

研究報告書

「脳回路網の再編成における睡眠の役割」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 宮本 浩行

1. 研究のねらい

睡眠は私たちにとって基本的な生理活動であるが、その時間的な制御(研究Ⅰ)や「なぜ眠るのか」(研究Ⅱ)という理由については未だ謎が多い。睡眠は円滑な脳機能にも不可欠であり、例えば覚醒時の記憶は睡眠によって安定・最適化されると考えられている。本課題では視覚系の可塑性をモデルとして睡眠の働きを神経活動と神経回路に基づいて理解することを目的とした。

2. 研究成果

本研究課題の基礎となる睡眠と神経活動の時間的制御に関する知見(研究Ⅰ:論文発表)と並行して進めてきた視覚系における睡眠の働き(研究Ⅱ:投稿中)について概説する。

【研究Ⅰ】(1)概要

脳深部の視交叉上核(SCN)は睡眠・覚醒サーカディアンリズムの生物時計だが、SCNからの信号がどこに伝えられどのようにして睡眠・覚醒のサーカディアンリズムが形成されるのかという神経システムの理解は進んでいない。私たちは神経伝達物質セロトニンの急速・選択的な除去によってラット睡眠・覚醒のサーカディアンリズムが崩壊することを観察した(論文1)。数週間にわたりラット脳各領域の神経活動を解析した結果、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムが無くなっているにもかかわらず、SCNの神経活動サーカディアンリズムは強固に保たれ、睡眠・覚醒機能そのものも維持されていることがわかった。しかし、睡眠・覚醒を直接的に実行する前脳基部・視索前野(BF/POA)領域では神経活動のサーカディアンリズムが顕著に消失していた。さらにこの領域のセロトニン受容体を阻害すると徐波睡眠のサーカディアンリズムが減弱した。これらからSCNからのサーカディアンリズム信号は、セロトニンの作用を受けたBF/POA領域に伝えられそこで睡眠・覚醒機能と統合され24時間周期の睡眠・覚醒リズムが生み出されていると考えられた(論文2)。

【研究Ⅰ】(2_1)背景

単細胞生物から植物、動物、ヒトにいたるまで、生物はサーカディアンリズムと呼ばれる24時間周期のリズムを自律的に示している。このサーカディアンリズムは精神活動、体温、ホルモン分泌、神経活動、タンパク質・遺伝子発現など、広く生物現象に認められ、とくにヒトや動物の活動基盤をなす睡眠・覚醒も強いサーカディアンリズムの制御を受けている。これまでに、脳深部の小さな神経核である視交叉上核(SCN)がサーカディアンリズムの主時計であることが知られ、分子生物学的理解が積み重ねられている。しかし、SCNからの信号がど

ここに伝えられ、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムがどう形成されるのかというシステムに関する基本的な理解は未だ途上にある。SCN は小さな神経核のため、行動する個体からその神経活動を記録するのは容易ではなく、また出力先が広く多岐にわたり睡眠・覚醒制御に関与する脳領域が分散し、それらの相互作用が未解明であることなども研究を困難にしている。

私たちは、うつ病や情動、摂食、睡眠などとの関連を指摘されてきた神経伝達物質セロトニンを数時間で選択的に除去する手法を開発し、ラットの睡眠・覚醒のサーカディアンリズム維持にセロトニンの働きを必要としていることを報告した(論文2)。この手法を利用し睡眠・覚醒リズムが崩壊した脳各領域の神経活動パターンを調べ、サーカディアンリズムと睡眠を結ぶ神経メカニズム解明に取り組んだ。

【研究 I】(2_2) 研究方法と結果

研究グループは、自由に行動しているラットの睡眠・覚醒を記録するとともに、脳の各領域の神経活動を数週間にわたって追跡した(狙った脳部位に細い金属線を埋め、そこでの神経細胞群が興奮するときに生じる電気信号を検出して、神経細胞の活動状態を調べた)。従来の知見通り、SCN や BF/POA をはじめ、脳の多くの領域で神経活動レベルが 24 時間周期で上昇・下降するサーカディアンリズムを観察し、睡眠・覚醒機能についても、睡眠時は神経細胞の活動が低下し、覚醒時は活性化することを確認した。

