

# 睡眠エピゲノムの調節システムの解明とその応用

京都大学大学院医学研究科

江川 齊宏

## [1] 背景

睡眠（ノンレム・レム睡眠）は、生理的には学習、記憶の定着に密接に関わっている一方で、慢性的な睡眠不足・睡眠分断はアルツハイマー病やレビー小体病などの認知症発症以前の前駆症状として着目されている。しかし、これらの睡眠の異常が、いかに、認知症の傍証である神経回路の機能の低下と異常蛋白の蓄積につながるかについてはほとんどわかっていない。

断眠は、神経細胞内の DNA, RNA 発現に影響を及ぼし、学習と記憶など認知機能に影響を与える。断眠急性期には、エピゲノム調節因子 Dnmt1/3a の発現が亢進し、特にレム睡眠では、DNA メチル化が変化していることが近年明らかになっている（文献1）。グリア細胞培養系を用いた研究から、Dnmt1/3a, HDAC や Hmgal が脳内グリア細胞であるオリゴデンドロサイトの分化能・活動に密接に関わっている（文献2）。

急性・慢性睡眠異常がエピゲノム調節を介して DNA, RNA 発現に影響を与え、脳内神経グリア細胞の分化能・活動を障害するのであれば、この睡眠エピゲノム調節システムの制御によって、神経・グリア細胞の分化能と神経活動を高めることができる可能性がある。ノンレム・レム睡眠変化によって誘導される神経グリア細胞の分化能・活動の変化を観察し、睡眠エピゲノム調節システムの解明、さらに、これらのシステムの最適化によって新規の認知機能の改善法の開発につながる可能性がある。

## [2] 目的

- ① 動物モデルの脳において、急性・慢性的な睡眠短縮によって誘導される DNA メチル化・RNA 発現を検証し、睡眠エピゲノム変化とそれに伴う遺伝子発現の変化を観察する。
- ② 睡眠構築の変化によって誘導される睡眠エピゲノム調整システムの制御を通して、最適な神経グリア細胞の分化能・活動可塑性を変化させるか、その可能性を検証する。

## [3] 方法

C57BL/6 マウスを用いて、レム睡眠を効果的に減少させる系を確立するために、以下の様に急性レム睡眠短縮マウスと慢性レム睡眠短縮マウスを作出した。

### ① 急性レム睡眠短縮マウスの作出

急性レム睡眠短縮を誘導するために、水槽にマウスの足場ほどのスペースを設置し、環境に慣れさせたのち、3日間の睡眠評価を実施し、その後脳組織（海馬）を取り出した。

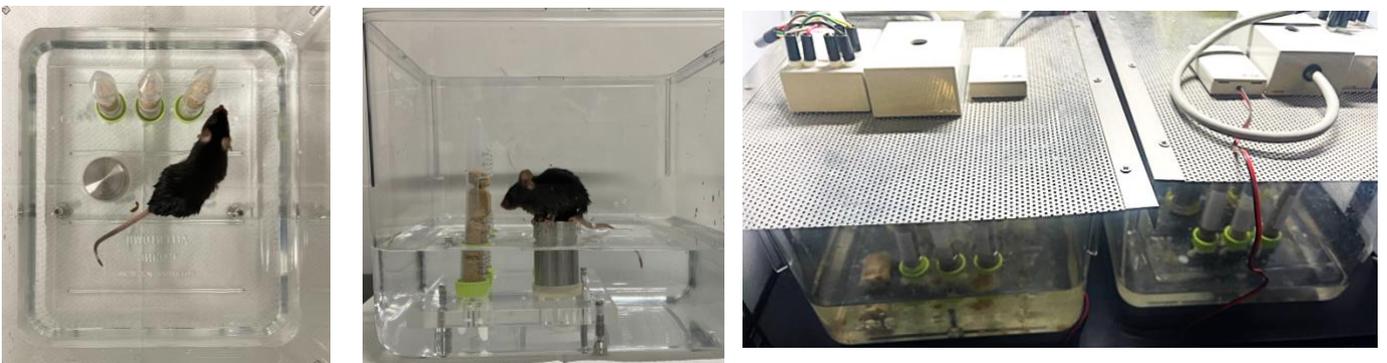


図1 急性レム睡眠短縮モデルマウス

(左・中) 水槽ケージの全体像

(右) 水槽ケージにおける睡眠評価

② 慢性レム睡眠短縮マウスの作出

マウスの両側嗅球に $\alpha$ シヌクレイン (SNCA) タンパク凝集を摂取すると、1ヶ月後からレム睡眠の割合の低下が観察され、2ヶ月後も継続する。これを慢性レム睡眠短縮マウスとして脳組織 (海馬) を取り出した。

