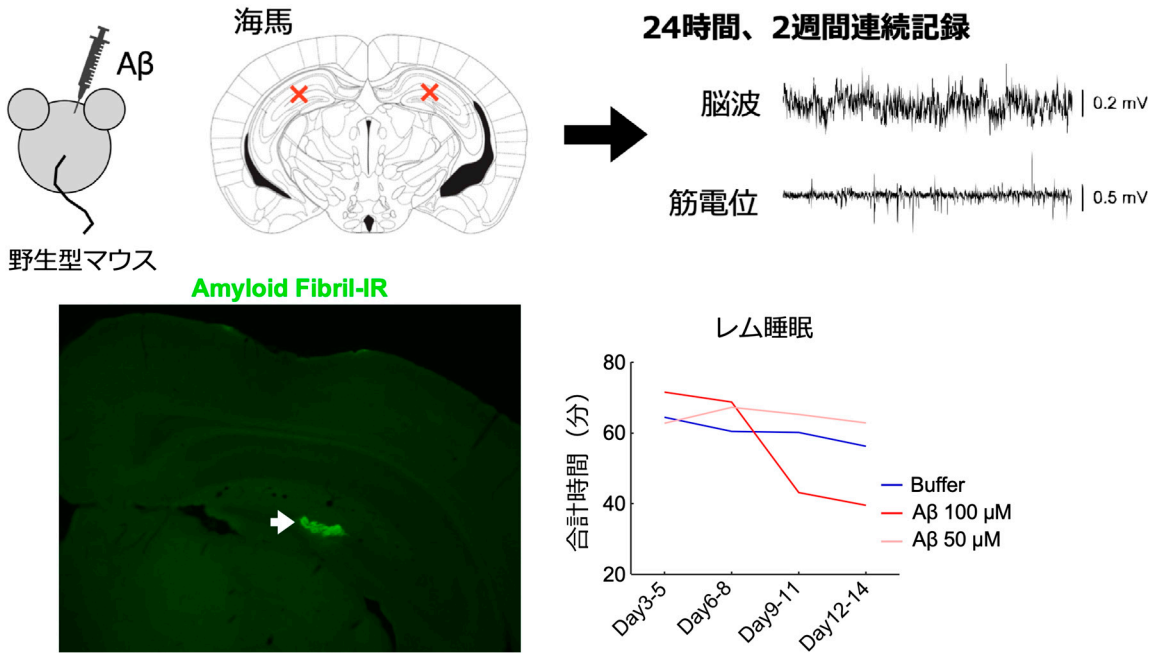
154　加齢模倣による睡眠変化メカニズムの解明	常松　友美

【目的】加齢によりノンレム睡眠が浅くなり、睡眠時の中途覚醒の頻度が増加し、結果として睡眠の質が低下する。しかしながら、なぜ加齢により睡眠の量や質が変化していくのか、そのメカニズムは未だ不明である。アルツハイマー症やパーキンソン病といった神経変性疾患は加齢と共にその発症リスクが増加する。その発症原因のひとつとして、加齢によるタンパク質のアミロイド線維化が挙げられる。タンパク質が天然立体構造を維持できず、その結果、蓄積・凝集化してしまうことで脳に不可逆的なダメージを与える。これらのことから、私たちは加齢に伴い蓄積、凝集化した不良タンパク質による脳ダメージが睡眠変化を誘発しているのではないかと考えた。そこで本研究では、マウスに対して不良タンパク質を投与することで加齢を摸倣し、加齢による睡眠変化メカニズムを解明することを目的とする。

【方法】3〜4ヶ月齢の若い成熟マウスの両側海馬に精製したアミロイドベータ（Aβ）を投与した。コントロールにはBuffer を両側海馬に投与したマウスを用いた。同時に脳波筋電位を測定するための電極を留置した。手術後 3 日目より自由行動下でマウスの脳波と筋電位を 24 時間連続で記録し、14 日目まで記録した。その後、オフラインで睡眠覚醒ステージ判定や脳波の解析を行った。

