

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：31303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26507001

研究課題名(和文) 脳神経回路維持の基盤となる睡眠依存性のシナプス可塑性

研究課題名(英文) Sleep-Dependent Synaptic Plasticity Underlying Maintenance of Neuronal Circuits in the Brain.

研究代表者

辛島 彰洋 (Karashima, Akihiro)

東北工業大学・工学部・准教授

研究者番号：40374988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以下に記すように、睡眠-覚醒状態に依存したシナプス結合の可塑的変化が脳皮質と海馬で観測されことを示し、そのメカニズムに迫ることができた。

脳皮質では、体性感覚野スライス標本を用いたin vitroパッチクランプ実験と、体性感覚応答を覚醒時と睡眠時で比較するin vivo実験を行った。覚醒時にシナプス結合が増強し、睡眠中には減弱していることを示す結果が得られた。さらに、感覚遮断実験により、覚醒時の増強が経験依存的可能性を示した。脳皮質と同様に海馬CA1領域でも、in vitro実験も行い、覚醒時にシナプス結合が増強していることやその増強が経験依存的可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the sleep-wake stage dependent synaptic plasticity in the cortex and hippocampus and underlying mechanism of the plasticity. We made whole-cell patch-clamp recordings from pyramidal neurons of the somatosensory cortex and hippocampus in acute slices and recorded evoked EPSCs. We focused on trafficking of Ca-permeable AMPA (CP-AMPA) receptor, because presence of the receptor indicate the synapse was potentiated just before preparing slices. In this study, we tested whether CP-AMPA receptor antagonist affected AMPA receptor mediated the EPSCs. We found that the antagonist caused a significant reduction of EPSC amplitudes in awake rats, and did not have any significant effect on the amplitude in sleeping rats. These results indicate that CP-AMPA receptors are inserted into the synapse only during wakefulness both in the cortex and hippocampus. These two different brain regions are suggested to share the same mechanism of stage dependent synaptic plasticity.

研究分野：睡眠科学

キーワード：シナプス可塑性 AMPA 受容体 睡眠-覚醒 シナプスホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

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いること(Cho, 2001)や、睡眠を剥夺すると記憶固定に悪影響があること(Hagewiyd et al., 2009)が報告されており、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きた。この神経基盤として、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Sleep Medicine Review誌で2006年に発表した。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、覚醒時においてシナプス結合強度が純増することが分かってきた(Huber et al., 2013; Vyazovskiy et al., 2008など)。さらに、我々も含めたいくつかの研究グループにより、覚醒時にはシナプス後膜にCa²⁺透過型のグルタミン酸AMPA受容体が挿入されることが大脳皮質において見出され(Lante et al., 2011; 中村ら, 2013)、この受容体の挿入が覚醒時のシナプス増強の基盤となっている可能性も指摘されていた(例えばShepherd, 2012)。

2. 研究の目的

我々のグループや他のグループの研究成果を踏まえて、本研究は以下の3点の解明を目指して行われた。

- ①覚醒時にシナプス結合が増強することを示す結果は多数報告されている一方で、睡眠時において減弱することを示す結果はほとんどなかったため、その証拠を得る。
- ②覚醒時にシナプス結合が増強するメカニズムに迫る。具体的には、覚醒時に観測されるCa²⁺透過性AMPA受容体のシナプス後膜への挿入が覚醒時間依存的なのか、それとも使用依存的かどうかを明らかにする。
- ③記憶の中核である海馬でも大脳皮質と同様に睡眠-覚醒状態に依存したシナプス可塑的变化があるかどうかを明らかにする。さらに、変化がある場合はそのメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

研究①：感覚応答をマーカーとして、睡眠時に大脳皮質神経回路の再編成が起こっている証拠を得る

本研究を始める前から申請者は、一本のヒゲを刺激する装置を独自に開発し、覚醒時および睡眠時にその刺激の応答を体性感覚野で計測してきた。この刺激装置は、刺激強度を適切なレベルにすることで、睡眠を妨げることなく大脳皮質感覚野で応答を誘発できる。本研究ではこの装置を利用して、睡眠前後の覚醒時にヒゲを刺激し、惹起される感覚応答を大脳皮質体性感覚野で記録した。

