

# 脳脈管系イメージングによる睡眠の作用の解明

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

林 悠

## 1. はじめに

睡眠を剥奪されたラットは2~3週間で死に至るが、その理由は未だ不明である。私たち哺乳類を含む一部の動物の睡眠は、複雑な生理状態へと進化した。中でも、夢を生じるレム（急速眼球運動）睡眠に関しては、その生理的役割に関して分かっていることはほとんどない。近年、記憶学習に注目した研究がいくつかなされ、レム睡眠が記憶の固定化に重要であることが明らかとなってきている。一方、レム睡眠の合計時間が少ないことはあらゆる死因のリスクとなることが報告されるなど、レム睡眠の作用が記憶学習の制御にとどまらない可能性が高いが、因果関係やメカニズムは不明である。

本研究で我々は、大脳皮質の血流に注目した。大脳皮質の広域の血流動態が睡眠覚醒を通じてどのように変化するかに関しては、fMRI、NIRS、ドップラーなど、手法によって結論が異なっており、よくわかっていなかった。我々は、2光子励起顕微鏡を用いて、大脳皮質における物質交換の場である毛細血管の血流を直接無麻酔下で測るアプローチにより、睡眠中の大脳皮質の血流がどのように変化するのか、さらにそのメカニズムと意義の解明を目指した。

## 2. 結果 研究成果

無麻酔下のマウスにおいて、睡眠覚醒に伴う大脳皮質の毛細血管の血流のダイナミクスを明らかにするために、まず、マウスを2光子励起顕微鏡下において頭部固定した環境で寝られるようトレーニングさせた。また、睡眠覚醒状態をモニタリングするために、脳波と筋電図を同時に計測した。静脈に蛍光デキストランを注射することで、血液の液体成分である血漿を可視化した。これにより、赤血球が黒い影として観察できるようになった。大脳皮質の毛細血管に注目し、特定の点を定めてそこを単位時間あたりに通過する赤血球の数や速さを計測した。このような解析を大脳皮質の様々な領域の毛細血管において、覚醒中・ノンレム睡眠中・レム睡眠中の各状態において実施した。その結果、観察したあらゆる領域において、大脳皮質の毛細血管の血流は、レム睡眠中に覚醒中と比べて平均でおよそ2倍に上昇することが判明した。ここでいう覚醒とは、マウスが顕微鏡下で（トレッドミル上を）走っているようなかなり活性の高い状態を解析対象とした。一方、ノンレム睡眠中の毛細血管の血流は覚醒中と差がなかった。これらの結果から、レム睡眠中は大脳皮質の毛細血管の血流が大幅に増加することが判明した。なお、毛細血管の血流の直径は各状態で差がなかったことから、毛細血管自体の拡張・収縮によるものではないことも分かった。おそらく、毛細血管のすぐ上流にある細動脈の拡張が関係しているものと考えられる。

続いて、我々が見出したレム睡眠中の大幅な大脳皮質毛細血管血流の増加の分子メカニズムに関して、解析を進めた。ノンレム睡眠からレム睡眠への移行の際、脳波の切り替えは素早く起こるのに対して、毛細血管血流の上昇にはおよそ20~30秒かかることが判明した。したがって、何らかの液性の血管拡張因子がレム睡眠の開始とともに徐々に分泌される可能性が考えられた。そこで、様々な血管拡張因子の関与を検証したところ、アデノシンの関与が判明した。アデノシンは神経細胞やグリアから放出され、アデノシンA2a受容体（A2aR）を介して血管拡張を促す作用がある（Ngai et al., 2001）。A2aRノックアウト（A2aR-KO）マウスはベースラインで睡眠異常や心血管障害を示さない（Chen et al., 1999; Huang et al., 2005; Tsai et al., 2020）。このA2aR-KOマウスの大脳皮質毛細血管の血流を解析したところ、レム睡眠中の増加はみられたものの、その程度は野生型マウスと比べてはるかに小さかった。さらに、野生型マウスでは、事前に数時間のレム断眠を施すと、その後のレム睡眠のリバウンドの際には、非常に大きな皮質血流増加がみられたが、こうしたリバウンドレム睡眠に伴う皮質血流の増加もA2aR-KOマウスでは消失していた。皮質血流を増加させる試薬である炭酸水素ナトリウム（NaHCO<sub>3</sub>）に対する大脳皮質毛細血管の血流の応答は、野生型マウスとA2aR-KOマウスでは同程度であったことから、