次に、セロトニン合成のもととなるアミノ酸の一種トリプトファンを選択的に分解する酵素(tryptophan side chain oxidase I: TSOI)の生体投与で、脳内のセロトニンを数時間以内で 5 分の 1 程度に急速、選択的かつ可逆的に減少させた。この結果ラットは昼夜を通して正常より短い周期で睡眠と覚醒を繰り返すようになり(断片化)、睡眠量や行動量のサーカディアンリズムが崩壊した(図 1 中、下)。しかし、このときの SCN の活動は通常通り強固なサーカディアンリズムを維持するとともに(図 1 上)、正常時の睡眠・覚醒に伴う変化(睡眠時の神経活動低下と覚醒時の活性化)も確認された。この傾向は、大脳皮質など他の脳領域でも同様だった。

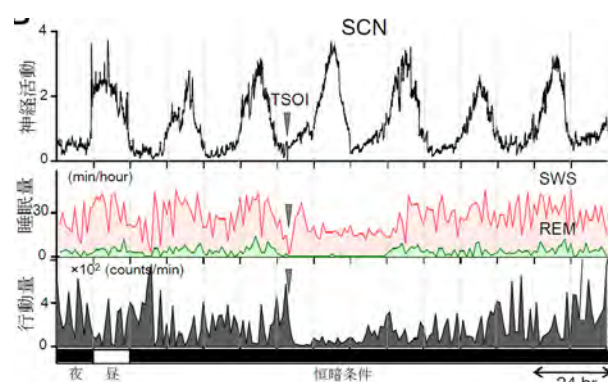


図 1 セロトニン除去による SCN サーカディアンリズム、睡眠・行動量の変化

しかし、睡眠・覚醒を直接的な実行にかかわる前脳基底部・視索前野(BF/POA)領域の神経活動のサーカディアンリズムが顕著に減少していた。そこで、セロトニン受容体(5-HT₂)機能を阻害する薬物リタンセリンを、正常なマウスの BF/POA 領域に局所的に投与したところ、睡眠の大部分を占める徐波睡眠サーカディアンリズム選択的に阻害された。

以上をふまえ、セロトニンの働きを受けたBF/POA領域はSCNが生み出すサーカディアンリズム信号と睡眠・覚醒機能と時間的に統合し「睡眠・覚醒のサーカディアンリズム」を作り出すと結論した(図2)。

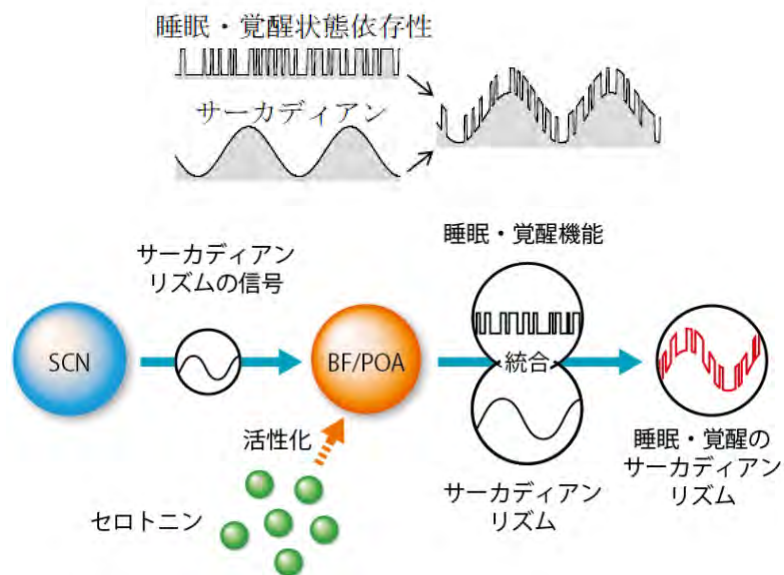


図2 神経活動による睡眠・覚醒とサーカディアンリズムの表現(上)と時間的統合モデル(下)

【研究Ⅱ】(1)概要

シナプス可塑性を通じて睡眠は記憶の固定化や脳の発達などに積極的に関与すると考えられているが、その神経回路メカニズムは未だ明らかではない。そこでマウス視覚野をモデルとして睡眠中の神経活動、情報処理、シナプス可塑性と神経回路網変化との関係を調べた。

