

「睡眠・冬眠を生み出す細胞間相互作用」

研究期間:2020年10月～2024年3月

研究者: 乗本 裕明

1. 研究のねらい

本研究では、睡眠や冬眠を構成する神経回路の仕組みを明らかにすることをねらいとした。この目的を達成するために、オーストラリアドラゴン (*Pogona vitticeps*, 以下ドラゴン) を導入した。なぜならば、(1) ドラゴンも規則正しいレム睡眠とノンレム睡眠のサイクルをもつ (2) 摘出した全脳を”培養”することが可能である (3) 冬眠の誘導が容易である、等の睡眠・冬眠研究を有利に進めることのできる特長を有するためである。

まず、ドラゴンの睡眠および冬眠を神経活動を基に定義することを目指した。とくに爬虫類の冬眠が睡眠と神経活動的にどのように異なるのかは報告がないが、これは低温条件下で前脳から神経活動を記録すれば明らかにすることができるはずである。次に、ドラゴンの脳が低酸素条件に耐性を有する特徴を生かすことで、全脳 *in vitro* 標本の作製に取り組んだ。本標本上で睡眠、覚醒、冬眠を再現することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

さきがけ期間中に取り組んだテーマとして、以下の 5 つを挙げる。

① Neuropixels 記録の導入

ドラゴンの頭部にフィットするマイクロドライブを開発・改良することにより、高密度電極 Neuropixels を用いて自由行動下のドラゴンから局所場電位を記録することを試みた。

② 睡眠時局所場電位の温度感受性の検討

ドラゴンの前障から睡眠時局所場電位を計測し、レム睡眠・ノンレム睡眠の切り替え速度が温度に依存するかどうか、また、規則正しい切り替えリズムが消失する温度が存在するかどうかを検討した。

③ ドラゴンの冬眠の神経科学的定義

4°C条件下において、前障の神経活動がほぼ完全に停止することを見出したため、同温度条件においても神経活動を発する前脳の脳領域があるかどうかを探索した。

④ 冬眠の *ex vivo* 標本上における再現

Ex vivo 標本上で *in vivo* 標本における冬眠時の神経活動を再現することを試みた。

⑤ 睡眠・覚醒の *ex vivo* 標本上における再現

眼球・脳標本を用いることにより、*ex vivo* 標本上で徐波睡眠様、レム睡眠様、覚醒様の状態を再現することに成功した。

(2) 詳細

① 自由行動下ドラゴンからの局所場電位記録

Neuropixels (Jun et al., Nature, 2016) をドラゴンの前脳にインプラントさせるためのマイクロドライブを開発した。これを用いることにより、長期間安定して局所場電位記録を行うことができるようになった(図1)。



図1 実験動物とNeuropixelsを用いた局所場電位記録

② ドラゴンの睡眠時局所場電位の切替え速度と外気温の関係

ドラゴンの前障から睡眠時局所場電位を計測した。その結果、高温においてはレム睡眠・ノンレム睡眠の一周期の時間が短くなり、低温においては長くなることが明らかになった。さらに、10°C以下においては規則正しいレム・ノンレムの切り替えリズムが消失することが明らかになった。

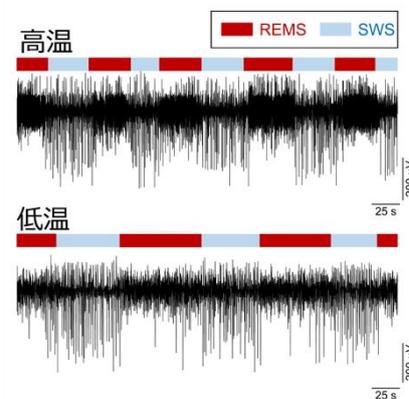


図2 レム・ノンレム (SWS) の切り替えは外気温の影響を受ける

③ ドラゴンの冬眠の神経科学的定義

4°C条件下において、動物の行動がほぼ完全に停止し、冬眠状態 (brumation) に入ること、および前障の神経活動がほぼ完全に停止することを発見した。その一方で、同温度条件においても神経活動を発する前脳の脳領域を特定することに成功した。これを以て

ドラゴンの冬眠を神経活動を基に定義することに成功したといえる。

④ 冬眠の ex vivo 標本上における再現

Ex vivo 標本上で in vivo 標本における冬眠時の神経活動を再現することを試みた。約 0°C の人工脳脊髄液中で脳摘出を行うことにより、③で同定した神経活動を再現することに成功した。本実験系を利用することで、低温条件において神経活動が他領域に伝播する様子を詳細に捉え、記述することに成功した。

⑤ 睡眠・覚醒の ex vivo 標本上における再現

眼球・脳標本を用いることにより、ex vivo 標本上で徐波睡眠様、レム睡眠様、覚醒様の状態を再現することに成功した。本実験系を利用することにより、それぞれの脳状態における神経活動の伝播を大規模に捉え、記述することに成功した。

