

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590295

研究課題名(和文) 逆説睡眠を調節するガンマアミノ酪酸作動性・グルタミン酸作動性神経系の解析

研究課題名(英文) Analysis of GABAergic and glutamatergic neural systems regulating paradoxical sleep.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：中脳・橋蓋領域のニューロンの約70%は、逆説睡眠時に高い活動を示した。その約半数は、逆説睡眠の開始に先行して活動の上昇が見られた。それらの多くは、逆説睡眠のある時期に相動的な発火を示し、レム睡眠中の急速眼球運動に同期して発火するものが約40%を占めた。中脳・橋被蓋のニューロンは、逆説睡眠の発現と、逆説睡眠中の相動的現象の調節に関与しているといえる。ニューロバイオチンによる標識によって、GABAニューロンは幅の狭い活動電位を高頻度で発していることが確かめられた。多点電極による複数ニューロンの同時記録により、背側縫線核の多数のセロトニンニューロンは同期して発火していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：About 70% of neurons in the mesopontine tegmentum displayed higher activity during paradoxical sleep (PS), and half of them started to increase their firing prior to the onset of PS. Most of them showed phasic activity in some periods during PS, about 40% of them discharged in synchronous with rapid eye movement. Neurons in the mesopontine tegmentum have a role in initiating PS, and in regulating phasic phenomena during PS. Neurobiotin labeling of the neurons in VGAD-virus transgenic rats revealed that GABAergic neurons generate action potentials with shorter duration and higher firing rate. Multi units recording through multi-point electrode revealed that several serotonergic neurons in the dorsal raphe discharged synchronously, resulting in constant and tonic firing in the serotonergic neurons.

研究分野：神経生理学

キーワード：睡眠・覚醒 レム睡眠 外背側被蓋核 中脳中心灰白質 背側縫線核 GABA ラット

1. 研究開始当初の背景

逆説睡眠(レム睡眠)の発現には、中脳尾側から橋吻側部に分布する、外背側被蓋核(LDT)と脚橋被蓋核(PPT)のアセチルコリン作動性ニューロンが重要な役割を果たすことが知られている。これらのニューロンの一群は、逆説睡眠(paradoxical sleep: PS)時に最も高い持続的活動を続けることから、PS-on ニューロンと呼ばれる。また、背側縫線核のセロトニン作動性と青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロンは、覚醒時に最も活発に活動し、逆説睡眠時に活動が停止することから、PS-off ニューロンと呼ばれ、逆説睡眠の抑制に働くことが知られている。われわれは、LDT とその腹側(subLDT)に、アセチルコリン作動性の PS-on ニューロンに加え、非アセチルコリン作動性の PS-on ニューロンが存在することを示した。その後のいくつかの報告により、このタイプの PS-on ニューロンは、グルタミン酸作動性と考えられている。また、PS-on ニューロンに対する GABA 阻害剤(ピキュキュリン)の作用から、それらの PS-on ニューロンは、覚醒時に GABA 作動性ニューロンからの抑制を受けることを示唆した。そして、この GABA 作動性ニューロンの起源の一つとして、中脳中心灰白質腹外側部(ventrolateral periaqueductal gray: vlPAG)が考えられている。しかしながら、直接的な証拠は得られていない。また LDT や subLDT には、逆説睡眠時に持続的活動を示すニューロンに加え、さまざまな相動的活動を示すニューロンも存在するが、これらの機能については、不明の点が多い。

2. 研究の目的

本実験では、上の点を踏まえ、以下の点を明らかにする。

- (1) 中脳尾側から橋吻側部におけるニューロンの睡眠・覚醒サイクルにおける活動様式、特に逆説睡眠中の相動的現象との関連について
- (2) 逆説睡眠の抑制に働く GABA ニューロンの可能性について
- (3) 逆説睡眠を調節する領域のニューロン間の相互作用について

3. 研究の方法

ネブタール麻酔科で、ラットの頭骨に脳波測定用の電極を、頸筋に筋活動記録用の電極を、眼窩に眼球運動記録用の電極を埋め込む。さらに、頭部固定用のアクリルプレートで頭骨上に装着する。1 週間以上の回復期間をおいた後、アクリルプレートによって、ラットを脳定位装置に固定する。この処置を数日繰り返すと、ラットはこの状態に慣れ、睡眠・覚醒サイクルを繰り返すよ