【結果】投与したAβが、マウス脳内でアミロイド線維を形成しているかどうかを蛍光免疫染色により確認した。検出したアミロイド線維の周辺に反応性アストロサイトや活性化ミクログリアが局在していることを見出した。Aβ投与後の睡眠覚醒ステージや脳波を解析した。その結果、睡眠覚醒ステージの中でもレム睡眠合計時間が経時的に減少して行くことを見出した。さらに、レム睡眠中の脳波を詳細に解析すると、レム睡眠時に特徴的な脳波であるシータ波（5〜10 Hz）が経時的に減少することを明らかにした。今後更なる検討が必要ではあるが、Aβの投与による加齢摸倣では睡眠覚醒ステージの中でも特にレム睡眠異常が観察される可能性を示した。

本研究の方法と結果



154. 加齢模倣による睡眠変化メカニズムの解明

常松　友美

東北大学 大学院生命科学研究科

Key words：加齢，アミロイドベータ，睡眠，脳波，グリア細胞

緒　言

加齢に伴い、個々の細胞や臓器で老化が起こり、様々な生理機能が変化し衰えていく。そのひとつに睡眠が挙げられる。加齢によりノンレム睡眠が浅くなり、睡眠時の中途覚醒の頻度が増加し、結果として睡眠の質が低下する。また、概日リズムも崩れ極端に早寝早起きとなる［1］。人生の 3 分の 1 もの時間を過ごす睡眠の質の低下は、生活の質の低下に直結する。しかしながら、なぜ加齢により睡眠の量や質が変化していくのか、そのメカニズムは未だ不明である。

アルツハイマー症やパーキンソン病といった神経変性疾患は加齢と共にその発症リスクが増加する。その発症原因のひとつとして、加齢によるタンパク質のアミロイド線維化が明らかにされてきている。タンパク質が天然立体構造を維持できず、その結果、蓄積・凝集化してしまうことで脳に不可逆的なダメージを与える。神経変性疾患において、前駆症状としてノンレム睡眠とレム睡眠のバランスが崩れたり、レム睡眠中に夢の通りに動いてしまうレム睡眠行動障害などの睡眠障害が生じたりすることが報告されてきている［2］。これらのことから、私たちは加齢に伴い蓄積、凝集化した不良タンパク質による脳ダメージが睡眠変化を誘発しているのではないかと考えた。そこで本研究では、マウスに対してアミロイド線維を投与することで加齢を摸倣し、加齢による睡眠変化メカニズムを解明することを目的とする。現在、加齢と睡眠変化の相関関係を明らかにするためには 18～24 ヶ月齢程度の老齢マウスを用いることが一般的な手法であるため、研究には非常に時間を要する。しかしながら、本研究では、若い成熟マウス（3 ヶ月程度）に不良タンパク質を投与することで加齢を摸倣する。本研究により若い成熟マウスでの加齢摸倣研究手法を確立し、睡眠への影響だけでなく加齢研究自体が一気に進展することが予想される。さらに本研究では、睡眠変化をバイオマーカーとした神経変性疾患の早期発見のための指標化も目指す。

本研究では、精製したアミロイドベータ（Aβ）を野生型マウスの両側海馬脳実質に投与した。投与したAβがマウス脳内でアミロイド線維を形成しているかどうかを確認するため、蛍光免疫染色を行った。海馬にアミロイド線維が形成されていることを確認した。さらにアミロイド線維の周辺に反応性アストロサイトや活性化ミクログリアが局在していることを見出した。Aβ投与後 2 週間にわたり、自由行動下のマウスから脳波と筋電位を測定し、睡眠覚醒ステージ判定、脳波解析を行った。その結果、睡眠覚醒ステージの中でもレム睡眠合計時間が経時的に減少して行くことを見出した。さらに、レム睡眠中の脳波を詳細に解析すると、レム睡眠時に特徴的な脳波であるシータ波（6～10 Hz）が経時的に減少することを明らかにした。今後更なる検討が必要ではあるが、本研究により、レム睡眠の変化がアルツハイマー症のバイオマーカーとなり得る可能性を示唆した。

