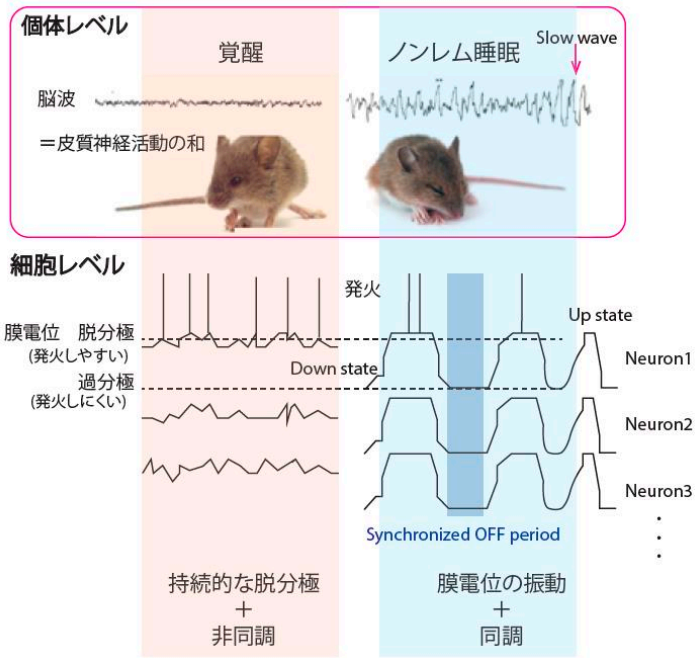
52　ノンレム睡眠特異的脳波の神経基盤	本城　咲季子

【目的】睡眠は神経系を持つ生物種に普遍的に観察される生命現象であり、正常な認知機能および個体の恒常性維持に必須の役割を果たしている。本研究は、ほ乳類の睡眠のうち 80%を占めるノンレム睡眠に着目し、ノンレム睡眠特異的脳波・徐波（Slow wave）の神経基盤の解明を目的とする。

【方法】脳波は多数の大脳皮質神経細胞の活動の和を検出していると考えられている。そこで、脳波測定に加え、徐派の神経基盤を解析するために、高い空間解像度で単一神経細胞活動を検出することが出来る微小電極を用いて神経活動記録を行った。大脳皮質の複数領野、および大脳皮質と相互に投射しあっている視床を記録部位とした。また、自発活動の計測に加え、視床マトリックス細胞、皮質抑制性神経の役割を検討するため、光遺伝学による刺激実験および細胞腫特異的除去実験を行った。

【結果】自由行動下マウスにおいて自発的な睡眠覚醒サイクル（24 時間）および 6 時間の断眠実験とその後の回復期（18 時間）を通じた局所電位と神経発火計測を行った。大脳皮質・視覚野、体性感覚野、運動野、前頭前野、および視床の腹側内側核と後内側腹側核を対象領域とした。これまでの報告通り、断眠によって睡眠圧が高まると、頭蓋脳波の周波数成分のうち、徐派に相当する 0.5〜4 Hz の周波数成分の上昇が観察された。そこで、各大脳皮質領域の局所電位を用いて局所的な徐派の解析を行ったところ、すべての皮質領域において、徐派の起きる頻度、徐派の振幅の大きさ、および徐派の傾き、すべてが断眠によって上昇することが明らかとなった。興味深いことに、自発的な徐派の頻度や断眠に対する反応性について、大脳皮質領域間で違いが観察された。徐派の発生機構、および断眠によって増強が起きるメカニズムを解析するため、我々は視床マトリックス細胞の光遺伝学刺激を行った。その結果、マトリックス細胞の発火によって大脳皮質で徐派様反応が誘導されることが明らかとなった。さらに大脳皮質において、抑制性神経細胞の除去実験を行ったところ、徐派成分の減少が観察された。

覚醒時脳波とノンレム睡眠時脳波



52. ノンレム睡眠特異的脳波の神経基盤

本城　咲季子

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構

Key words：ノンレム睡眠，徐派，大脳皮質，視床

緒　言

睡眠は神経系を持つ生物に普遍的に観察される生命現象である。持続的な断眠によってまず認知機能の低下が観察され（数時間～）、最終的には個体の死に至ることが動物実験により報告されている（数週間～）。このような観察から睡眠は神経系および全身の恒常性維持に必須の役割を果たすと考えられるが、その分子・細胞レベルでの具体的な役割はいまだ明らかではない。覚醒が持続するにつれて強くなってくる眠気（睡眠圧）の分子的実体も、それがどのように正常な認知機能の発露に干渉するのかもいまだ明らかではない。