研究②：体性感覚遮断により覚醒時の活動を変化させたときの体性感覚野の再編成への影響をシナプスレベルで調べる

多くの哺乳類の顔面には、一般毛とは異なる洞毛と呼ばれる特殊な触覚毛が生えている。この触覚毛の1本1本に対応した神経集合が大脳皮質に存在しており、バレル野と呼ばれている。本研究では、触覚毛の一部を抜いて感覚遮断を行うことで、除去毛に対応するバレル野と残った毛に対応するバレル野領域でシナプス結合に差が生じるかどうかを調べた。実験では、まず、片側の触覚毛を完全に除去した12時間後に断頭し両側の大脳皮質バレル野のスライス標本を作製した。そして、パッチクランプ実験により、シナプス後膜にCa²⁺透過型のグルタミン酸AMPA受容体が存在しているかどうかを調べた。

研究③：睡眠-覚醒状態に依存した神経回路の再編成について海馬でも調べる

研究②で観測される睡眠-覚醒状態に依存した神経回路の再編成が大脳皮質にのみ現象かどうかを調べるために、海馬においても同様の実験(シナプス後膜にCa²⁺透過型のグルタミン酸AMPA受容体が存在しているかどうかを調べるパッチクランプ実験)を行った。さらに、そのメカニズムが使用依存的かどうかを明らかにするため、海馬を活性化させた際のCa²⁺透過性AMPA受容体量の変化についても調べた。海馬を活性化させる方法として豊富環境下で動物を飼育した。

4. 研究成果

研究① ノンレム睡眠時に観測される神経回路の再編成

前節にまとめたように、感覚刺激により誘発される電気応答をシナプス伝達強度のマーカーとして利用した。実験では7匹のラットにおいて、感覚毛1本を機械的に刺激することで誘発される皮質応答を、体性感覚野の硬膜上に配置した電極で記録した。解析では、刺激後の約10msに現れる陽性電位(P1)、約15ms後に出現する陰性電位(N1)、約30ms後に出現する陽性電位(P2)に注目し、4分以上続く睡眠前後で応答振幅に差があるかを調べた。その結果、(i)睡眠を経ると感覚応答の振幅が小さくなっており特に、N1やP2の振幅の睡眠後の減弱は有意であることや、P1の振幅はほとんど変化しないことが分かった。さらに、(ii)ノンレム睡眠の後にレム睡眠が生じたときと生じなかったときで振幅の減弱に差を調べたが、有意な差がないことが分かった。P1は視床から大脳皮質4層への入力を、N1やP2は皮質間(例えば2/3層間)の伝達の応答と考えられることから、結果iは、睡眠中には大脳皮質内の伝達は減弱するが、視床から皮質への伝達は変化しないと解釈できる。さらに結果iiより、ノンレム睡眠期にはシナプス結合は減弱するが、レム睡眠期には変化しないことが示唆された。以上の結果は、ノンレム睡眠時に神経回路の再編成が生じていることを強く示唆するものである。