うになる。

- (1) このような状態のラットから、無麻酔下で、ガラス微小電極を用い、睡眠・覚醒の各ステージにおけるニューロン活動を記録した。
- (2) 記録したニューロンが GABA 作動性か否かを確かめるため、群馬大学の柳川右千夫教授から供与された VGAT - Venus トランスジェニックラット(GABA トランスポーター(VGAT)をもつ細胞に蛍光タンパク(Venus)を発現しており、励起光下で GABA ニューロンが蛍光を発する)を用い、電極からニューロバイオチンを投与して記録したニューロンを標識し、励起光下で GABA ニューロンか否かを判定した。
- (3) 多点電極(包括脳リソース支援プロジェクト(虫明拠点)から供与)を用い、逆説睡眠の抑制領域である背側縫線核から複数のニューロンを記録し、それらの間の相互作用について解析した。

4. 研究成果

(1) 中脳・橋蓋領域のニューロンの睡眠・覚醒時における活動様式

徐波睡眠、逆説睡眠(レム睡眠)、覚醒の3ステージの活動を記録できた59個のニューロンのうち、逆説睡眠中に最も高い発火頻度を示すもの(PS active neuron)が30個(51%)、覚醒と逆説睡眠中に発火頻度が上昇するもの(W/PS active neuron)6個(10%)、徐波睡眠と逆説睡眠中に活動上昇するもの(SWS/PS active neuron)6個(10%)と、逆説睡眠中に活動が上昇するニューロン(PS-related neuron)は、全体の70%を占めた。覚醒時にもっとも高い活動を示すもの(W active neuron)は15個(25%)であった。このうち、活動電位の形から判定したアセチルコリンニューロンは6個、セロトニンニューロン4個、他は非アセチルコリンニューロンであった。PS-related neuronのうち、約半数は逆説睡眠の開始に先行して発火が上昇した。これらは主にsubLDTとその周辺に分布していた。逆説睡眠中、持続的(tonic)な発火を維持するものは少なく、約90%は相動的(phasic)な発火を示した。

図1に、PS active ニューロンの1例を示す。このニューロンは、逆説睡眠時に最も高い発火を示すが、発火の上昇は、逆説睡眠の開始後に起こり、逆説睡眠中の活動も大きく変動している。また、この変動は逆説睡眠中に起こる眼球運動(EOG)に同期している。時間軸を拡大した図1Dに示すように、このときのニューロン活動の上昇は、眼球運動に先行して起こっている。逆説睡眠中の眼球運動と同時に活動を記録できたニューロン52個のうち、23個(44%)で眼球運動との相

関が見られた。相関があった 23 個のニューロン

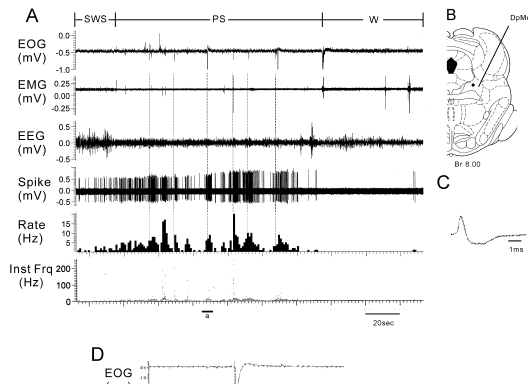


図 1 中脳網様体から記録された PS active ニューロン

のうち 18 個(78%)は眼球運動に先行して発火が上昇していた。このようなニューロンは vIPAG やその近傍の中脳網様体 (Deep Mesencephalon: DpMe)、吻側橋網様核 (PnO) から subLDT に至る領域に分布していた。