これまでに睡眠圧と最も強い相関を示すとされているのは徐派あるいは Slow Wave と呼ばれるノンレム睡眠時特異的な脳波波形である。覚醒時の脳波は活性型脳波と呼ばれ、振幅が小さく早い周波数成分が優勢であるのに対し、ノンレム睡眠時は徐派・Slow Wave と呼ばれる高振幅でゆっくりとした脳波の波（0.5～4 Hz）が観察される。睡眠圧が高い状態で眠ると、徐派・Slow Wave 成分が多く、睡眠が続き睡眠圧が解消されるにつれ、徐派・Slow Wave 成分は少なくなることが知られている。この徐派・Slow Wave は睡眠圧の指標となるだけでなく、神経可塑性とも双方向性に関係する。覚醒時に学習に使われた脳領域はその後のノンレム睡眠で徐派・Slow Wave 成分が多くなり、また睡眠中に人工的な刺激で徐派・Slow Wave を誘導すると記憶の固定が促進されることが報告されている。

それでは睡眠圧と高い相関を示し、神経可塑性とも密接にかかわる徐派・Slow Wave はどのような神経活動から生じるのであろうか。覚醒時、大脳皮質の神経細胞群は常時脱分極しており、入力に応答して発火する。一方で、ノンレム睡眠中は大脳皮質神経細胞の膜電位が振動し、発火を伴う脱分極期と（Up state、ON period）、発火を伴わない過分極期（Down state、Off period）を数百ミリ秒毎に繰り返す。この振動が多数の細胞間で同期しているため、膜電位の変化が足し合わさって高振幅の脳波として観察されると考えられている（図 1）。しかし、なぜノンレム睡眠中はこのような脱分極と過分極間の振動を繰り返すのか、またそれがどのようにして多数の神経細胞間で同期しているのか、またなぜ長時間の覚醒や学習がその後の睡眠でこの現象を促進するのかはいまだ明らかではない。そこで、本研究はノンレム睡眠中に大脳皮質神経細胞が脱分極と過分極を繰り返す細胞レベルでのメカニズム、および Up／Down state が同期されるメカニズムの解明を目的とした。我々はまず、自由行動下のマウスにおいて、視床、皮質の複数領域で徐派・Slow Wave を測定した。断眠実験によって睡眠圧を高めることで、全ての領域で徐派・Slow Wave の数、振幅の高さ、局所電位の Down state から Up state への遷移の傾きが上昇することが観察された。また、抑制性神経の細胞除去実験を行ったところ、徐派・Slow Wave 成分が減少することが観察された。