研究② 感覚毛の除去による神経回路再編成への影響

感覚毛の除去により大脳皮質バレル野への感覚入力を遮断した時に使用依存的な可塑的变化が生じるかどうかを調べた。片側の感覚毛を除去してから 12 時間後に断頭し、大脳皮質スライス標本を作製した。そして、感覚入力残存側のバレル野(感覚毛が残った側とは対側)と、遮断側のバレル野(感覚毛を除去したのと対側)で AMPA 受容体の電流電圧特性を調べた。その結果、ヒゲ感覚入力残存側のバレル野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した。RI 値(平均値±標準誤差)は 0.76 ± 0.07 ($n=5$) であり、この値は内向き整流性がない場合(つまり RI 値が 1) と比べて有意な差があった (paired t-test, $n=5$, $p=0.028$)。一方、ヒゲ感覚入力遮断側では、正の固定電位でも電流が流れにくくなることはなく、電流と電圧の関係は線形であった。ヒゲ感覚入力遮断側の RI 値は 1.01 ± 0.04 ($n=5$) であり、内向き整流性がない場合とは有意な差が確認されなかった (paired t-test, $n=5$, $p=0.77$)。ヒゲ感覚入力残存側とヒゲ感覚入力遮断側の RI 値に差があるかどうかを検定したところ、有意な差が確認された (2-sample t-test, $p=0.018$)。以上の結果は、覚醒時によく使われた脳部位ほど Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体が存在していることを示唆しており、覚醒時にシナプス結合が増強するメカニズムに迫ることができたと考えよう。

研究③：睡眠-覚醒状態に依存した海馬神経回路の再編成とそのメカニズム

Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の拮抗薬である Philanthotoxin-74 (PhTx) を海馬スライス標本に灌流投与し、eEPSC 振幅への影響を調べた。覚醒していた動物から作成した海馬スライス標本では、PhTx の灌流投与により eEPSC 振幅が有意に減弱していたが(自然に覚醒していた群: paired t-test, $n=9$, $p=7.0 \times 10^{-4}$, 強制的に覚醒させた群: paired t-test, $n=11$, $p=5.4 \times 10^{-3}$)、睡眠をとっていた動物から作成した標本では、eEPSC 振幅に影響は見られなかった (paired t-test, $n=11$, $p=0.67$)。以上の結果は、覚醒していた動物にのみ Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体が存在していることを示しており、断頭直前の覚醒時にシナプス結合が増強していることを示唆している。これは、大脳皮質と共通した結果であり、海馬にも睡眠-覚醒状態に依存した神経回路の再編成が存在していることを強く示唆している。

次に覚醒時にシナプス結合が増強するメカニズムについて調べた。海馬を活性化させる断眠を施した動物と gentle handling による通常の断眠をした動物から脳標本を作製し、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体量を比較した。なお、海馬を活性化させるグループの動物は豊富環境下で飼育した。豊富環境とは、足場

による高低差や遊び道具などを配置した飼育環境のことで、このような環境下に新しく動物を置くと 60 分ほどで海馬 CA1 領域において、樹状突起スパインサイズの増加や、神経活動のマーカーとなる最初期遺伝子の発現が増加することなどが報告されている。またこの環境下ではストレスをかけることなく断眠できることが知られている。この豊富環境下において 8:00~10:00 の 2 時間断眠を行った豊富断眠群の動物と、同じ 2 時間にわたって通常断眠した動物群で比較をした。その結果、通常断眠群の動物だけでなく豊富断眠群の動物でも PhTx により eEPSC の振幅が減弱すること (paired t-test, $n=9$, $p=8.0 \times 10^{-5}$) や、PhTx による eEPSC 振幅の減少率に有意な差があること (2-sample t-test, $p=0.014$) が分かった。以上の結果は、海馬がより活性化していると考えられる豊富断眠群において、より多くの Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体が存在していたことを示唆しており、海馬における覚醒時の Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の挿入も大脳皮質と同様に使用依存的である可能性が示された。

以上まとめたように、in vivo 実験と in vitro 実験を組み合わせる睡眠-覚醒状態に依存した神経回路の再編成を調べたという点が、本研究の特色である。覚醒時にみられる神経結合の増強については、in vitro 実験において Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体をマーカーとして用いてシナプスレベルで再編成を調べた。その結果、大脳皮質と海馬では共通したメカニズムで(使用依存的に)シナプス結合が増強していることが示唆された。一方、睡眠時にみられる神経結合の減弱については、in vivo 実験において感覚応答をマーカーとして用いて再編成を調べた。その結果、レム睡眠ではなくノンレム睡眠時に減弱している可能性を示す結果が得られた。