行動するマウス視覚皮質から睡眠・覚醒時のマルチニューロン活動を記録した結果、睡眠中においても覚醒時とは異なる視覚応答が存在し、神経活動から推定された単シナプス性の機能的結合が徐波睡眠中に促進されていた。さらに抑制系が減弱した GAD65 ノックアウトマウスでは睡眠の機能的結合が阻害されている一方、抑制伝達を薬理的に強化すると機能的結合が回復した。視覚野の可塑性(眼優位性)を示さない GAD65 ノックアウトマウスは抑制系を強化することで可塑性が回復することから、抑制系によって制御される視覚入力と睡眠時の機能的結合の促進が可塑性の発現に寄与していることが示唆された。

【研究Ⅱ】(2_1)背景

私たちが日々経験する「眠り」は脳科学上の大きな謎のひとつである。脳は覚醒・睡眠を通じて活動状態を劇的に変化させている。心身の健康における睡眠の重要性は人々に広く受け入れられ、とりわけ睡眠は記憶・学習などの脳機能にも重要な役割を持つと考えられている。しかし記憶・学習システムの複雑さのため神経回路に基づいた統一的理解は容易ではない。

そのためにはまず「睡眠中に神経回路網が作り変えられていることの実験的証拠」を見出すことが重要と考えられる。睡眠の働きを神経回路レベルで調べるうえで可能な限り簡単なシステムを対象とすることが有利であり、眼優位可塑性とよばれる視覚野発達期の生体の可塑性に着目した。可塑性とは回路網の特性の変化を維持する性質のことでシナプス可塑

性をはじめ記憶・学習の基礎過程と考えられている。眼優位可塑性は解剖学的、生理学的知見が蓄積した視覚系の代表的な可塑性ひとつであり、生後の幼若期に単眼を一定期間閉じるとその眼に対する皮質細胞の応答性が極度に低下する神経活動依存的現象である。

さらにこの可塑性は睡眠を必要とすると考えられている一方、視覚野の睡眠徐波そのものが視覚経験により発達することを申請者は見出してきた (Miyamoto et al. Nat.Neurosci. 2003)。このように初期視覚系では視覚と睡眠は可塑性を通じて相互かつ直接的に作用を及ぼしていることが明らかになっている。

【研究Ⅱ】(2_2) 研究方法と結果

行動しているマウス大脳皮質視覚野から多数の神経細胞の活動を同時記録するマルチニューロン活動の慢性記録をワイヤーテロード電極を用いて行った(図3)。睡眠・覚醒中の神経活動と視覚応答を解析するとともに、神経活動から神経細胞間の機能的結合を推定した。

これまで視覚応答は睡眠によって大きく低下するという主流の考え方に対して、睡眠中では一律の低下というよりもむしろ覚醒時とは異なる情報処理が行われていることが本研究から示唆された(図3)。



図3

睡眠中は脳の応答性が低下するという定説に反し、覚醒時とは異なる視覚情報処理がなされていることがわかった。図は光刺激(1秒)を繰り返し与えて視覚野の神経活動(ドット)を上から下へ時間順に並べて表示したもので、一回の刺激が横一列に相当する。脳状態が遷移すると処理様式も一変した。

さらに局所神経回路内の相互作用を推定するため睡眠中および覚醒中での神経細胞間の情報伝達の効率を神経活動から計算し比較すると、意外にも睡眠時で効率性が有意に高まっていることが明らかになった(図4)。

また抑制性伝達が減弱したマウス(GABA 合成酵素のひとつ GAD65 ノックアウト)は眼優位可塑性を示さないことが知られているが、このマウスでは睡眠時の伝達効率促進も阻害されていた。逆に抑制系伝達を薬物によって促進すると睡眠時の伝達効率は回復したことから抑制性神経伝達により制御されていると推定された。GAD65 マウスの抑制性伝達の強化することで眼優位可塑性も回復させられる事実をふまえると睡眠時伝達効率と可塑性発現との間に深いつながりがあることが示唆される。これらの知見は、記憶の定着や情報処理の最適化といった睡眠の脳機能への積極的な関与について神経回路レベルでの基礎を与えるもの

