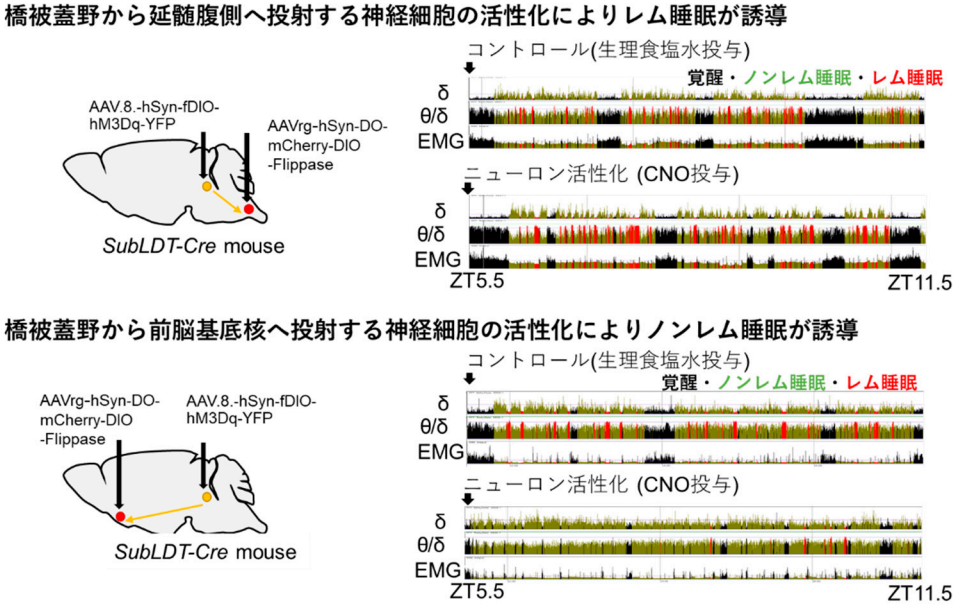
134　レム睡眠を生み出す未知の神経・分子メカニズムの解明	柏木　光昭

【目的】我々ヒトを含む哺乳類の睡眠はレム（Rapid Eye Movement）睡眠とノンレム（non-REM）睡眠という２つのステージから構成される。ノンレム睡眠中には大脳皮質がゆったりと同期した活動を示し徐波と呼ばれる脳波が観察され、ノンレム睡眠中の徐波は記憶の固定に関わる。その一方、レム睡眠中の大脳皮質の神経細胞は覚醒時と同様の活発な活動を示し、レム睡眠中は急速な眼球運動を伴うなど末梢でも大きな変化が起きる。睡眠の制御メカニズムを明らかにしようとこれまで数多くの研究が行われてきた。本研究では、とりわけ理解が進んでいないレム睡眠の誘導のメカニズムの解明を試みた。古典的な破壊実験・薬理実験から注目されてきた脳幹に着目した。脳幹は様々な機能に関わる神経細胞が混在するため、破壊実験や薬理実験では特異性を欠き、レム睡眠を誘導する神経機構の詳細な解析は難しいと考えた。そこで遺伝学的手法を用い、レム睡眠の誘導を担う神経細胞の同定を試みた。

【方法】破壊実験・薬理実験からレム睡眠の誘導に重要であるとされる脳幹の橋被蓋野に着目した。同領域で遺伝子組換え酵素 Cre を発現するノックインマウス（*SubLDT-Cre*）マウスを作製した。同マウスの脳幹の橋被蓋野に蛍光分子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入し、同領域の投射先を調べた。次に高効率で軸索末端から感染するアデノ随伴ウイルスベクターと化学遺伝学を組み合わせ、橋被蓋野内の神経細胞を投射経路ごと活性化した際にレム睡眠に与える影響を調べた。本研究で用いた化学遺伝学の hM3Dq 受容体は、マウスの内在性のリガンドには反応せず、人工リガンド CNO（clozapine-N-oxide）により一過性の神経発火を促す人工受容体である。