A2aR-KOマウスにおける血管系の一般的な反応性には大きな異常はないと考えられる。また、本試験で解析したレム睡眠の持続時間は、WTマウスとA2aR-KOマウスで同等であることが確認された。さらに、レム睡眠時の脳波のパワースペクトルも野生型マウスとA2aR-KOマウスで差が見られなかった。したがって、A2aR-KOマウスのレム睡眠中の毛細血管血流の減少は、レム睡眠の全般的な異常によるものではないと思われる。また、レム睡眠中は心拍数が増加する (Sakai, 2015) が、このことがレム睡眠中の大脳皮質の毛細血管血流の増加に寄与している可能性も考えられた。しかしながら、A2aR-KOマウスではレム睡眠中の心拍数は野生型マウスと差がなかったことから、大脳皮質の毛細血管血流の増加と心拍数の増加は切り離せることが分かった。また、A2aR-KOマウスでみられたレム睡眠中の大脳皮質の血流の異常は、何らかの胎児期の発生異常や出生後の発達異常が原因である可能性も考えられたため、次に、薬理的な実験を行った。まずA2aRのアンタゴニストを試したところ、そもそも入眠が困難となることが明らかとなった。これは、A2aRがカフェインの標的であることとも一致する。そこで、A2aR-PAM1という試薬を試した。A2aR-PAM1はA2aRのallosteric modulatorであり (Korkutata et al., 2019)、アデノシンのA2aRへの作用を増強するものと期待される。A2aR-PAM1を野生型マウスに投与したところ、レム睡眠中の大脳皮質の毛細血管の血流が上昇した。一方で、A2aR-PAM1をA2aR-KOマウスに投与したところ、そのような作用は見られず、野生型との間に差がみられた。したがって、アデノシンはレム睡眠中にA2aRに作用して大脳皮質の毛細血管の血流の増加に寄与している可能性が高まった。以上の結果から、レム睡眠中の大脳皮質の毛細血管の血流が大きく上昇するメカニズムに、アデノシンやその受容体であるA2aRが大きく関与していることが明らかとなった。

レム睡眠中の大幅な大脳皮質毛細血管血流の上昇の神経基盤に関しても、解析を進めた。レム睡眠中の大脳皮質の毛細血管の血流は、大脳皮質の広域にみられるガンマオシレーション活動と相関していることも判明した。したがって、血流の増加には、何らかの神経性の機序が関わっていると予想された。そこで、レム睡眠中に活動が上昇することが知られる特定の脳部位の神経細胞群について、その関与を検証した。そのために、この領域のニューロンのサブタイプごとに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてジフテリア毒素Aの遺伝子を発現させた。ジフテリア毒素Aは細胞死を誘導するため、これらのニューロンを破壊することができた。その結果、レム睡眠の量そのものには影響がなかったが、レム睡眠中の大脳皮質毛細血管血流の増加が大きく抑えられた。したがって、これらのニューロンがレム睡眠中に活性化することが、レム睡眠中の大脳皮質血流の制御に関与している可能性が高いことが判明した。

大脳皮質の血流は、ニューロンに酸素や栄養を届けて、一方で、不要な代謝物などの除去も促進することで、精神神経疾患や認知症の予防に関与すると考えられている。今回、レム睡眠中に大脳皮質の血流が大きく上昇することが判明したことを踏まえて、レム睡眠が精神神経疾患や認知症の予防に関与する可能性も検証した。我々は以前に、レム睡眠を強く抑制する作用を持つニューロンの同定に成功した (Hayashi et al., Science, 2015)。これらのニューロンの機能を抑えることで、レム睡眠を長期的に増加させたマウスを構築できるのではないかと考えた。そこで、レム睡眠を抑制するニューロンにジフテリア毒素Aの遺伝子を発現させたところ、レム睡眠の合計時間が増加することを確認した。さらに、このマウスを、特定の精神神経疾患モデルマウスと掛け合わせた。この精神神経疾患モデルマウスでは、神経疾患の原因物質の1つとされるものがいくつかの脳部位に蓄積する性質がある。一方、この精神神経疾患モデルマウスを上述のレム睡眠増加マウスと掛け合わせたところ、その蓄積が減少した。このことから、レム睡眠には、大脳皮質の血流を高めて、不要な代謝物の除去を促す作用があることが示唆された。さらに、大脳皮質の血流低下が認知症に加えて、うつ病の原因ともなり得る点に注目した。レム睡眠の増加が精神疾患の引き金となり得るような社会的ストレスにも有効かを検討するべく、まず、社会的ストレスによって活性が弱まる大脳皮質の領域にレム睡眠中に活性化する部位が含まれるかを検証した。その結果、社会的ストレスは大脳皮質前頭前野などの興奮性を弱めることが明らかとなった (Okamura et al., eNeuro, 2022)。