方　法

1. 使用した動物

本研究は、東北大学環境安全委員会実験動物専門委員会の承認（承認番号：2021 生動-001）を受け、米国国立衛生研究所のガイドラインに準拠して実施した。動物の苦痛を最小限に抑え、使用する動物の数を減らすため最大限の努力を行った。実験には 3～4 ヶ月齢の野生型マウス（C57BL/6J）を用いた。マウスは 12 時間周期の明暗サイクル（ライトオン：8:00～20:00）で制御された環境下で飼育した。マウスは餌と水を自由に摂取できる環境で飼育した。

2. Aβの線維化調製

Aβを 15,000 rpm で 15 分間遠心分離操作を行い、上清をストック溶液として保存した。アミロイド線維は、各種タンパク質濃度に対し、20 mM HEPES buffer（pH7.5）、100 mM NaCl で希釈し、マイクロプレートリーダーを用いて 37℃下で攪拌した。アミロイド線維の有無は、同条件において 5 mM チオフラビン T を用い、線維形成の有無を検証した。

3. Aβ線維の脳実質投与手術

オスの野生型マウスを使用した。麻酔はペントバルビタール（5 mg/kg、導入用、腹腔内投与）と小動物用気化器（バイオリサーチセンター）を使って濃度を制御したイソフルラン（1～2%維持用）で行った。定位固定装置（ナリシゲ）にマウス頭部を固定した状態で手術を行った。精製したAβ（50μM、あるいは 100μM）は両側海馬（ブレグマから 2.5 mm 後部、2.0 mm 外側、深さ 2.0 mm の位置）に 1.5μL ずつハミルトンシリンジで投与した［3］。投与の速度は 0.2μL/min で行い、ステレオタキシックインジェクタ（Legato130、室町機械）で制御した。

皮質脳波（Electroencephalogram : EEG）用電極として頭蓋骨に 3 本のネジ電極を埋め込み、筋電位（Electromyogram : EMG）用電極として頸部筋肉に撚り線（AS633、クーナーワイヤー）を縫い付けた。また、グラウンド用として小脳にネジ電極を埋め込んだ。全ての電極はピンソケットに接続した。全ての電極は歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。自由行動下で脳波と筋電位を連続記録するために、マウスの動きを制限しないスリップリング（SPM-35-8P-03、ヒカリ電子）を介した。脳波、および筋電位の電気信号は、増幅器（AB-610J、日本光電）で増幅し、サンプリングレート 128 Hz でデジタル化した。その際、脳波は 0.75～20 Hz で、筋電位は 20～50 Hz でフィルタリングした。記録ソフトは SleepSign ソフトウェアバージョン 3（キッセイコムテック）を用いた。手術後 3 日から 14 日まで 24 時間連続で脳波・筋電位を測定した。

4. 免疫組織化学的解析

アミロイド線維、およびミクログリア、アストロサイトの局在を調べるため、免疫組織化学的解析を行った。線維化アミロイドを投与したマウスをイソフルランで十分に麻酔し、20 mL の生理食塩水、続いて 20 mL の 4%パラホルムアルデヒド（ナカライテスク）にて灌流固定した。摘出した脳は 4%パラホルムアルデヒド溶液に 4℃で一晩浸漬後、30%スクロース液にて 2 日以上浸漬した。脳は包埋液（OCT コンパウンド、サクラファインテック）で急速凍結し、クライオスタット（CM3050、ライカ）を用いて 40μm の厚さで冠状断切片を作製した。蛍光免疫染色では、アミロイド線維を確認するために抗 Amyloid Fibril 抗体（1 : 500 ; ab126468、アブカム）、アストロサイトを確認するために抗 GFAP 抗体（1 : 2,000 ; G3893、シグマ）で、4℃で一晩インキュベートした。次に、切片を CFF488 抗ラビット IgG 抗体、および CFF594 抗マウス IgG 抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。ミクログリアの確認には SPICA Dye 568 標識抗 Iba1 抗体（1 : 200 ; 015-28011、富士フィルム和光純薬）を用いた。その後、DAPI（1 : 1,000; D523、同仁化学）で、室温で一時間インキュベートした。染色した脳切片は APS コートされたスライドグラスに載せ、50%グリセロールにて封入した。脳切片は蛍光顕微鏡（BZ-9000、キーエンス）で観察した。