【結果】*SubLDT-Cre* マウスにおける橋被蓋野の神経細胞の投射先を調べるために、同マウスの橋被蓋野にプレシナプスで蛍光分子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入した。レム睡眠中の筋弛緩の制御に重要とされる延髄の腹側部と覚醒時の脳波の制御に関わるとされる前脳基底部に強い投射が観察された。まず橋被蓋野から延髄腹側へと投射を送る神経細胞の活動を化学遺伝学により活性化させたところレム睡眠量が増加した。本結果からこれまで謎であったレム睡眠を誘導する神経細胞が実際に橋被蓋野に存在することが明らかになった。また、同様の手法を用いて橋被蓋野から前脳基底へ投射する神経細胞の活動を化学遺伝学で操作したところ、前述の結果とは反対にノンレム睡眠が誘導された。本研究により、マウス橋被蓋がレム睡眠とノンレム睡眠の誘導それぞれに重要であることが明らかになった（柏木ら、未発表）。

本研究で明らかにした睡眠を制御する新規神経回路



134. レム睡眠を生み出す未知の神経・分子メカニズムの解明

柏木　光昭

*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，レム睡眠，化学遺伝学，マウス，アデノ随伴ウイルス

緒　言

我々ヒトを含む哺乳類の睡眠はレム（REM：Rapid Eye Movement）睡眠とノンレム（non-REM）睡眠という 2 つのステージから構成される。ノンレム睡眠中には大脳皮質がゆったりと同期した活動を示し徐波と呼ばれる脳波が観察される。ノンレム睡眠中の徐波は記憶の固定に関わる。その一方、レム睡眠中の大脳皮質の神経細胞は覚醒時と同様の活発な活動を示し、レム睡眠中は骨格筋の脱力と急速な眼球運動を伴うなど末梢でも大きな変化が起きる。

睡眠の制御メカニズムを明らかにしようとこれまで数多くの研究が行われてきた。古典的な切断実験から脳幹の構造のみを残したネコからレム睡眠時におこる筋弛緩が観察されたことから、レム睡眠制御には脳幹が重要であることが明らかになった。その後、アセチルコリン受容体作動薬のカルバコールを脳幹内の橋被蓋野と呼ばれる脳領域に局所注入するとレム睡眠が強く誘導されることがわかり、同領域がレム睡眠の制御中枢であると長らく考えられてきた。脳幹は様々な機能に関わる神経細胞が混在するため、破壊実験や薬理実験では特異性を欠き、レム睡眠を誘導する神経機構の詳細な解析は難しいと考えた。実際に私たちの最近の遺伝学的研究では、橋被蓋野はレム睡眠の誘導だけでなくレム睡眠の抑制を担うことも明らかになり［1，2］、同領域がこれまで考えられてきたよりも複雑な構造であると示唆されている。そこで私は遺伝学的手法を用い、細胞種特異的かつ神経投射特異的に特定の細胞集団を標識することでレム睡眠の誘導を担う神経細胞の同定を試みた。

私たちは橋被蓋野の一部の神経細胞で遺伝子組換え酵素 Cre を発現するノックインマウス（*SubLDT-Cre*）を作製した。本マウス・化学遺伝学［3］・アデノ随伴ウイルスベクターを組み合わせ、レム睡眠を誘導する神経細胞の同定を試みた。その結果、橋被蓋野から延髄腹側へと投射する神経細胞がレム睡眠の誘導を担うことを発見した。本結果により、長らくその真偽が謎であった橋被蓋野でレム睡眠の誘導を担う神経細胞が実在することが明らかになった。また、橋被蓋野から前脳基底核へと投射する神経細胞の活動を化学遺伝学により活性化したところ、前述とは反対に、ノンレム睡眠が誘導されレム睡眠が抑制された。これらの結果から、マウス脳幹の橋被蓋野がレム睡眠とノンレム睡眠の両方の制御に関わることが明らかになった。今後私たちが遺伝学的に同定した睡眠を制御する投射神経細胞それぞれの発生メカニズムの解析や主観比較により、睡眠の発生や進化に関して重要な知見が得られる可能性が期待される。

