回東北生理談話会、平成25年10月5日、仙台市

高橋和巳、今野浩平、川村尚貴、井樋慶二、小林和人、小山純正
 イムノトキシンによる青斑核ノルアドレナリンニューロンの選択的破壊マウスにおける睡眠・覚醒調節
 包括脳ワークショップ、平成25年8月30日、名古屋市

K. TAKAHASHI, K. KONNO, N. KAWAMURA, K. ITOI, K. KOBAYASHI, S. EIFUKU, Y. KOYAMA
 Changes in the state of wakefulness in the locus coeruleus

noradrenergic neurons-ablated mice
第 91 回日本生理学会大会、平成 26 年 3
月 16 日、鹿児島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋和巳 (TAKAHASHI KAZUMI)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90325952

(2) 研究分担者

小山純正 (KOYAMA YOSHIMASA)
福島大学・共生システム理工学類・教授
研究者番号：80183812

井樋慶一 (ITOI KEIICHI)
東北大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号：60232427

(3) 連携研究者

小林和人 (KOBAYASHI KAZUTO)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：90211903