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 7 件)

① 辛島 彰洋, 中尾 光之, 睡眠時神経活動と睡眠-覚醒制御機構の数理モデル, 医療ジャーナル, 査読無, 53 巻, 2017, 109-115
<https://webview.isho.jp/journal/detail/abs/10.20837/1201702109?p=firstTab>

② Y. Yoshida, D. Nakagawa, A. Karashima, M. Nakao, N. Katayama, Reduction of light source noise from optical intrinsic signals of mouse neocortex by using independent component analysis, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 査読有, 2015, 6277-6280

DOI: 10.1109/EMBC.2015.7319827

③Y. Yoshida, D. Nakagawa, **A. Karashima**, M. Nakao, N. Katayama, Performance evaluation of light source noise reduction algorithm based on independent component analysis for optical intrinsic signal data, *生体医工学*, vol. 56, 2015, 328-335
<https://doi.org/10.11239/jsmbe.53.328>

④ M. Nakao, T.-E. Enkhkhudulmur, N. Katayama, **A. Karashima**, Entrainability of cell cycle oscillator models with exponential growth of cell mass, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 査読有, 2014, 6826-6829
DOI: 10.1109/EMBC.2014.6945196

⑤A. Ueno, N. Katayama, **A. Karashima**, M. Nakao, Targeted subcortical nerve recruitment by controlling waveform of electrical stimulation for MRI-guided surgical ablation, *Advanced Biomedical Engineering*, 査読有, vol. 3, 2014, 139-146
<https://doi.org/10.14326/abe.3.139>

⑥片山統裕, 中川大輝, 上野彩子, **辛島彰洋**, 中尾光之, ウレタン麻酔下マウスの大脳皮質における緑色自家蛍光と自発脳波の相関関係, *計測自動制御学会論文集*, 査読有, vol. 50, 2014, 602-607
<https://doi.org/10.9746/sicetr.50.602>

⑦中尾光之, 片山統裕, **辛島彰洋**, 振動子と神経学, *Clinical Neuroscience*, 査読無, 32 巻, 2014, 738-742
<http://www.chugaiigaku.jp/item/detail.php?id=1546>

[学会発表] (計 26 件)

①千葉溪也, **辛島彰洋**ら, 動物用非侵襲的な睡眠-覚醒モニタリングおよび心電図測定システムの製作, *平成 30 年東北地区若手研究者発表会*, 2018 年 2 月

②**辛島彰洋**ら, 大脳皮質および海馬における睡眠に依存したシナプスホメオスタシス, 「次世代脳」プロジェクト 冬のシンポジウム 2017, 2017 年 12 月

③**A. Karashima** et al., Sleep-wake state dependence of Ca-permeable AMPA receptor expression in the rat cortex and hippocampus, *47th Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2017 年 11 月

④**A. Karashima** et al., Sleep-wake state-dependent synaptic plasticity in the hippocampus, *Neuroscience 2017*, 2017 年 7 月

⑤**辛島彰洋**ら, 睡眠-覚醒状態に依存した海

馬神経回路におけるシナプスホメオスタシス, *日本睡眠学会第 42 回定期学術集会*, 2017 年 6 月

⑥**A. Karashima** et al., Elevated sleep EEG power in delta band after skilled reaching task in rats, *第 94 回日本生理学会大会*, 2017 年 3 月

⑦Y. Masuda, **A. Karashima** et al., Effects of sleep on expression of Ca-permeable AMPA receptors in rat hippocampal CA1 region, *第 94 回日本生理学会大会*, 2017 年 3 月

⑧**A. Karashima**, et al., Sleep-wake state dependent reorganization of cortical excitatory circuits, *計測自動制御学会 ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2016*, 2016 年 11 月

⑨**A. Karashima**, et al., Sleep-wake dependent changes in synaptic AMPA receptor plasticity in rat cortex, *European Sleep Research Society 2016 Congress*, 2016 年 9 月