と考えられる。

なお GAD65 ノックアウトマウスではグルタミン酸興奮性伝達のNMDA受容体サブユニット NR2A が減少していることが知られるが、これと一致して NR2A ノックアウトマウスでも GAD65 同様に睡眠時の神経細胞間の情報伝達の効率が低下していた。抑制性伝達と興奮性伝達の両者が関与していることを示唆する。

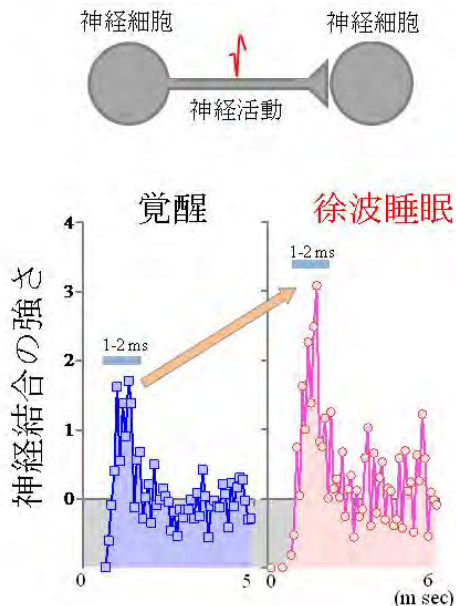


図4

図はシナプス前細胞の発火が、いつでもだけ後細胞を発火させているかを定量化したものである。とくに単シナプス性に結合している神経細胞間の結合強度(図中バー:神経発火の伝達効率と解釈できる)は徐波睡眠中に上昇していた。

3. 今後の展開

【研究Ⅰ】脳や身体を機能的に維持するには各領域間の協調とともに、秒、分、時間、日の単位で刻々と変化する諸機能を時間的に協調させることも重要である。今回、サーカディアンリズムと睡眠・覚醒が神経活動として脳の各領域で時間的にどう結び付けられているのか、その一端を知ることができた。今後サーカディアンリズムと睡眠の階層的統合機構メカニズムを神経回路レベルで探索するとともに12時間あるいは48時間周期リズムを持つ動物や、脳の左右でリズム位相の異なる動物の機能設計・制御に挑戦する。これにより例えば視覚情報処理やシナプス可塑性、睡眠による情報処理の最適化などを対象として脳機能におけるリズムの役割解明を目指す。

セロトニン神経系は、不眠、睡眠リズム障害、うつ病や統合失調症などの精神疾患と複雑に関連することが示唆されている。またここで注目した前脳基底部は認知機能を含めアルツハイマー病との関わりも指摘されてきた。生活環境の変化や高齢化社会に伴う諸問題も睡眠やサーカディアンリズムと切り離すことはできない。本研究をさらに進めることで、現代社会において看過できないこれらの問題の体系的理解と解決につながればと考える。

【研究Ⅱ】なぜ睡眠時に神経細胞間の伝達効率が促進されるのか、その神経メカニズムをマルチニューロン記録に加え細胞内記録と単一細胞刺激等を組み合わせて解明していくとともに、どのように視覚をはじめ脳機能に影響を与えているのかを調べることによって睡眠の機能

を明らかにしていく。

これまで進めてきた睡眠と視覚経験依存的な神経回路の再編成についての研究と併せ、神経活動、神経回路の動作と機能と変化に関する基本特性を調べる。その上で神経活動や行動の出力をフィードバックさせるシステムやオペラント学習を基礎にした視覚皮質演算・機能の改変と設計に今後取り組んでいく。抑制系や睡眠はまたてんかん、自閉症スペクトラム、統合失調症、認知症などの各種神経疾患との関連も深く、今後病態理解につながる基礎研究を展開していく。

4. 自己評価

【研究Ⅰ】睡眠のメカニズムと機能を理解するうえで神経活動と神経回路の動作を知ることが不可欠である。そのためには脳各所の神経活動がどのように時間的に制御されているのかを調べる必要がある。神経活動は睡眠・覚醒状態と24時間リズムを基調としていることやセロトニン系による睡眠と24時間リズムの統合など、さきがけ研究期間で得られた研究成果は睡眠機能を神経活動・回路に基づいて理解するための基本的知見を提供すると考える。また生理学的理解に乏しかった睡眠のサーカディアンリズム制御についても新規のモデルを提供できたことやセロトニン系の睡眠リズムへの寄与なども従来の概念を広げることができたのではないだろうか。なお視交叉上核などからの長期的神経活動記録は技術的困難さと多くの時間を要するが、神経活動、神経回路、神経システムを理解する有力なアプローチのひとつであり、睡眠や時間生物学のみならず感覚、運動、脳可塑性の各研究に応用することが可能である。