5. 睡眠覚醒ステージ判定

記録した脳波･筋電位は基準に従い［4］、SleepSign（キッセイコムテック）により、4 秒を 1 エポックとしてそれぞれ覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠にオフラインで自動判定を行った。自動判定後、全ての睡眠覚醒ステージを同一人物が目視で確認し、適宜修正を行った。脳波のスペクトル解析は高速フーリエ変換にて算出し、デルタ波（1～5 Hz）、シータ波（6～10 Hz）、アルファ波（10～13 Hz）、ベータ波（13～25 Hz）に分けた。

結果および考察

1. 海馬実質に投与したAβは脳内でアミロイド線維を形成する

まず、投与したAβが脳内でアミロイド線維を形成しているかどうかを確認した。若い成熟野生型マウスの両側海馬にAβの線維を投与し、その後脳を摘出し蛍光免疫染色を行った（図 1、2）。緑で示されているように、投与した海馬にアミロイド線維免疫陽性であることが観察された（矢印）。次に、アミロイド線維とアストロサイトの局在を調べる

ために、アストロサイトのマーカーである抗 GFAP 抗体（赤）で二重蛍光免疫染色を行った（図 1）。アミロイド線維を囲むように GFAP 陽性アストロサイトが観察された。さらに、アミロイド線維とミクログリアの局在を調べるために、ミクログリアのマーカーである抗 Iba1 抗体（赤）で二重蛍光免疫染色を行った（図 2）。アミロイド線維と Iba1 陽性ミクログリアが共局在することを明らかにした。

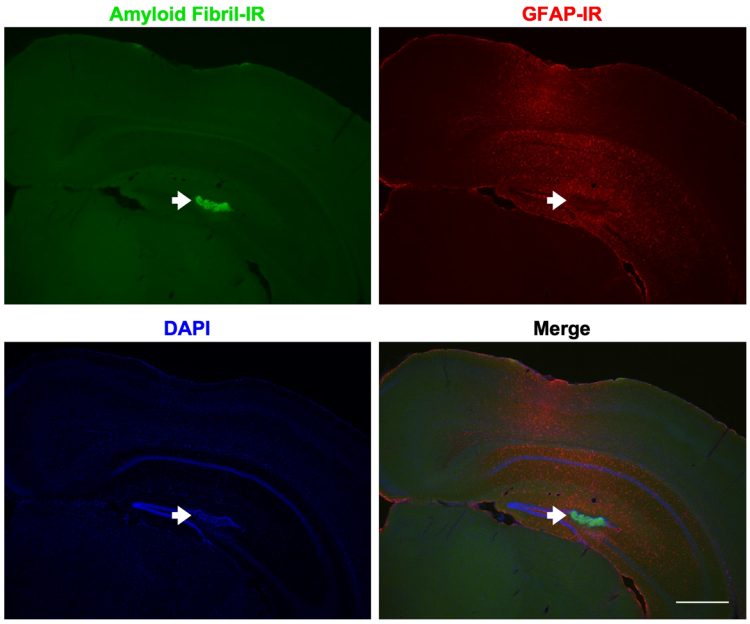


図 1. 蛍光免疫染色で示したアミロイド線維と反応性アストロサイトの局在
Aβを投与した海馬にアミロイド線維が形成されている（緑:矢印）。アミロイド線維周辺に GFAP 陽性アストロサイトが局在している（赤）。青は DAPI を示す。スケールバー：500μm。