このように、中脳・橋被蓋の非アセチルコリンニューロンは、逆説睡眠の発現と、急速眼球運動のような、逆説睡眠中の相動的現象の調節に関与しているといえる。

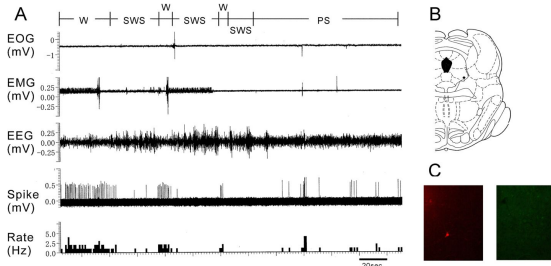


図 2 中脳中心灰白質(vIPAG)から記録された W active ニューロン

(2) 傍細胞記録法による神経伝達物質の同定

VGAT - Venus トランスジェニックラットを用い、ニューロン活動記録後、ニューロバイオチンで標識し、GABA ニューロンであるか否かを判定した。図 2 に、vIPAG から記録された W active neuron を示す。このニューロンは、図 2C に示すように、GAD(-)であった。無麻酔下での傍細胞記録は困難が伴うため、以下は、ウレタン麻酔下の記録であるが、ウレタン麻酔下でニューロバイオチンの標識に成功し、GAD(+)と判定できたニューロンは、幅の狭い活動電位(陽性成分 0.5 msec 以下)を発し、20Hz 以上の発火頻度を示した(図 3)。GAD(-)ニューロンのうち、幅の広い活動電位(陽性成分 0.8 msec 以上)を発するも

のは、アセチルコリンニューロンであった。発火頻度は 10Hz 以下であった。

ニューロバイオチンによる傍細胞記録は十分な結果が得られていないが、vIPAG に存在する W active ニューロンが GABA ニューロンであるかについては、今後の課題である。麻酔下においては、GABA ニューロンは、幅の狭い活動電位を高頻度に発することが確認できた。この知見に基づくと、PS-related ニューロンの一部も、GABA ニューロンの可能性がある。

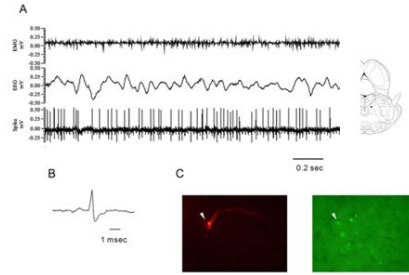


図 3 subLDT から記録された GAD(+)ニューロン

(3) 多点電極による縫線核ニューロンの記録

ウレタン麻酔下のラットを用い、セロトニンニューロンの局在する背側縫線核とその周辺から神経活動を記録した。ウレタン麻酔下でラットは、

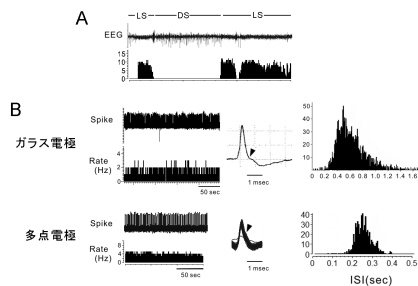


図 4 多点電極記録とガラス電極記録の比較

振幅の大きな徐波の現れる深麻酔状態(Deep Sleep: DS)と、振幅の小さい浅麻酔状態(Light Sleep: LS)を繰り返す。セロトニンニューロンは、LS で数 Hz の持続的発火を示し、DS で発火が著しく低下(あるいは消失)する (LS active ニューロン) (図 4A)。

ガラス電極で記録すると、セロトニンニューロンは、下降相に肩のある特徴的な活動電位の形から非セロトニンニューロンと区別できる。多点電極によっても、ガラス電極で記録したセロトニンニューロンと同じような形の活動電位、同じような発火特性を示すニューロンを記録できた(図 4B)。したがって、このようなニューロンをセロトニンニューロンと見なした。

数百 μm 離れた点から記録される複数のセロトニンニューロンは、非常に高い相関をもって発火していた(図5)。広い領域の多数のセロトニンニューロンが同期して発火していると考えられる。このような発火特性が、セロトニンニューロンの規則正しい持続的発火の基礎となっていると考えられる。DS から LS への(LS から DS への)移

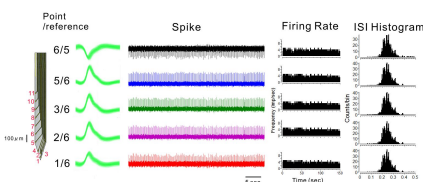


図5 多点電極で記録されたセロトニンニューロン

行期に、非セロトニン作動性 LS active ニューロンには、セロトニン作動性 LS active ニューロンの活動上昇(活動低下)に先行するものと、遅れるものが記録できた。背側縫線核内でセロトニン作動性ニューロンの活動様式は、異なったニューロン群との相互作用によって調節されていると考えられる。