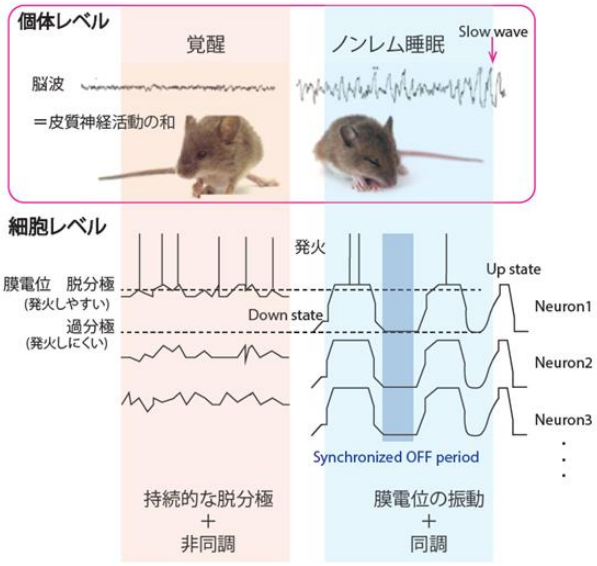


図 1. 覚醒時脳波とノンレム睡眠時脳波

方　法

1.　電極挿入手術

野生型マウス（C57BL/6N もしくは C57BL/6J 以下 B6）、Calb1-2A-dgCre-D （以下 Calb1-Cre）、B6N.Cg-Ssttm2.1(cre)Zjh/J（以下 Sst-Cre）、B6.FVB(Cg)-Tg(Htr3a-cre)NO152Gsat/Mmucd（以下 Htr-Cre）の成熟雄個体*（P90 以降）を用いた。飼育は 12 時間明暗コントロール条件下で行われた。手術前日に抗炎症作用を持つデキサメタゾン、手術当日にデキサメタゾン、鎮痛剤メロキシカム、抗微生物薬セファゾリンの投与を行い、手術は　　すべて無菌操作下で行われた。イソフルラン麻酔下のマウスに脳波測定用ステンレスねじ電極 4 局（直径 1 mm、Frontal cortex、Parietal cortex、リファレンスは小脳上頭蓋骨、グラウンドは臭球上頭蓋骨）、筋電測定用ステンレスワイヤー電極 2 対（首、顔）とともに Neuronexus 社製シリコンプローブを頭蓋内に挿入した。シリコンプローブは 16 個のレコーディングサイトを持ち (platinum iridium、177 micro m^2、インピーダンス 1 MΩ)、大脳皮質層構造の第二層から第六層を通じてレコーディング出来るように挿入された。手術後、約 1 週間の回復期間を与えた。

2.　慢性神経活動記録および断眠実験

手術から回復したマウスは Intan Technologies の記録装置に有線で接続され、ケーブルに馴化するための馴化期間が与えられた。ケージ内で自由に動き回り、身繕い、巣材を用いて営巣するなど正常な行動をとっていることを確認してから、まず 24 時間の自発的な睡眠覚醒サイクルの記録を行った。次に、6 時間の断眠を行い、6 時間の断眠およびその後 18 時間の睡眠覚醒を記録した。断眠はケージ交換によりマウスを新規環境に置き探索行動を誘発させると共に（2 時間に 1 回）、必要に応じて新規オブジェクトをケージ内に配置して行った。

3.　データ解析

データは 30 kHz のサンプリングレートで取得され、0.5～10 kHz のバンドパスフィルターを適用された。すべてのデータは Matlab にインポートされ、その後の解析はカスタムの Matlab スクリプトによって解析を行った。30 kHz の生データを 1 kHz にダウンサンプルすることで局所電位（Local Field Potential、以下 LFP）を、300～5k Hz のバンドパスフィルターを適用することで活動電位を含む高周波数帯域を抽出した。明期 12 時間分の高周波数帯域成分の絶対値の中央値をとり、その 7.5 倍以上大きなイベントを活動電位候補として抽出した（Multi Unit Activity、以下 MUA）。これら MUA は波形に基づいた主成分解析によって単一神経細胞毎の発火へ分類し、（Spike Sorting、Wave clus2.0）発火頻度および発火パターンの解析へ用いた。

4. 細胞腫特異的光遺伝学操作および神経細胞除去

視床マトリックス細胞、皮質抑制性神経を特異的に標識するために、Calb1-Cre、Sst-Cre、Htr3a-Cre の遺伝子改変マウス系統を用いた。光遺伝学による視床マトリックス細胞刺激のために AAV10-DIO-ChR2 を視床腹側内側核（Ventromedial nucleus、VM）へ（$>10^{12}$gc per ml、0.5 μl）局所感染させ、また光刺激用オプティックファイバー（直径 200 μm、NA0.37）を VM の中心より 0.5 mm 背側にインプラントした。AAV インジェクションから 4 週間以降に、波長 473nm 1 mW/mm2 の青色光をオプティックファイバーを通して照射し光刺激を行った。光刺激の強度は照射時間の調節によって行った。また、細胞除去実験のために AAV10-DIO-DTR（ジフテリアトキシン受容体）を大脳皮質一次運動野（M1）へ局所感染させた（$>10^{12}$ gc per ml、1 μl）。手術から回復後にまず自発睡眠覚醒サイクルの記録および断眠実験をおこなった。さらに 4 週間後に感染細胞を選択的に除去するためにジフテリアトキシンを腹腔投与し、投与から 2 週間後に自発睡眠覚醒サイクルの記録および断眠実験を行った。

