

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700464

研究課題名(和文) 大脳皮質神経回路の再編成における睡眠の役割

研究課題名(英文) The Role of Sleep in the Reorganization of the Cerebral Cortex

研究代表者

辛島 彰洋 (Karashima, Akihiro)

東北大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：40374988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠-覚醒状態に依存して神経回路が可塑的に変化していることを示唆する知見がこれまで報告されているが直接的な証拠はほとんどなかった。研究代表者らは、シナプス後膜上のグルタミン酸AMPA受容体の量が増加することで、シナプス結合強度が睡眠-覚醒状態依存的に変わるという仮説をたて、これを検証する動物実験を行った。その結果、i)動物が主に覚醒している暗期にはAMPA受容体が増加するが睡眠状態である明期には増加しない、ii)明期に強制的に覚醒させるとAMPA受容体が増加する、ことを示す結果を得た。以上より、我々の仮説が正しいことを証明できた。

研究成果の概要(英文)：Recently, the relationship between sleep-wake rhythm and synaptic plasticity is investigated by many sleep researchers. They suggest that the synaptic connection became stronger during wakefulness and became weaker during sleep. In order to confirm this suggestion, we performed whole-cell patch-clamp recordings from layer II/III pyramidal neurons of somatosensory cortex in acute slices of the rats that had been awake or asleep. We found that i) current-voltage relationship of EPSCs showed inward rectification, and ii) eEPSCs were depressed by Philanthotoxin 74, which is antagonist of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors, in slices of spontaneously waking and sleep-deprived animals. Both results show that amount of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors, which plays crucial role in synaptic plasticity, are high during wakefulness. These strongly suggest that synapses become widely potentiated during wakefulness and were downscaled during sleep.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：睡眠 ノンレム睡眠 大脳皮質 シナプス可塑性 AMPA受容体 神経回路

### 1. 研究開始当初の背景

脳の発達時期に睡眠を減らすと脳の発達が遅れること(Frank et al., 2001)、睡眠リズムが乱れている国際線乗務員の脳が有意に委縮してしまうこと(Cho, 2001)、睡眠を剥奪すると記憶固定に悪影響があること(Hagewijdt et al., 2009)から、睡眠は脳神経回路の発達・維持・再編成に重要な役割を果たしていると考えられている。そのメカニズムとして Tononi らは、ニューロン間のつながり(シナプス結合強度)が、覚醒時に増強され、睡眠時に減弱されるとする仮説を2006年に Sleep Medicine Review 誌で発表した。当時はその証拠はなかったが、その後のヒトおよび動物を対象とした生理実験により、覚醒時にシナプス結合強度が増大していることを示唆する結果が報告され始めているが、直接的な証拠は未だほとんどないのが現状である(Huber et al., 2013; Vyazovskiy et al., 2008)。

### 2. 研究の目的

本研究は、覚醒時にニューロン間の結合強度が増強されることを示す直接的な証拠を得ることを目指して実施された。

### 3. 研究の方法

本実験は、東北大学動物実験倫理委員会の承認を得た方法により行われた。実験に使用する動物(SD ラット:オス 4~5 週齢)を明期 12 時間(8:00-20:00)、暗期 12 時間(20:00-8:00)の環境で飼育した。皮下に埋め込んだ小型体温ロガーにより動物の体温を、さらにカメラ撮影により動物の活動量を計測し、動物の生体リズムおよび睡眠-覚醒リズムを簡易的に計測する in vivo 実験を行った。

in vivo 実験終了直後に大脳皮質スライスを作製し、in vitro 実験を行った。標本作成のタイミングおよび直前の動物の状態によって、以下に示す4つのグループに分けた。

8時群：暗期の終了時刻である8:00に作成された標本。標本作成の直前は主に自発的に覚醒している。

20時群：明期の終了時刻である20:00に作成された標本。標本作成の直前は主に自発的に睡眠をとっている。

10時睡眠群：明期が始まってから2時間後である10:00に作成された標本。標本作成の直前は主に自発的に睡眠をとっている。

10時断眠群：明期が開始した8時から2時間にわたって断眠(強制的に覚醒)させた動物から得られた標本。木材やプラスチック製の小物をケージに入れることで動物を活発に活動させ、断眠を行った。

スライス標本作製後、大脳皮質第1層の錐体細胞の誘発興奮性シナプス後電流(eEPSC)をホールセルパッチクランプ法によ

り記録した。また eEPSC を惹起するための刺激は、第1層に配置した電極により行った。この実験では、標本作製する直前にシナプス結合が増強していた痕跡が残っているかどうかを調べることが目的である。痕跡とは、具体的には、シナプス結合が増強した直後にのみ存在しているとされるシナプス後膜の  $Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体である(Kauer and Malenka, 2006)。本実験では、 $Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体がシナプス後膜状に存在するかどうかを、以下の2通りの方法で調べた。

$Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体の選択的な拮抗薬である Philanthotoxin74(PhTx 74)をスライス標本に灌流した際、eEPSC の振幅が小さくなるかどうかを調べる。

$Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体は内向き整流性を示すのに対し、 $Ca^{2+}$ 非透過性 AMPA 受容体は示さない、つまりオームの法則に従うことが知られている(Kauer and Malenka, 2006)。そこで、パッチクランプしたニューロンの電流-電圧特性を測って内向き整流性を示すかどうかを調べることで、 $Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体の有無を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) in vivo 実験結果：体温・活動のリズム

研究の方法で述べたように、ポタン電池型の温度ロガーで動物の体温を計測した。本実験で使用したすべての動物において、照明が点灯する8:00前後に体温が下がり、消灯する20:00前後に体温が上昇していることが確認された。また、撮影した動画の解析により、すべての動物において、明期(8:00~20:00)に比べて暗期(20:00~8:00)に活発に活動していることが確認された。また、10時断眠群では、断眠期間である8~10時の間に動物が活動している様子が確認された。したがって、実験前に予想した通り、20時群と10時睡眠群は、標本作成の直前は主に睡眠状態であること、一方、8時群と10時断眠群は、標本作成の直前は主に覚醒状態であることが確認できた。

#### (2) in vitro 実験結果：8時群と20時群との比較

パッチクランプ後、eEPSC を5分間以上安定して記録した後、 $Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体の拮抗薬である PhTx を灌流した。8時群では灌流後に eEPSC 振幅が約40%減少したが(灌流前を100%とすると灌流後は  $62.5 \pm 6.4\%$ ;  $n=9$ )、20時群では振幅にほとんど変動が見られなかった( $96.3 \pm 2.7\%$ ;  $n=9$ )。

さらに、固定電位を  $-60mV \sim +50mV$  の範囲で変化させ、それぞれの固定電位における eEPSC の振幅を求めることで、パッチクランプしたニューロンの電流-電圧特性を調べた。その結果、8時群では、すべてのニューロンにおいて、正の固定電位で電流が流れにくい内向き整流性を示すことが分かった。一方、20時群では、正の固定電位でも電流が流れにくくならないこと、すなわち電流と電圧の関

係は線形であった。

以上の2つの実験結果は共に、標本作成前に主に覚醒状態である8時群の標本ではシナプス後膜にCa<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体が存在しているが、直前に睡眠状態である20時群の標本では存在しないことを示している。したがって、覚醒時にシナプス結合が増強していることを示唆する結果が得られたと言える。

### (3) in vitro 実験結果：10時睡眠群と10時断眠群との比較

研究成果(2)でまとめたように、8時群ではCa<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体がシナプス後膜上に存在しており、一方20時群ではCa<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体がシナプス後膜上に存在していないことを示唆する結果が得られた。このように、8時と20時のタイミングで作製した標本でCa<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体の量に差が生じた原因が、標本作成前の睡眠・覚醒時間の差であることを直接的に示すため、普段寝ている時間帯である8~10時において強制的に覚醒させた時に、Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体の量に影響があるかどうかを調べた。

Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体の拮抗薬であるPhTxを灌流したところ、10時睡眠群では、eEPSC振幅はほとんど変化しなかった(106.9 ± 4.0%; n=7)。一方、10時断眠群では、PhTxを投与後にeEPSC振幅が約25%減弱することが分かった(75.1 ± 8.2%; n=6)。以上の結果から、断頭直前が、睡眠状態か覚醒状態かによって、Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体の量に差が生じることを直接的に示すことができた。

### (4)まとめ

本研究では、覚醒時にシナプス伝達強度が増大しているかどうかを調べるために、シナプス増強が誘導される時にシナプス後膜に挿入されるCa<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体が、覚醒または睡眠状態の動物から得られたスライス標本に存在するかどうかを調べる実験を行った。

in vivo 実験結果においては、本実験で利用したすべての動物の体温リズムと休息-活動リズムが飼育室の明暗サイクルと一致していることや、断眠しているときに活発に活動していることを確認した。その後実施したin vivo 実験では、第1層の錐体細胞に対してホールセルパッチクラ

