

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890005

研究課題名(和文) 線条体による新規睡眠制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel sleep-regulatory mechanism by the striatum

研究代表者

大石 陽(OISHI, Yo)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号：70554004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠覚醒調節機構の解明は、睡眠障害対策に応用可能であり、学術的および社会的価値が高い。本研究では線条体による睡眠調節機構の解明を目的とした。広範である線条体領域を吻側、中央、尾側の3つに区分し、各領域の薬理遺伝学的活性化を行った。脳波・筋電図の測定に基づいて睡眠量の変化を測定した結果、吻側線条体の活性化は睡眠量を増加させた。これらの結果は、吻側線条体が睡眠促進に重要である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the sleep-regulatory mechanism by the striatum. We divided the striatum to rostral, central, and caudal parts, activated each region, and measured sleep amount of each animal based on electroencephalogram/electromyogram recordings. Activation of the rostral striatum increased sleep. These results suggest that the rostral striatum may regulate sleep.

研究分野：睡眠

キーワード：睡眠

1. 研究開始当初の背景

現代人の生活は夜型化しており、睡眠に何らかの問題をもち睡眠障害と診断される人は人口の実に 20% を超える。睡眠障害に起因する日中の眠気は、作業効率や判断機能の低下を引き起こし、それに起因する重大事故が大きな社会的・経済的損失を伴うことが社会問題となっている。睡眠の制御機構の解明は睡眠障害の克服において重要な位置付けにあり、社会的にも極めて価値が高い研究である。しかし、脳での睡眠の必要性や脳の睡眠の発生メカニズムなどについて、システム・細胞・もしくは遺伝子レベルのいずれにおいても明確な答えは現在得られていない。

現在提唱されているシステムレベルの睡眠制御モデルの一つに、「Flip-Flop モデル」がある (Saper CB et al., *Neuron*, 2010, 68)。睡眠時に活性化する神経核群 (ventrolateral (VLPO) and median (MnPO) preoptic area) と覚醒時に活性化する神経核群 (lateral hypothalamus (LHA), locus coeruleus (LC), tuberomammillary nucleus (TMN), dorsal raphe nucleus (DR), parabrachial nucleus (PB), precoeruleus area (PC), ventral periaqueductal gray (vPAG)) による相互の抑制によって、睡眠から覚醒もしくは覚醒から睡眠への迅速かつ効率的な移行を説明するモデルである。覚醒時に活性化する神経核群の多くは大脳皮質全体に神経投射するため、それらの投射の活性化または抑制が睡眠を阻害または誘発すると考えられている。しかし、これらの Flip-Flop スイッチの入力がどこから来るのかは現在不明であり、睡眠の誘発機構の理解には更なる構成要素が必要と思われる。

睡眠の恒常性への関与が示唆されている内因性睡眠物質の一つにアデノシンがある。アデノシンは長時間の覚醒中に前脳基底部において増加し、その後の睡眠中に減少する (Porkka-Heiskanen T et al., *Science*, 1997, 276, 265-1268)。アデノシンは主に前脳基底部のコリン作動性神経をアデノシン A₁ 受容体 (A₁R) を介して抑制し、睡眠を増加させると考えられていたが、研究代表者はアデノシンが A₁R を介して TMN のヒスタミン神経を抑制し睡眠を促進するメカニズムを発見し (Oishi et al., *PNAS*, 2008, 105, 19992-19997) アデノシンが起こす多様な睡眠促進機構の理解に貢献した。またアデノシン A_{2A} 受容体 (A_{2A}R) も睡眠に関与しており、その作動薬の投与は睡眠を誘発し (Sato, *PNAS*, 1996, 93, 5980-5984)、拮抗薬は覚醒を誘発する (Huang, *Nat. Neurosci.*, 2005, 8, 858-859)。最近、カフェインの覚醒作用が側坐核の A_{2A}R に依存することが明らかにされた (Lazarus et al., *J. Neurosci.*, 2011, 31, 10067-10075)。

A_{2A}R は大脳基底核の線条体に非常に強く発現しているが、その生理的意義は明らかではない。線条体は運動機能・認識・感情・嗜

癖行動などの覚醒中の生理機能に重要であることが知られているが、睡眠への関与は現在までに報告されていない。申請者は最近、薬理遺伝学的手法による背内側線条体内の A_{2A}R 陽性神経の活性化がノンレム睡眠を顕著に増加させることを偶然見出した。睡眠量の増加は対照群の 3.6 倍におよび、これは他の睡眠促進薬物等と比較して最も強力なレベルである。

ここ数年ほどで、ウイルスベクターを用いて特定の神経集団の活動を遠隔操作で可逆的に興奮もしくは抑制する手法 (DREADD, Ivermectin, 光遺伝学など) が急速に進歩している。本研究でも用いたこの種の手法は、従来の電気刺激法や神経毒による非特異的細胞破壊法と比較して、特定の神経の機能をより直接的に結果に反映できる。さらに従来の薬理学的手法や遺伝子改変動物の使用と比較して空間的あるいは時間的解像度の高い機能解析を可能にする。申請者は最近、Ivermectin を用いた神経活動抑制により内側前頭前皮質が睡眠障害ナルコレプシーの症状である情動脱力発作に重要なことを見出し、この種の薬理遺伝学的手法が睡眠関連行動に有用なことを示した (Oishi Y et al., *J. Neurosci.*, 2013, 33, 9743-9751)。