⑩**A. Karashima**, et al., Interhemispheric asymmetry of sleep EEG following skilled reaching task in rats, *Neuroscience 2016*, 2016 年 7 月

⑪ Y. Masuda, **A. Karashima**, et al., Effect of sleep deprivation on expression of Ca-permeable AMPA receptors in rat cortex, *Neuroscience 2016*, 2016 年 7 月

⑫益田幸輝, **辛島彰洋**ら, 短時間の断眠による AMPA 型グルタミン酸受容体の量への影響, *日本睡眠学会第 41 回定期学術集会*, 2016 年 7 月.

⑬**辛島彰洋**ら, 運動トレーニング後の部分断眠がその後の技能向上に及ぼす影響, *日本睡眠学会第 41 回定期学術集会*, 2016 年 7 月.

⑭益田幸輝, **辛島彰洋**, 中村有孝, 片山統裕, 中尾光之, 短時間の断眠による AMPA 型グルタミン酸受容体の量への影響, *日本睡眠学会第 41 回定期学術集会*, 2016 年 7 月

⑮塚田僚, **辛島彰洋**ら, 技能課題が睡眠時に観測される自発脳波に及ぼす影響, *電子情報通信学会「ME とバイオサイバネティクス研究会」*, 2015 年 11 月

⑯塚田僚, 安齋友花, **辛島彰洋**ら, 運動技能課題直後に観測される使用依存的な睡眠時デルタ波パワーの増大, *日本睡眠学会第 40 回定期学術集会*, 2015 年 7 月

⑰ **辛島彰洋**ら，睡眠状態に依存した大脳皮質神経回路の再編成，*日本睡眠学会第40回定期学術集会*，2015年7月

⑱ **辛島彰洋**，運動技能課題後に観測される使用依存的なノンレム睡眠時徐波パワーの増大とその神経基盤，*日本睡眠学会第40回定期学術集会*，2015年7月

⑲ 安齋友花，**辛島彰洋**ら，運動技能学習がラット運動野の睡眠時脳波ダイナミクスに与える影響，*電子情報通信学会「MEとバイオサイバネティクス研究会」*，2014年11月

⑳ **辛島彰洋**ら，睡眠-覚醒状態に依存した神経可塑性のメカニズム，*第46回東北生理談話会*，2014年10月

㉑ 安齋友花，**辛島彰洋**ら，運動学習がノンレム睡眠時に観測される徐波に及ぼす影響，*第46回東北生理談話会*，2014年10月

㉒ **A. Karashima** et al., State-dependencies of auditory evoked potentials during NREM sleep disclose their neurophysiological origins, *22nd Congress of the European Sleep Research Society*, 2014年9月

㉓ **A. Karashima** et al., Sleep-wake state-dependent changes in expression of Ca²⁺ permeable AMPA receptors in adolescent rat barrel cortex, *Neuroscience 2014*, 2014年9月

㉔ 片山統裕，**辛島彰洋**ら，大脳皮質デルタ波活動の新しいイメージング解析法，*日本睡眠学会第39回定期学術集会*，2014年7月

㉕ **辛島彰洋**ら，睡眠-覚醒状態に依存した興奮性シナプス結合の可塑的变化，*日本睡眠学会第39回定期学術集会*，2014年7月

㉖ 塚田僚，**辛島彰洋**ら，睡眠-覚醒状態に依存した大脳皮質内神経伝達の変化，*日本睡眠学会第39回定期学術集会*，2014年7月

[図書] (計1件)

① M. Nakao, **A. Karashima**, N. Katayama, Sleep Models, In, "Sleep Medicine", Springer, 511-516, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛島 彰洋 (KARASHIMA, Akihiro)
東北工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：40374988

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

中村 有孝 (NAKAMURA, Aritaka)

安齋 友花 (ANZAI, Yuka)

塚田 僚 (Tsukada, Ryo)

益田 幸輝 (MASUDA, Yukiteru)