方　法

1.　動物実験

マウス（*Mus Musculus*）を用いた動物実験を行った。すべての実験は筑波大学動物実験委員会に承認を受けたプロトコール下で行った。C57BL/6J バックグラウンドの 8 週齢以上のオス・メスマウスを実験に使用した。

2.　アデノ随伴ウイルスの作製

アデノ随伴ウイルスの作製は標準的な helper virus free triple transfection method を用い作製した［2］。HEK293T 細胞に pRep/Cap プラスミド、pHelper プラスミド、pITR プラスミドを導入した。遺伝子導入から 72 時間後に回収し精製を行った。

*現在の所属：東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

3. マウス手術

先行研究にならい行った［1, 2］。イソフルラン麻酔下（導入：3%。、維持：1.5%）で脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨 6 か所に 1 mm 径の穴を歯科用ドリルで作製した。4 か所をウイルスベクターの注入、2 か所を脳波記録用ネジ電極の留置に使用した。筋電図記録用のワイヤー電極も僧帽筋両側に留置した。手術後 3 週間回復期間を設けた。

4. 睡眠記録・睡眠解析

先行研究にならい行った［1, 2］。化学遺伝学のリガンド投与は腹腔内投与により行った。腹腔内投与の慣らしのため、睡眠記録開始前に各マウス最低 5 回生理食塩水を投与した。その後睡眠記録を行った。初日の Zeitgeber Time（ZT）5.5 に生理食塩水投与後に最低 6 時間脳波筋電図を記録した。翌日の ZT5.5 に化学遺伝学リガンドである CNO（clozapine-n-oxcide、1.5 mg/kg）の投与を行い、その後最低 6 時間脳波筋電図を記録した。脳波筋電図は vital recorder（kissei comtec）を用い 512 Hz で記録した。脳波の解析は sleep sign（kiessei comtec）を用い、4 秒エポックで行った。筋電図の積分値が高いものを覚醒、筋電図の積分値が低く脳波の低周波数成分（0.5～4.0 Hz）が高いものをノンレム睡眠、筋電図の積分値が低く脳波のシータ波成分（6.0～10.0 Hz）が高いものをレム睡眠、とマニュアルでスコアリングを行った。

5. 組織学実験

先行研究にならい行った［1, 2］。睡眠記録実験の終了後、組織学実験によりウイルスベクターの発現部位の確認を行った。生理食塩水 20 ml と 10%中性緩衝ホルマリン 30 ml を用い灌流固定を行った。40 μm の組織切片を作製後、抗 Red fluorescent protein（RFP）抗体（MBL）、抗 Green fluorescent protein（GFP）抗体（Nakalai tesque）、抗 Choline acetyltransferase（Chat）抗体（Millipoere）を用いて免疫組織化学染色を行った。対比染色には DAPI を用いた。蛍光スライドスキャナー（Axioscan.Z1）を用いて撮像した。

結果および考察

1. 橋被蓋野からの出力部位の同定

最初に橋被蓋野の神経細胞の出力パターンの解析を試みた。私たちは以前、古典的にレム睡眠の制御中枢とされる橋被蓋野で Cre を発現するマウス *SubLDT-Cre* を作製した（柏木ら、未発表）。同マウスの橋被蓋野に Cre 依存的にプレシナプスで GFP を発現するアデノ随伴ウイルス（AAV1-hSyn-flex-tdTomato-2A-synaptophysin-GFP）を微量注入した（図 1A）。手術から 4 週間後にマウスを灌流固定し連続切片を作製したところ、GFP シグナルは延髄の腹側部（Gi）と前脳基底核（Basal forebrain）に強く観察された（図 1B～D）。これらの神経核は先行研究より睡眠制御に関わることが指摘されており、次に神経投射ごとに神経活動を操作することでこれらの神経細胞が睡眠制御に果たす役割の解析を試みた。