結果および考察

1. 大脳皮質の前頭前野、感覚野、運動野における徐派・Slow Wave の発生ダイナミクス

我々はまず、自発睡眠覚醒（ベースラインレコーディング）および 6 時間の断眠からの回復睡眠における Slow Wave を大脳皮質の各領域の LFP を用いて定量した。マウスは夜行性であるため、暗期 12 時間に起きて活動をした直後の明期の開始時点で睡眠圧が高まっている。それとよく合致して、測定を行ったすべての皮質領野において、明期開始時点で最も徐派・Slow Wave 発生頻度が高く、一日を通じてゆっくり減少していくということが観察された（図 2）。また、6 時間の断眠を行った直後はベースラインの同時刻に比べ徐派・Slow Wave の発生回数が増加していることが観察された。この傾向は内側前頭前野でもっとも顕著な傾向にあった。また、徐派・Slow Wave の前後の大脳皮質神経群の発火パターンの解析を行った。その結果、Up state／ON period 中に発火が集中し、Down state／OFF period には発火頻度が顕著に低下することが観察された。大変興味深いことに、この Down state 中の発火低下は感覚野と運動野において、mPFC よりも顕著であった。この結果はヒトにおける頭蓋内神経活動記録の結果と合致し［1］、種を超えて保存された徐派・Slow Wave の大脳皮質内分布パターンの存在が示唆された。

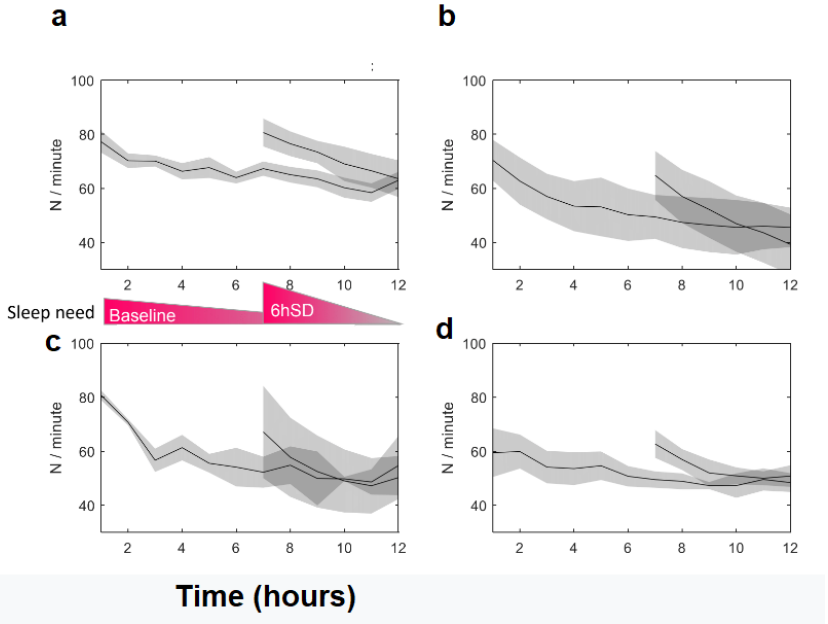


図 2. 大脳皮質各領野における徐派・Slow Wave の発生頻度と睡眠圧の影響

各折れ線グラフは、明期 12 時間のうち各時間帯で、ノンレム睡眠一分当たりの徐派・Slow Wave の数を表す。1 時間から始まっている線がベースラインを表し、7 時間から始まっているのが 6 時間の断眠実験からの回復睡眠を表している。

a）内側前頭前野（mPFC）、b）体性感覚野、c）視覚野、d）運動野。

2. 視床マトリックス細胞の光遺伝学刺激は大脳皮質に徐派・Slow Wave 様の反応を誘導する

以前の研究において我々は、視床のマトリックス細胞と呼ばれる神経細胞の睡眠覚醒調節における役割に注目した。マトリックス細胞は大脳皮質の広範な領域に投射することが特徴である。前後軸にそって、前頭部に行くほど投射が強くなるが、左右軸にはそのような投射の選択性は観察されず、運動野、感覚野、連合野など領野の機能によらず非特異的に投射している。この解剖学的特徴により、視床マトリックス細胞は大脳皮質全体を活性化、あるいは領野間を同調させるのに適していると考えられてきた。そこで我々はまずマトリックス細胞の発火パターンを計測し、覚醒時は連続的に高頻度で発火していることを明らかにした。また、マトリックス細胞の覚醒時の発火パターンを模倣するような高頻度で光遺伝学刺激行うと、ノンレム睡眠から覚醒への遷移が誘導されることを報告した［2］。