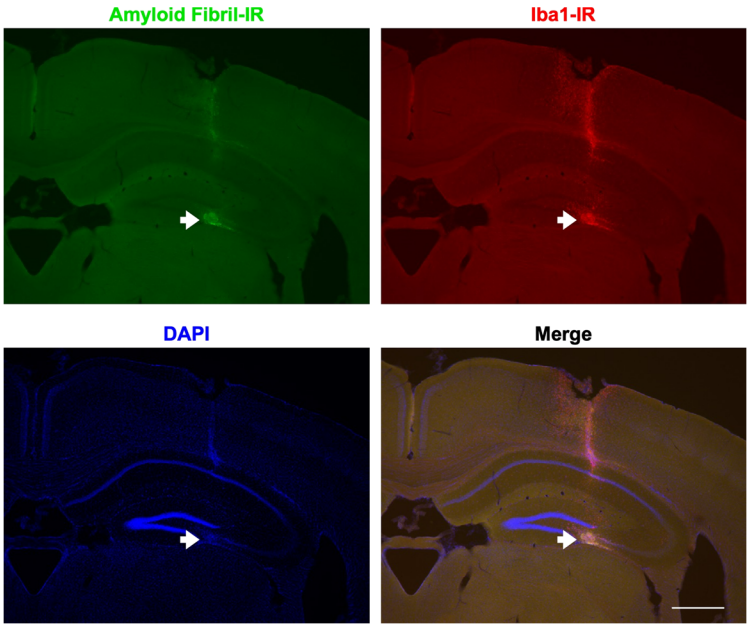


図 2. 蛍光免疫染色で示したアミロイド線維と活性化ミクログリアの局在
Aβを投与した海馬にアミロイド線維が形成されている（緑：矢印）。アミロイド線維と重なるように Iba1 陽性ミクログリアが局在している（赤）。青は DAPI を示す。スケールバー：500μm。

以上のことから、海馬実質にAβを投与するとアミロイド線維が形成されることが明らかになった。形成されたアミロイド線維の周辺に反応性アストロサイトや活性化ミクログリアが集まっていることから、アミロイド線維は脳内で異物と認識され、アストロサイトやミクログリアが分解、排出、あるいは貪食しようとしている可能性を示唆した。アストロサイトとミクログリアの局在には少し違いが観察されたが、アミロイドプラークとアストロサイト、ミクログリアの局在を報告した論文と一致していた［5］。

2. Aβを海馬に投与するとレム睡眠合計時間が経時的に減少する

次に、海馬実質にAβを投与した後に、マウスの睡眠覚醒ステージが変化するかどうかを検討した。マウスは自由行動下で脳波筋電位を24時間記録した。コントロールとしてBufferを投与し、同様に自由行動下で脳波筋電位を24時間記録した。また、Aβの効果の濃度依存性を検討するため、100μMAβを両側海馬に投与したマウスと50μMAβを両側海馬に投与したマウスから記録を行った。記録はAβ投与後3日目から14日目まで断続的に行った。マウスの睡眠覚醒ステージは毎日同じではないため、3日ごとの平均を算出した。図3は24時間分のそれぞれの睡眠覚醒ステージの合計時間を示している。覚醒の合計時間はAβを投与したマウスでコントロールより減少した。一方、ノンレム睡眠の合計時間はAβを投与したマウスでコントロールより増加した。興味深いのは、レム睡眠の合計時間であり、50μMAβを投与したマウスとコントロールでは大きな差は見られなかったが、100μMAβを投与したマウスでは投与後9日目以降にレム睡眠の合計時間が減少していった。今後さらなる検討が必要であるが、Aβを投与するとレム睡眠の合計時間が経時的に減少していく可能性を示唆している。