2. 橋被蓋野から延髄腹側へと投射する神経細胞がレム睡眠を促進

橋被蓋野の *SubLDT-Cre* 陽性神経細胞のうち、延髄腹側へと投射する神経細胞の遺伝学的標識を試みた。本研究では、軸索末端から高効率に感染する新規 AAV 血清型である AAVrg［4］を使用した。延髄腹側に Cre 依存的に遺伝子組換え酵素 Flippase を発現する逆行性アデノ随伴ウイルスベクター（AAVrg-hSyn-DO-mCherry-DIO-Flippase）を、橋被蓋野に Flippase 依存的に化学遺伝学受容体 hM3Dq を発現するアデノ随伴ウイルスベクター（AAV8-hSyn-fDIO-hM3Dq-YFP）をそれぞれ *SubLDT-Cre* マウスに微量注入した（図 2A）。CNO 投与によりこれらのニューロンを活性化しその後の睡眠量を測定した結果、同ニューロンの活性化後はコントロールに比べレム睡眠が多く誘導された（図 2B～C）。本結果は、同ニューロンがレム睡眠の誘導を担うことを示唆する。橋被蓋野は長らくレム睡眠の誘導に重要であるとされてきた。複数の研究グループがレム睡眠の誘導を担う神経細胞の遺伝学的同定を試みてきたものの、同領域の複雑さゆえかその真偽は不明であった。本研究では、新規 Cre マウスと神経投射特異的な活動操作法を組み合わせた。このような細胞種特異的かつ投射経路特異的な遺伝学的標識が、複雑な橋被蓋野からレム睡眠を誘導する神経細胞の同定を世界で初めて可能にしたと推察される。

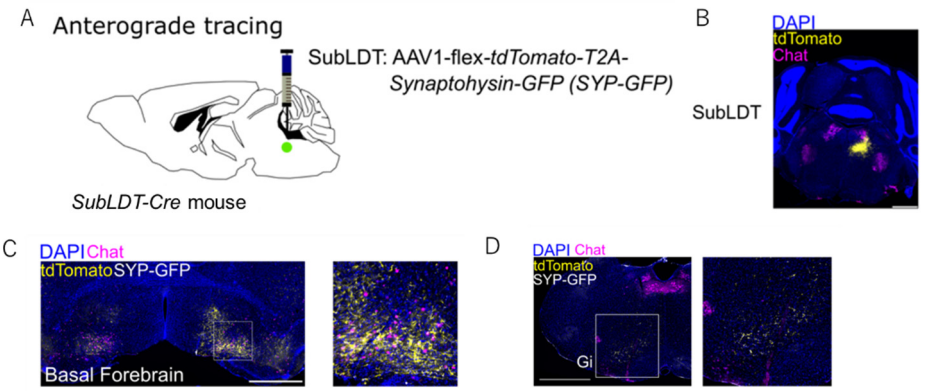


図 1. *SubLDT-Cre* マウスにおける橋被蓋野の出力脳部位の解析

A) 実験の模式図。

B) tdTomato 由来のシグナルが SubLDT に検出された。Scale bar：1 mm、Yellow：tdTomato、Magenta：Choline acetyltransferase（Chat）、Blue：4', 6-diamidino-2-phenylindole （DAPI）。

C) 前脳基底核（Basal forebrain）で synaptohysin-GFP のシグナルが強く検出された。Scale bar：1 mm、Green：synaptophysin-GFP、Magenta：Chat、Blue：DAPI。

D) 延髄腹側部（Gi）で synaptohysin-GFP のシグナルが強く検出された。Scale bar：1 mm、Green: synaptophysin-GFP、Magenta：Chat、Blue：DAPI。