さらに、レム睡眠中の大脳皮質の毛細血管の血流の増加が、血管周囲を流れる間質液の流れにも影響を与える可能性の検証に着手した。血管周囲腔を流れる間質液を一過的に蛍光色素で標識し、その減衰速度を計測することで、流速を計測する方法の開発を行った。

### 3. 考察 まとめ

本研究により、長年決着がついてこなかった、睡眠中の大脳皮質の血流のダイナミクスについて、明確な結論を出すことができた。さらに、その分子機構・神経機構や生理的意義についてもいくつか知見を得ることができた。本研究で樹立したレム睡眠増加マウスも、睡眠中の血流動態の役割、ひいては精神疾患や発達障害のモデルマウスと組み合わせることで、レム睡眠の異常と疾患との関連も明らかに出来ると期待される。

最後に、本研究をご支援いただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究会に心より厚く御礼申し上げます。

げます。

#### 4. 発表論文

Chia-Jung Tsai, Takeshi Nagata, Chih-Yao Liu, Takaya Suganuma, Takeshi Kanda, Takehiro Miyazaki, Kai Liu, Tsuyoshi Saitoh, Hiroshi Nagase, Michael Lazarus, Kaspar Vogt, Masashi Yanagisawa, [Yu Hayashi](#).

Cerebral capillary blood flow upsurge during REM sleep is mediated by A2A receptors.

*Cell Reports* 17:109558 (2021). DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109558.

Mitsuaki Kashiwagi, Mika Kanuka, Kaeko Tanaka, Masayo Fujita, Ayaka Nakai, Chika Tatsuzawa, Kazuto Kobayashi, Kazutaka Ikeda, [Yu Hayashi](#).

Impaired wakefulness and rapid eye movement sleep in dopamine-deficient mice.

*Molecular Brain* 14:170 (2021).

Hibiki Okamura, Shinnosuke Yasugaki, Haruka Suzuki-Abe, Yoshifumi Arai, Katsuyasu Sakurai, Masashi Yanagisawa, Hotaka Takizawa, [Yu Hayashi](#).

Long-term effects of repeated social defeat stress on brain activity during social interaction in BALB/c mice.

*eNeuro* 9(3) (2022) DOI:10.1523/ENEURO.0068-22

Shinichi Miyazaki, Taizo Kawano, Masashi Yanagisawa, [Yu Hayashi](#).

Intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics in the ALA neuron reflect sleep pressure and regulate sleep in *Caenorhabditis elegans*.

*iScience* 25(6):104452 (2022) DOI:10.1016/j.isci.2022.104452

Taizo Kawano, Mitsuaki Kashiwagi, Mika Kanuka, Chung-Kuan Chen, Shinnosuke Yasugaki, Sena Hatori, Shinichi Miyazaki, Kaeko Tanaka, Hidetoshi Fujita, Toshiro Nakajima, Masashi Yanagisawa, Yoshimi Nakagawa, [Yu Hayashi](#).

ER proteostasis regulators cell-non-autonomously control sleep.

*Cell Reports* 42(3):112267 (2023). DOI:10.1016/j.celrep.2023.112267

Shinnosuke Yasugaki, Hibiki Okamura, Ami Kaneko, [Yu Hayashi](#).

Bidirectional relationship between sleep and depression. (review)

*Neuroscience Research* (2023) DOI: 10.1016/j.neures.2023.04.006