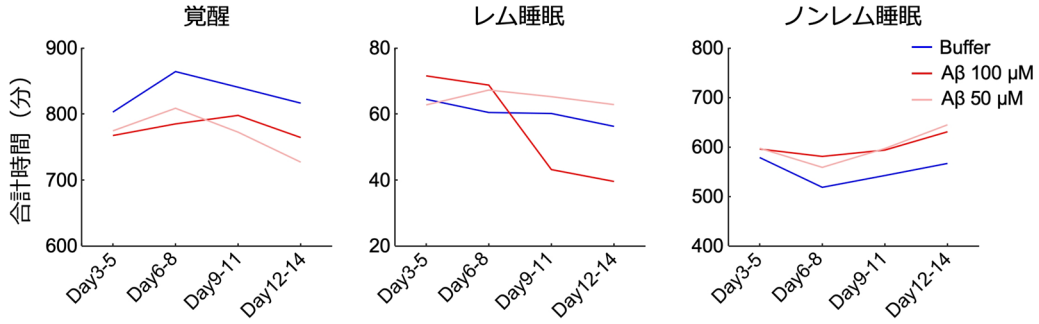


図3. 各睡眠覚醒ステージの24時間合計時間

左）覚醒の24時間合計時間。

中央）レム睡眠の24時間合計時間。

右）ノンレム睡眠の24時間合計時間。3日間の平均値を示している。

3. Aβを海馬に投与するとレム睡眠時脳波のパワースペクトルが変化する

次に、睡眠覚醒ステージ変化だけでなく、Aβ投与によりマウスの脳波が変化するかどうかを詳細に解析した。投与後、5日目、8日目、11日目、14日目のレム睡眠時のパワースペクトルを高速フーリエ変換により算出した。Bufferを両側海馬に投与したマウス、50βMAβを両側海馬に投与したマウスでは、ほとんど変化は見られなかった。一方、100μMAβを両側海馬に投与したマウスでは、投与後5日目時点でコントロールと比べてシータ波（6～10 Hz）のパワー値が減少していた。さらに、投与後8日目、11日目、14日目と経過するにつれて、シータ波のパワー値がさらに減少した。今後さらなる検討が必要であるが、Aβを投与するとレム睡眠時に特徴的な脳波であるシータ波の成分が減少していく可能性を示唆している。2、3の結果を合わせて考察すると、Aβの投与により睡眠覚醒ステージの中でも特にレム睡眠異常が観察される可能性がある。レム睡眠がアルツハイマー症のバイオマーカーとなり得るかも知れない。

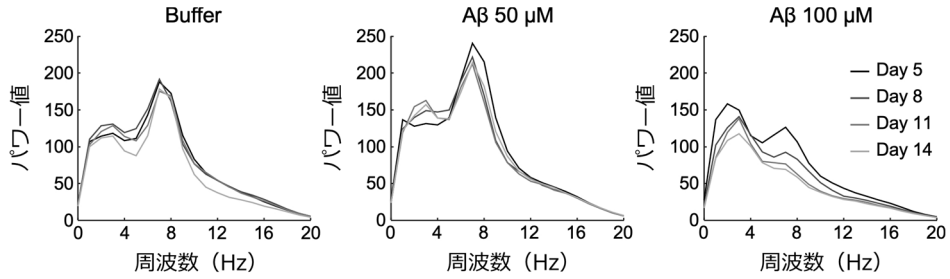


図 4.　24 時間のうちレム睡眠パワースペクトルの経時的変化

左）Buffer を投与したマウスのパワースペクトル。

中央）Aβ（50μM）を投与したマウスのパワースペクトル。

右）Aβ（100μM）を投与したマウスのパワースペクトル。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学学際科学フロンティア研究所の奥村正樹准教授である。また、実験データの取得、解析にあたり、佐柳友規学術研究員、松本すみ礼特任助教、技術補佐員の髙原桂子さんに多大なサポートを頂いた。ここに深く感謝を述べる。

文　献

1）Mander BA, Winer JR, Walker MP. Review Sleep and Human Aging. Neuron. 2017;94:19-36. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.004.

2）Matsumoto S, Tsunematsu T. Association between Sleep, Alzheimer's, and Parkinson's Disease. Biology (Basel). 2021;10(11). Epub 2021/11/28. doi: 10.3390/biology10111127. PubMed PMID: 34827122; PubMed Central PMCID: PMCPMC8614785.

3）Lin Y, Sahoo BR, Ozawa D, Kinoshita M, Kang J, Lim MH, et al. Diverse Structural Conversion and Aggregation Pathways of Alzheimer's Amyloid-beta (1-40). ACS Nano. 2019;13(8):8766-83. Epub 2019/07/17. doi: 10.1021/acsnano.9b01578. PubMed PMID: 31310506.

4）Radulovacki M, Virus RM, Djuricic-Nedelson M, Green RD. Adenosine analogs and sleep in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1984;228(2):268-74. Epub 1984/02/01. PubMed PMID: 6694111.

5）Ramirez AI, de Hoz R, Salobrar-Garcia E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, et al. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. Front Aging Neurosci. 2017;9:214. Epub 2017/07/22. doi: 10.3389/fnagi.2017.00214. PubMed PMID: 28729832; PubMed Central PMCID: PMCPMC5498525.