ノンレム睡眠時にマトリックス細胞の発火頻度は覚醒時の 20%程度まで低下し、発火のパターンも持続的（Tonic）発火から、バースト（Burst）と呼ばれる長い静止期の後集中的に発火するパターンへと変化する。しかし、このノンレム睡眠時のマトリックス細胞の役割はいまだ明らかではない。そこで今回我々は、マトリックス細胞のノンレム睡眠における役割に着目した。我々はノンレム睡眠時の低頻度・バースト発火を模倣するため、15 ms の光刺激を 0.05 Hz（20 秒に一度）で行った。刺激は明期 12 時間を通じて行い、刺激のタイミングとは独立して睡眠覚醒判定を行った。その後、ノンレム睡眠中に行われた刺激を抽出し、頭蓋脳波、大脳皮質（mPFC）LFP、大脳皮質（mPFC）神経発火（MUA）の反応を解析した（図 3a 上）。その結果、まず頭蓋脳波の反応は前頭葉において頭頂葉より顕著に大きいことが観察された。これはマトリックス細胞の投射パターンと合致する反応と言える。また、mPFC の LFP において、刺激のオンセットから 15 ミリ秒後に正のピーク、40 ミリ秒後に負のピーク、そしてゆるやかな、徐派・Slow Wave 様の正のピークが 100 ミリ秒後に観察された（図 3a 中、ピンク矢頭）。また 15 ミリ秒から 20 ミリ秒にかけて、大脳皮質の神経群の一過的な発火と、100 ミリ秒後の正のピークの間に多くの神経が発火頻度を低下させることが観察された。これまでに徐派・Slow Wave の Down state／OFF period 間に発火頻度が低下するメカニズムについて、神経伝達物質放出小胞の枯渇など様々な説が提唱されていた。そこで我々は、同一マウスにおいて、同一強度の刺激をより高頻度で行った（10 Hz train at 0.05 Hz）。その結果、脳波の最初のネガティブピーク、および LFP の第一ポジティブピーク、第二ネガティブピーク、および MUA の反応性は刺激トレイン中の最初の刺激と最後の刺激の間で差は観察されなかった。したがって、視床マトリックス細胞、およびここで記録されているほとんどの皮質神経細胞は、第一刺激の後、小胞の枯渇などにより「発火出来ない」状態ではなく、興奮性の刺激に十分応答出来るにも関わらず発火頻度を低下させることがわかった。さらに興味深いことに、刺激から 100 ミリ秒後のポジティブピークに関しては、単一パルス刺激に比べ顕著に減衰していた（図 3b 中、矢頭、破線）。