本研究の特色はこれまで全く注目されていなかった線条体による睡眠制御機構を対象とする点である。線条体は運動機能や嗜癖行動に重要なため、本研究の成果によりそれらの行動システムと睡眠覚醒システムの統合モデルの創成が期待される。また睡眠誘導効果が顕著なシステムを発見した場合、新たな睡眠誘導薬のデザインやパーキンソン病患者の睡眠障害の理解に役立つ。さらに新しい薬理遺伝学的手法の使用により、睡眠研究に有用なツールの確立に貢献できる。

2. 研究の目的

特定の神経のみを可逆的に活性化させる薬理遺伝学的手法・睡眠バイオアクセスシステム・神経群特異的な神経解剖学的手法などを用いた、線条体による睡眠制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) を用いた線条体内各小領域の A_{2A}R 神経活性化および睡眠測定

我々は最近、背内側線条体の A_{2A}R の活性化が睡眠量を顕著に増加させることを見出した。A_{2A}R は線条体内において均一に発現しているが、線条体内の小領域 (Subregions) によって機能・投射様式の差異が認められる (Lovinger DM, *Neuropharmacology*, 2010, 58, 951-961; Kang MJ et al., *Toxicol. Lett.*, 2010, 195, 127-134; Moore AE et al., *Exp. Neurol.*, 2001, 172, 363-376) ため、睡眠誘発効果も領域によって異なる可能性がある。そ

ここで、線条体の3つの小領域(吻側、中央、尾側)においてそれぞれA_{2A}R陽性神経特異的に活性化し、最も効果的に睡眠を誘発する領域の同定を試みた。

A_{2A}R陽性神経特異的活性化は、Bryan Roth labで最近開発されたDREADDシステムを用いて行った。DREADDとは、変異型ムスカリン受容体をリガンドclozapine-N-oxide (CNO)によって刺激し、下流のG蛋白シグナルを人為的に活性化させるシステムである(Rogan and Roth, Pharmacol. Rev. 2011, 63, 291-315)。本研究ではアデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus; AAV)を用いて、変異型M3ムスカリン受容体(M3-DREADD)をA_{2A}Rプロモーター下でCreを発現するマウス(A_{2A}R-Cre)の線条体に導入し、Synapsinプロモーターによって神経細胞特異的、かつFLEXシステムによってCre依存的に発現させ、CNOの腹腔内投与によりA_{2A}R神経のGqシグナルを数時間活性化させた。線条体にはドーパミンD₁受容体発現神経や数種類の介在神経も存在するため、DREADDの使用はA_{2A}R神経の機能がより直接的に結果に反映される。

(2) A_{2A}R神経特異的順行性トレーサーを用いた投射先の決定

マーカー蛋白質mCherryと融合させたM3-DREADDは順行性トレーサーとしても有用なため、計画(1)でAAV-M3-DREADD-mCherryを線条体に導入し睡眠測定に用いたマウスの脳全域をmCherry抗体で免疫染色し、睡眠誘発に効果的な線条体領域およびその領域のA_{2A}R神経特異的な投射先を同定した。

4. 研究成果

(1) DREADDを用いた線条体内各小領域のA_{2A}R神経活性化および睡眠測定

広範である線条体領域を吻側、中央、尾側の3つに区分し、各領域の薬理遺伝学的活性化を行い、脳波・筋電図の測定に基づいて睡眠量の変化を測定した。領域の活性化は変異型ムスカリン受容体をリガンドCNOによって刺激し、下流のG蛋白シグナルを人為的に活性化させるDREADDシステムを用いた。本研究ではAAVを用いて、変異型M3ムスカリン受容体(M3-DREADD)を線条体に導入し、CNOの腹腔内投与によりGqシグナルを数時間活性化させた。その結果、吻側線条体に発現させたマウスにおいて、CNOの投与は生理食塩水の投与に比べてノンレム睡眠量を増加させた。M3-DREADDの発現領域は、マーカータンパク質mCherryの免疫染色により、行動実験後に決定した。これらの結果は、吻側の線条体領域の活性化が睡眠を促進することを示唆している。

(2) A_{2A}R神経特異的順行性トレーサーを用いた投射先の決定

AAV-M3-DREADD-mCherryを吻側線条体に導入し睡眠測定に用いたマウスの脳全域をmCherry抗体で免疫染色し、吻側線条体の投射先の同定を試みた結果、吻側の淡蒼球に強い神経投射が見られることが明らかになった。この結果は、吻側淡蒼球もまた睡眠促進に重要である可能性を示唆している。

本研究により、吻側の線条体および淡蒼球の睡眠調節への関与が示唆された。しかし現状では吻側線条体が睡眠を調節するメカニズムは不明であり、今後吻側淡蒼球などに焦点を当て、詳細に調べる必要がある。本研究の成果は、線条体が主に担っている運動機能と睡眠覚醒の制御方式の違いの理解に役立ち、また新しい睡眠改善薬の開発に有用である可能性がある。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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：
出願年月日：
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

大石 陽 (OISHI, Yo)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・
研究員

研究者番号：70554004

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：