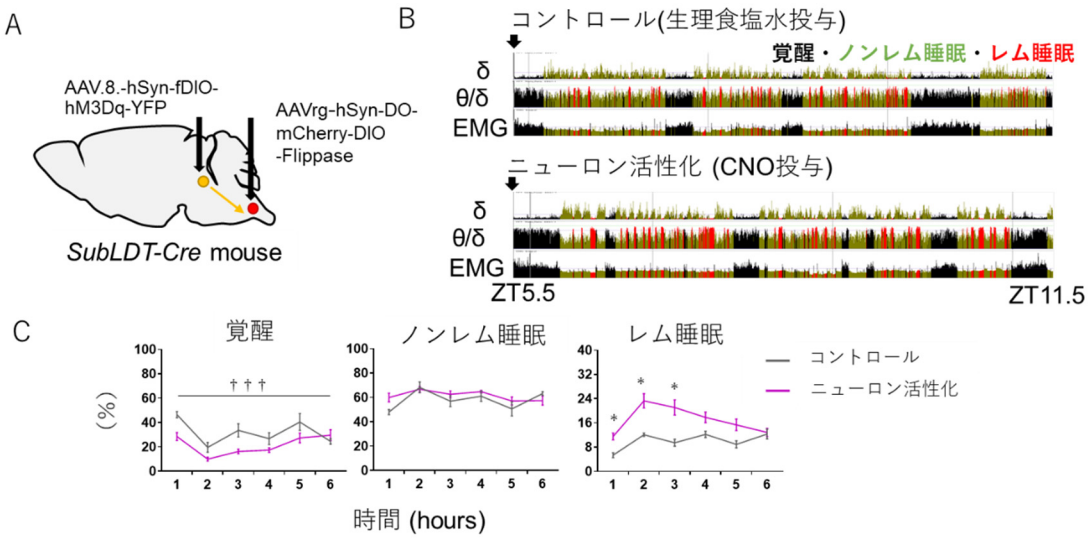


図 2. 橋被蓋野から延髄腹側へと投射する神経細胞の人為的活性化によりレム睡眠が誘導された

A) 実験の模式図。

B) 延髄腹側へと投射する橋被蓋野の神経細胞を活性化した際のヒプノグラム。黒が覚醒、緑がノンレム睡眠、赤がレム睡眠を表す。δ（脳波の 0.5～4.0 Hz 成分）、δ/θ（脳波のうち 0.5～4.0 Hz 成分に対する 6.0～10.0 Hz 成分の割合）、EMG：筋電図の積分値、横軸：時間。

C) 同ニューロン活性化はレム睡眠を誘導する。グラフは mean±SEM を表す（n=6 mice）。Repeated Measeures two-way ANOVA with geisser-greenhouse correction followed by bonferroni's test 検定を用いた。*P＜0.05。

3. 橋被蓋野から前脳基底核へと投射する神経細胞がノンレム睡眠を促進

次に上述の手法で橋被蓋野から前脳基底核へと投射する神経細胞の睡眠制御に果たす役割を調べた（図 3A）。化学遺伝学により同神経細胞を活性化させたところ、延髄腹側へと投射する神経細胞を活性化した際とは対照的にノンレム睡眠が強く誘導された（図 3B、C）。前脳基底核は睡眠－覚醒の制御に重要であるとされてきた［5, 6］。今後、今回同定した神経細胞がどのようにしてノンレム睡眠を誘導しているのか詳細なメカニズムの解析を進めていく予定である。