ンプ記録を行なった。その結果、スライス標本作成直前に覚醒している8時群と10時断眠群では、Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体がシナプス後膜上に存在しているが、直前に眠っている20時群と10時睡眠群ではこのタイプのAMPA受容体が存在していないことを明らかにした。特に、断頭直前の60分間における動物の活動量とPhTx投与によるeEPSC振幅の減弱率間には、有意な負の相関関係であった(相関係数 r: -0.78; p<10<sup>-6</sup>)。したがって、直前に活発に活動している動物ほど、シナプス後膜上により多くのCa<sup>2+</sup>透過性のAMPA受容体が挿入されていると考えられる。以上の結果は、覚醒時にシナプス後膜

上のグルタミン酸受容体の量が増えていることを示しており、シナプス結合が覚醒時に増強されていることを示す証拠なので、当初の目的を達成できたと言える。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Y. Nabeshima, Y. Kimura, T. Ito, K. Ohwada, A. Karashima, N. Katayama, M. Nakao, Reconstruction of fetal vector electrocardiogram from maternal abdominal signals under fetus body rotations. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2013, 7338-7341, 2013. 査読有  
DOI: 10.1109/EMBC.2013.6611253.

A. Ueno, A. Karashima, M. Nakao, N. Katayama, Development of distance-selective nerve recruitment for subcortical brain mapping by controlling stimulation waveforms. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2013, 1879-1882, 2013. 査読有  
DOI: 10.1109/EMBC.2013.6609891.

A. Ueno, N. Katayama, A. Karashima, M. Nakao, Improvement of diameter selectivity in nerve recruitment using multi-cuff electrodes, *Advanced Biomed. Engineering*, 1: 36-42, 2012. 査読有  
www.abe-journal.org/2012/p36-42\_ABE2012.pdf

A. Ueno, N. Katayama, A. Karashima, M. Nakao, Suppression of anodal break excitation by electrical stimulation with down-staircase waveform for distance-selective nerve recruitment. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2012, 211-214, 2012. 査読有  
DOI: 10.1109/EMBC.2012.6345907.

白石泰士, 片山統裕, 辛島彰洋, 中尾光之, 時空間混合を解く複素独立成分分析を用いたニューロン活動の弁別アルゴリズムとその評価. *生体医工学*, 50, 52-61, 2012. 査読有  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11239/jsmbe.50.52>

上野彩子, 片山統裕, 辛島彰洋, 中尾光之, 階段状波形を有する細胞外電気刺激に対する有髄神経線維モデルの軸間ダイナミクス. *生体医工学*, 49, 896-903, 2011. 査読有  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11239/jsmbe.49.896>

Y. Shiraishi, N. Katayama, A. Karashima, M. Nakao, Separation of multiunit signals by independent component

analysis in complex-valued time-frequency domain. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2011, 4410-4413, 2011. 査読有  
DOI: 10.1109/IEMBS.2011.6091094.

A. Ueno, N. Katayama, A. Karashima, M. Nakao, Parameter exploration of staircase-shape extracellular stimulation for targeted stimulation of myelinated axon. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2011, 912-915, 2011. 査読有  
DOI: 10.1109/IEMBS.2011.6090204.

[学会発表](計 26 件)

辛島彰洋ら, 睡眠-覚醒状態に依存した大脳皮質シナプス可塑性, *日本生体医工学会第 48 回生体信号計測解釈研究会*, 2013 年 12 月 16 日, 神奈川県.

中村有孝, 辛島彰洋ら, 大脳皮質における興奮性神経回路の睡眠-覚醒状態依存的変化, *電子情報通信学会 ME とバイオサイバネティクス研究会*, 2013 年 11 月 22 日, 宮城県.

N. Katayama, K. Hidaka, A. Karashima, M. Nakao, Contribution of visual feedback to the hippocampal theta activity in mice, 2013 *International Joint Conference on Awareness Science and Technology & Ubi-Media Computing*, 2013 年 11 月 2-4 日, Fukushima.

辛島彰洋ら, 体性感覚野応答の睡眠-覚醒状態依存的変化, *第 45 回東北生理談話会*, 2013 年 10 月 5 日, 宮城県.

中村有孝, 辛島彰洋ら, AMPA 型グルタミン酸受容体の睡眠-覚醒状態に依存した変化, *第 45 回東北生理談話会*, 2013 年 10 月 5 日, 宮城県.

A. Karashima, et al., Functional implications of sleep-specific neural activities in memory processing and synaptic maintenance, *35th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, 2013 年 7 月 3-7 日, Osaka.

辛島彰洋ら, 居眠り運転の警告音に関する研究, *日本睡眠学会第 38 回定期学術集会*, 2013 年 6 月 27-28 日, 秋田県.

中村有孝, 辛島彰洋ら, 睡眠時の大脳皮質神経回路の再編成, *日本睡眠学会第 38 回定期学術集会*, 2013 年 6 月 27-28 日, 秋田県.