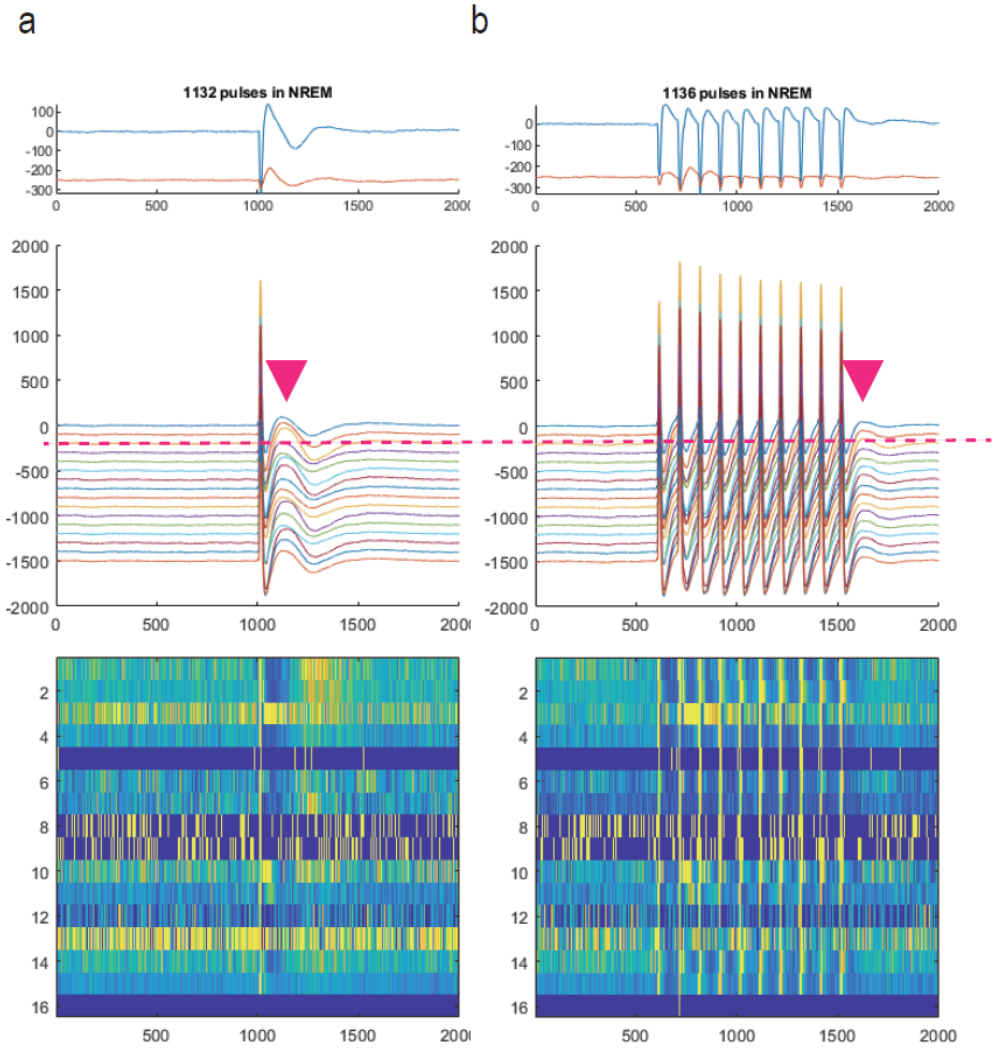


図 3. 視床マトリックス細胞の光遺伝学刺激に対する大脳皮質の反応性

マトリックス細胞からなる腹側内側核を光遺伝学を用いて刺激し、脳波（上）、mPFCのLFP（中）、MUAの反応を測定した。aは10ミリ秒の単一刺激0.05 Hz、bは10ミリ秒パルス10 Hz1秒0.05 Hz刺激、レーザー強度は同じ。

3. 抑制性神経の一部を除去することで、LFP の徐派・Slow Wave 成分が減少する

上記結果から、視床マトリックス細胞がノンレム睡眠中に低頻度で発火することが大脳皮質で徐派・Slow Wave を誘導している可能性が示唆された。それでは、興奮性の視床の神経が大脳皮質で過分極・および発火頻度の低下を誘導するメカニズムは何であろうか。我々はマトリックス細胞が抑制性神経を標的として、その抑制性神経が周辺細胞の活動抑制に貢献しているのではないかという仮説を立てた。そこで、抑制性神経のうちこれまでに活性化により徐派を生成すると報告されているソマトスタチン陽性神経［3］、および視床マトリックス細胞によってターゲットされる Htr3a 陽性神経［4］に着目した。徐派・Slow Wave は大脳皮質の神経活動の和からなる脳波パターンであるため、我々は皮質内の徐派・Slow Wave に必須構成要素を同定するため、局所的な細胞除去実験を行った。その結果、ソマトスタチン陽性細胞の除去、Htr3s 陽性細胞の除去によってそれぞれ 10%程度の徐派・Slow Wave 成分の低下が観察された（各 n=1、n=2）。今後はサンプル数を増やすとともに、ソマトスタチン、Htr3a のダブルの除去実験などを行い、徐派・Slow Wave が完全に抑制されるかどうか検討を進めていく予定である。また、これら徐派・Slow Wave の構成因子が、長時間の断眠中にどのような変化を示すのか、神経活動、神経細胞の形態、および転写発現の観点から検討していく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、本研究はウィスコンシン大学マディソン校 Center for Sleep and Consciousness の Dr. Giulio Tononi、Dr. Chiara Cirelli である。本研究においては当研究室において取得されたデータと Tononi/Cirelli 研究室で取得したデータを総合して解析を行った。

文　献

1） Nir Y, Staba RJ, Andrillon T, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Fried I, Tononi G. Regional slow waves and spindles in human sleep. Neuron. 2011 Apr 14;70(1):153-69. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.043.

2） Honjoh S, Sasai S, Schiereck SS, Nagai H, Tononi G, Cirelli C. Regulation of cortical activity and arousal by the matrix cells of the ventromedial thalamic nucleus. Nat Commun. 2018 May 29;9(1):2100. doi: 10.1038/s41467-018-04497-x.

3） Funk CM, Peelman K, Bellesi M, Marshall W, Cirelli C, Tononi G. Role of Somatostatin-Positive Cortical Interneurons in the Generation of Sleep Slow Waves. J Neurosci. 2017 Sep 20;37(38):9132-9148. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1303-17.2017

4） Cruikshank SJ1, Ahmed OJ, Stevens TR, Patrick SL, Gonzalez AN, Elmaleh M, Connors BW. Thalamic control of layer 1 circuits in prefrontal cortex. J Neurosci. 2012 Dec 5;32(49):17813-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3231-12.2012.