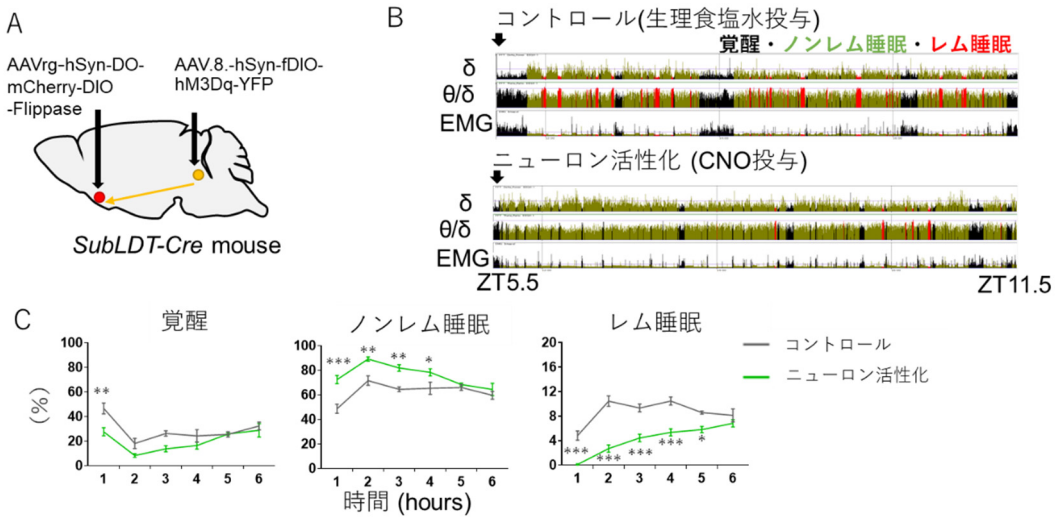


図 3. 橋被蓋野から前脳基底核へと投射する神経細胞の人為的活性化によりノンレム睡眠が誘導された

A) 実験の模式図。

B) 前脳基底核へと投射する橋被蓋野の神経細胞を活性化した際のヒプノグラム。黒が覚醒、緑がノンレム睡眠、赤がレム睡眠を表す。δ（脳波の 0.5～4.0 Hz 成分）、δ／θ（脳波のうち 0.5～4.0 Hz 成分に対する 6.0～10.0 Hz 成分の割合）、EMG：筋電図の積分値、横軸：時間。

C) 同ニューロン活性化はノンレム睡眠を誘導する。グラフは mean±SEM (n＝5 mice) を表す。Repeated Measeures two-way ANOVA followed by bonferroni's test 検定を用いた。*P＜0.05、***P＜0.001。

共同研究者・謝辞

本研究は、筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構林悠研究室で行われました。研究をご指導くださいました林悠客員教授と研究をサポートしてくださいました同研究室の皆様に深く感謝いたします。

文　献

1) Hayashi Y, Kashiwagi M, Yasuda K, Ando R, Kanuka M, Sakai K, Itohara S. "Cells of a common developmental origin regulate REM / non-REM sleep and wakefulness in mice," Science, vol. 350, no. 6263, pp. 957–961, 2015. PMID: 26494173 DOI: 10.1126/science.aad1023

2) Kashiwagi M, Kanuka M, Tatsuzawa C, Suzuki H, Morita M, Tanaka K, Kawano T, Shin JW, Suzuki H, Itohara S, Yanagisawa M, Hayashi Y. "Widely Distributed Neurotensinergic Neurons in the Brainstem Regulate NREM Sleep in Mice," Current Biology, vol. 30, no. 6, pp. 1002-1010.e4, Mar. 2020, PMID: 32032507 doi: 10.1016/j.cub.2020.01.047.

3) Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. "Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand," Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 104, no. 12, pp. 5163–5168, 2007. PMID: 17360345 DOI: 10.1073/pnas.0700293104
4) Tervo DG, Hwang BY, Viswanathan S, Gaj T, Lavzin M, Ritola KD, Lindo S, Michael S, Kuleshova E, Ojala D, Huang CC, Gerfen CR, Schiller J, Dudman JT, Hantman AW, Looger LL, Schaffer DV, Karpova AY. "A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons," Neuron, vol. 92, no. 2, pp. 372–382, Oct. 2016, PMID: 27720486 doi: 10.1016/J.NEURON.2016.09.021.
5) Anaclet C, Pedersen NP, Ferrari LL, Venner A, Bass CE, Arrigoni E, Fuller PM. "Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms," Nature Communications, vol. 6, p. 8744, 2015, PMID: 26524973 doi: 10.1038/ncomms9744.
6) Xu M, Chung S, Zhang S, Zhong P, Ma C, Chang WC, Weissbourd B, Sakai N, Luo L, Nishino S, Dan Y. "Basal forebrain circuit for sleep-wake control," Nature Neuroscience, vol. 18, no. 11, 2015, PMID: 26457552 doi: 10.1038/nn.4143.