安齋友花, 黒石岳広, 辛島彰洋ら, 恐怖条件付け後のレム睡眠期における PGO 波による海馬の活性化, *日本睡眠学会第 38 回定期学術集会*, 2013 年 6 月 27-28 日, 秋田県.

A. Karashima, et al., The hippocampus and brainstem were activated during REM sleep in fear-conditioned rats, *第 90 回日本生理学会大会*, 2013 年 3 月 27-29 日, 東

京都.

N. Nakamura, A. Karashima, et al., Sleep dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex, *第 90 回日本生理学会大会*, 2013 年 3 月 27-29 日, 東京都.

辛島彰洋, 行動課題遂行中および睡眠中の動物からの神経活動の記録, *2012 年度第 2 回意思決定班ワークショップ*, 2013 年 3 月 24 日, 東京都.

向田寛美, 辛島彰洋ら, 変調周波数追従反応の眠気依存性に関する研究. *電子情報通信学会 ME とバイオサイバネティクス研究会*, 2012 年 11 月 16 日, 宮城県.

黒石岳広, 辛島彰洋ら, 恐怖学習後の睡眠時脳活動の計測と解析, *電子情報通信学会 ME とバイオサイバネティクス研究会*, 2012 年 11 月 16 日, 宮城県.

A. Karashima, et al., Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors are decreased during sleep. *Neuroscience 2012*, 2012 年 9 月 19-21 日, 愛知県.

辛島彰洋ら, レム睡眠期の情動記憶の固定における海馬・扁桃体シータ波の役割. *第 37 回日本睡眠学会*, 2012 年 6 月 28-30 日, 神奈川県.

中村有孝, 原田真伍, 辛島彰洋ら, in vitro パッチクランプ法による大脳皮質体制感覚野 AMPA 受容体の可塑性における睡眠の役割に関する研究, *日本睡眠学会第 37 回定期学術集会*, 2012 年 6 月 28-30 日, 神奈川県.

黒石岳広, 辛島彰洋ら, 恐怖条件付け前後のレム睡眠期に観測される PGO 波と海馬波, *日本睡眠学会第 37 回定期学術集会*, 2012 年 6 月 28-30 日, 神奈川県.

向田寛美, 安井洋介, 辛島彰洋ら, 聴覚応答の眠気依存性に関する研究, *日本睡眠学会第 37 回定期学術集会*, 2012 年 6 月 28-30 日, 神奈川県.

辛島彰洋, 脳幹広範囲調節系ニューロンが意思決定行動を調節する機序の解明を目指して, *第 15 回実験社会科学カンファレンス*, 2011 年 12 月 28 日, 東京都.

②辛島彰洋, 意思決定に関わる扁桃体の神経機構, *2011 年度第 2 回意思決定班ワークショップ*, 2011 年 11 月 16 日, 東京都.

②A. Karashima, Pontine-wave associated synchronization between hippocampal and amygdala theta waves: a physiological process for sleep-dependent memory processing, *Worldsleeep2011*, 2011 年 10 月 16-20 日, Kyoto.

③原田真伍, 深澤孝浩, 辛島彰洋ら, 聴性脳幹反応の睡眠-覚醒状態依存性とその制御機構, *日本睡眠学会第 36 回定期学術集会*, 2011 年 10 月 15 日, 京都府.

④向田寛美, 安井洋介, 辛島彰洋ら, 変調周波数追従反応によって推定される聴覚周波数特性と眠気との関係, *日本睡眠学会第 36 回定期学術集会*, 2011 年 10 月 15 日, 京都府.

②⑤ M. Nakao, A. Karashima, N. Katayama,  
Towards in silico modeling of  
suprachiasmatic nucleus, *3rd  
international conference on cognitive  
neurodynamics*, 2011年6月9日, Hokkaido  
②⑥ 辛島彰洋ら, レム睡眠時の振動性脳活動と  
その機能, 第50回日本生体医工学会大会,  
2011年4月29-5月1日, 東京都.

片山 統裕 (KATAYAMA, Norihiro)  
東北大学・大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号: 20282030

〔図書〕(計1件)

A. Karashima, Y. Tamakawa, Y. Koyama, N. Katayama, M. Nakao, Neural modeling for cooperative/competitive regulation of REM sleep with NREM sleep and wakefulness, In "Rapid Eye Movement Sleep: Regulation and Function", Cambridge University Press, pp. 437-449, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛島 彰洋 (KARASHIMA, Akihiro)  
東北大学・大学院情報科学研究科・助教  
研究者番号: 40374988

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

中尾 光之 (NAKAO, Mitsuyuki)  
東北大学・大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号: 20172265