3. 今後の展開

本さきがけ研究において確立された in vivo、ex vivo 実験系は今後様々な研究目的への応用が期待される。

まず、爬虫類の in vivo Neuropixels 記録法は、爬虫類の睡眠・冬眠時の特徴抽出のみならず、これまでは不明であった哺乳類と爬虫類の神経活動の類似点、相違点を明らかにする上で欠かせないツールとなるであろう。他の爬虫類や両生類の頭部もドラゴンと形態が類似しているため、本研究で開発した技術は他の実験動物にも応用可能であると考えられる。

本研究の成果である ex vivo 全脳標本上における睡眠・覚醒・冬眠状態の再現は、今後”覚醒”時に活動した神経活動がその後の”睡眠”中・”冬眠”中にどのように調節され、結果と記憶として脳に刻まれるのか(または忘れられるのか)、その詳細に迫るための強力なツールとなる。さらには、全脳標本に人工身体を接続し、脳の可能性を探る試みも始まりつつある。

4. 自己評価

最終成果として、爬虫類の冬眠に特徴的な神経活動を同定できたこと、また、冬眠・睡眠・覚醒状態を ex vivo 標本上で再現し、神経活動の伝播様式を明らかにすることができたことで、当初の目的の多くを達成できたと考えている。我々と同水準の実験系やノウハウを有する研究室は存在しないため、これから腰を据えて詳細な冬眠と睡眠の神経回路機構に踏み込んでいく予定である。

その一方で、達成できなかったことが一点ある。それは、ex vivo 標本上における「自発的な」レム睡眠・ノンレム睡眠の切り替えの誘導である。これに関しては、灌流する aCSF の組成、神経伝達物質の濃度や温度、電気刺激や光遺伝学的手法のどれを用いても実現できなかった。しかし、ごく最近行った実験で、自発的に周期的なスパイクを発するニューロンを偶然発見することができたため、これを詳細に観察し、下流神経回路との関係性を探っていくことで、自発的な睡眠切り替えを実現することが可能かもしれない。

研究期間の途中で、異動・研究室立ち上げのため実験ができない期間が長く続いてしまったが、共同研究先と密に連携することにより、スムーズに問題を解決することができた。研究費に関しても、スタートアップ支援をいただいたおかげで必要な備品を速やかにそろえることができ、本プロジェクトを支障なく進めることができた。さきがけ研究の内容が認められ、2024 年度より名古屋大学大学

院理学研究科教授に採用された。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文) 発表

研究期間累積件数: 3件

1. Matsui, F., Yamaguchi, ST, Kobayashi, R., Ito, S., Nagashima, S., Zhou, Z.†, Norimoto, H.†, Ablation of microglia does not alter circadian rhythm of locomotor activity, *Mol. Brain*, 2023, 16,34.

グリア細胞の一種であるマイクログリアを薬理的に除去することにより、マイクログリアが睡眠を調節する一方で、概日リズムの調節には関与していないことを明らかにした。

2. Sato, RY., Kotake, K., Zhang, Z., Onishi, H., Matsui, F., Norimoto, H.†, Zhou, Z.† Methyl vinyl ketone impairs spatial memory and activates hippocampal glial cells in mice, *PLoS ONE*, 18(8):e0289714, 2023

タバコは睡眠に悪影響を与えることが報告されている。そこで我々は、タバコの煙に含まれるメチルビニルケトンが海馬のグリア細胞に与える影響を検討した。その結果、メチルビニルケトンがグリア細胞を活性化すること、および記憶を障害することを明らかにした。

3. Nagashima, S., Yamaguchi, ST., Zhou, Z., Norimoto, H.† Transient Cooling Resets Circadian Rhythms of Locomotor Activity in Lizards. *J. Biol. Rhythms*. in press

トカゲの概日リズムが低温条件で停止・リセットされ、復温時には同じ位相からリズムが再始動することが明らかになった。

4. Yamaguchi, ST.*, Hatori, S.*, Kotake, K., Zhou, Z., Kume, K., Reiter, S., Norimoto, H.† Circadian Control of Sleep-Related Neuronal Activity in Lizards. *PNAS Nexus*, Volume 3, Issue 1, pgad481, 2024

レム睡眠・ノンレム睡眠の規則性が恒暗条件では乱れることが明らかになった。日中に光を浴びせることで回復したことから、昼間に光を浴びることが夜間に規則正しい睡眠リズムを生み出すために必要であることが示唆された。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

1. Norimoto H., Sleep homeostasis in lizards. Gordon Research Conference, May 2023
2. Sena Hatori*, Sho Yamaguchi*, Riho Kobayashi, Futaba Matsui1, Zhiwen Zhou, Hiroaki Norimoto†, Sleep homeostasis in lizards and the role of cortex. *bioRxiv*
3. 文部科学大臣表彰若手科学者賞(2022年)
4. 日本神経科学学会奨励賞(2023年)
5. 北海道大学 ディスティングイッシュトリチャー 称号授与(2023年度~)