【研究Ⅱ】今回我々が観察した「睡眠時の神経細胞間の機能的結合の促進」は、睡眠時に種々の神経活動が低下することを前提としたシナプスホメオスタシス仮説に代表されるような睡眠の受動的モデルとは対照をなし、睡眠の脳への積極的働きを神経回路レベルで示唆する点で新規かつ基本的であると評価している。今後、視覚情報処理、睡眠、可塑性の相互関係を突破口としてより本質的な「神経回路の動作と制御」の理解へと結び付けていくことができると考えている。

5. 研究総括の見解

本課題は大脳皮質視覚系の可塑性における睡眠の役割の解明を目指したものである。マウス視覚野のマルチニューロン活動の慢性記録を解析して、睡眠中にはむしろ単シナプス性の神経細胞の結合強度が上昇していること、さらにこの現象には、抑制性神経伝達が減弱したトランスジェニックマウスの解析と薬理学的実験から、抑制性神経伝達が重要であることを明らかにした。一方、トリプトファン側鎖オキシダーゼ投与により脳内セロトニンを枯渇させると、サーカディアンリズムの主時計とされる視交叉上核(SCN)のリズムは残したまま、睡眠や行動量のサーカディアンリズムが可逆的に崩壊することを見出したことから、これを神経生理学的、薬理学的に解析して、前脳基底部・視索前野がSCNの生み出すリズム信号と睡眠・覚醒機能を統合し、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムを作り出すことを示す証拠を得た。これらは何れも興味深い結果ではあるが、今後は当初の目標であった睡眠と視覚経験依存的な神経回路の再編成の解析が進むことが期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nakamaru-Ogiso E, Miyamoto H, Hamada K, Tsukada K, Takai K. Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep/wake cycles. *European Journal of Neuroscience* 2012; 35: 1762-1770
2. Miyamoto H, Nakamaru-Ogiso E, Hamada K, Hensch TK. Serotonergic integration of circadian clock and ultradian sleep-wake cycles. *The Journal of Neuroscience*, 2012; 32:14794-14803
3. Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, Ota M, Yasuda H, Tsumoto T, Aruga J, Craig AM. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPδ trans-synaptic interaction. *Nature Neuroscience* 15, 389-398, 2012
4. Ito S, Ogiwara I, Yamada K, Miyamoto H, Hensch TK, Osawa M, Yamakawa K. Mouse with Nav1.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiology of Disease* 49: 29-40, 2012

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(主要な学会発表)

1. 宮本浩行, ヘンシュ貴雄: マウス視覚野における、睡眠・覚醒に依存した機能的結合の抑制系による制御, 「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ, 札幌, 2010. 7
2. 宮本浩行, ヘンシュ貴雄: マウス視覚野における睡眠・覚醒状態に依存した機能的神経結合の抑制系制御, 日本生体医工学会大会, 東京, 2011. 4
3. 宮本浩行, ヘンシュ貴雄: マウス視覚野における睡眠・覚醒状態に依存した機能的神経結合の抑制系制御, 第一回睡眠研究会, 岡崎, 2011. 7
4. 宮本浩行: セロトニン系によって統合されるサーカディアン振動体と睡眠・覚醒交替, 日本睡眠学会大 37 回定期学術集会, 横浜, 2012. 6



(和文総説)

1. 宮本浩行、ヘンシュ貴雄. 睡眠とシナプス可塑性を結ぶ神経活動.
ねむりと医療 4, 14-18, 2011

(プレスリリース他)

宮本浩行, 中丸映子, 濱田耕造, ヘンシュ貴雄.

1. 睡眠・覚醒機能と24時間リズムをセロトニンが束ねるー睡眠・覚醒のサーカディアンリズム形成機構を神経活動レベルで解明ー. 理化学研究所 2012年10月
2. RIKEN NEWS No. 378 December 2012 SPOT NEWS
「セロトニンが睡眠・覚醒機能と24時間リズムを束ねる」
3. RIKEN RESEARCH 2月号 Highlights “Workings of the body clock” 2013年3月