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 7 件)

- (1) 小山純正, 青斑核と青斑下核, 分子精神医学 (査読なし) 第 14 巻 37-40, 2014
 - (2) 小山純正, 睡眠覚醒調節の神経機構, 日本臨床 (査読なし) 71(増刊 5) 77-85, 2013
 - (3) 小山純正, 睡眠と覚醒を切りかえる脳のしくみ, ミルシル(査読なし) 第 6 巻 (1号) 14-16, 2013
 - (4) Tsujino N, 他 5 名, Koyama Y, Sakurai T, Chronic alterations in monoaminergic cells in the locus coeruleus in orexin neuron-ablated narcoleptic mice, PLoS One (査読あり) 8, e70012. doi: 10.1371/journal.pone.0070012, 2013,
 - (5) 小山純正, モノアミン・コリン作動性システムを中心とした睡眠・覚醒の制御, Brain and Nerve (査読なし) 第 64 巻 (6号) 601-610, 2012
 - (6) Koyama Y and Wang H, Acupuncture effects on bladder activity and state of vigilance through GABAergic neuronal systems, Acupuncture in Modern Medicine (査読あり) p.77-94.
- Chen LL and Cheng TO (Eds.), InTech, Croatia, 2012
- (7) Wang H, 他 4 名, Koyama Y, Acupuncture of the sacral segment suppresses bladder activity and bladder activity-related neurons in the brainstem micturition center, Neuroscience Research (査読有)72: 43-49, 2012
- 〔学会発表〕(計 41 件)
- (1) Koyama Y et al, Neural mechanisms for inducing fluctuations of autonomic nervous system during REM sleep. 第 92 回日本生理学大会シンポジウム, 2015 年 3 月 23 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
 - (2) 小山純正, Interaction of brainstem neurons at the state transition investigated through Si neural probe, 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム, 平成 26 年 12 月 13 日 東京医科歯科大学(東京都・文京区)
 - (3) Koyama Y, Regulation of tonic and phasic components of REM sleep, 8th Asian Sleep Research Society Congress. Symposium: September 24, 2014, (Kerala, India)
 - (4) Koyama Y et al, Involvement of the amygdala in blood pressure fluctuation during REM sleep. 22nd Congress of the European Sleep Research Society. September 17, 2014, Tallinn (Estonia)
 - (5) 小山純正, 睡眠覚醒を調節するニューロン群, 日本睡眠学会第 39 回定期学術集会シンポジウム, 2014 年 7 月 4 日, あわぎんホール(徳島県・徳島市)
 - (6) Koyama Y, Regulation of muscular tonus through orexinergic projection to the midbrain 日本睡眠学会第 39 回定期学術集会シンポジウム, 2014 年 7 月 4 日, あわぎんホール(徳島県・徳島市)
 - (7) 小山純正, GABA 作動性ニューロンによる睡眠・覚醒調節, 第 38 回日本睡眠学会定期学術集会シンポジウム, 2013 年 6 月 27 日, 秋田キャッスルホテル他, 秋田県・秋田市
 - (8) 小山純正, 他 3 名, レム睡眠中の急速眼球運動を調節する脳幹のニューロンについて, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 21 日, 京都国際会議場(京都府・京都市)
 - (9) Koyama Y, Neural regulation of REM sleep, 8th International Symposium on Respiratory Diseases & ATS in China Forum 2012. Nov. 8, 2012, (Shanghai, China)
 - (10) 小山純正, 覚醒の脳幹メカニズム, 第 37 回日本睡眠学会定期学術集会シンポジウム, 2012 年 6 月 30 日, 横浜パシフィコ, (神奈川県・横浜市)

- (11) 小山純正, 脳幹の睡眠・覚醒調節機構に対するアデノシンの役割について, 第37回日本睡眠学会定期学術集会シンポジウム, 2012年6月29日, 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)
- (12) 小山純正, レム睡眠調節の神経機構と夢幻様行動, 第37回日本睡眠学会定期学術集会シンポジウム, 2012年6月28日, 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kojinyoseki.adb.fukushima-u.ac.jp/top/details/196>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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