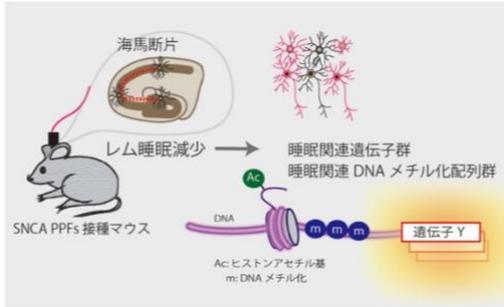


図2 慢性レム睡眠短縮モデルマウス

両側嗅球に神経毒性を有するタンパク質凝集体を接種すると、海馬以外の様々な脳領域に凝集が伝播し、レム睡眠が短縮する。

③ 睡眠評価方法

Sleepsign Recorder®ソフトウェア (Kissei Comtec社製) を用いて、1日24時間 (明暗周期12時間、全7日間のうち5日目) の睡眠を、覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の10秒ごとのエポックに分けて、目視化の上スコア化した。脳波、筋電図、赤外線センサーで検出したアクチグラフを記録し、マウス嗅球の接種後1ヵ月 (1mpi)、接種後2ヵ月 (2mpi) 群のマウスの睡眠段階を決定した。EEG/EMG記録中、睡眠中の運動活動を観察するため、動物の行動をカメラでモニターした。覚醒期はアクチグラフのカウントが1以上、またはEMGパワーの振幅が大きいことを特徴とした。ノンレム睡眠は、脳波振幅の積分FFTデルタパワーの相対的増加によって特徴付けられた。レム睡眠は、EMGパワーの振幅が相対的に低く、FFTシータ率が相対的に増加 (70%以上) することを特徴とした。

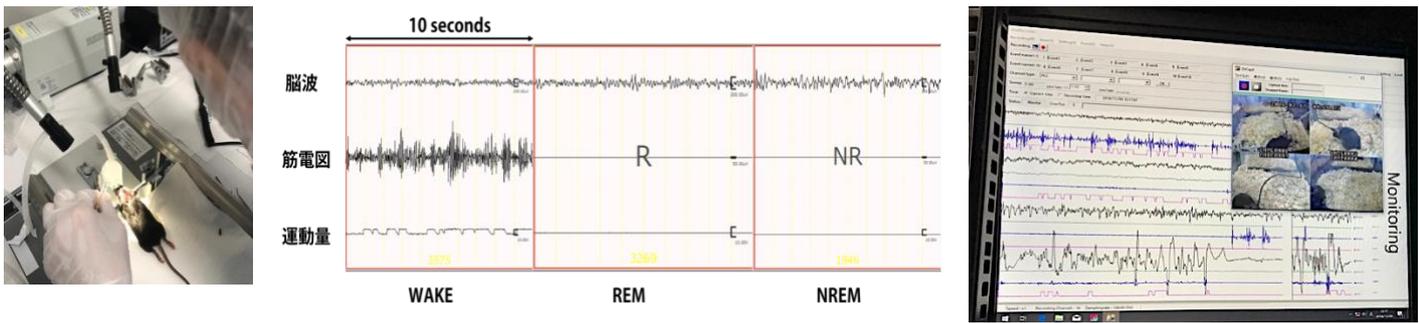


図3 (左) マウス頭蓋表面に脳波計設置 (中・右) 脳波・筋電図・運動量・動画による睡眠ステージ測定

④ 遺伝子発現解析・DNAメチル化

海馬組織を取り出し、DNA/RNAを抽出後、遺伝子発現解析にはAffymetrix社Mouse Expression Microarray、DNAメチル化解析にはIllumina社Infinium Mouse Methylation BeadChipを用いた。

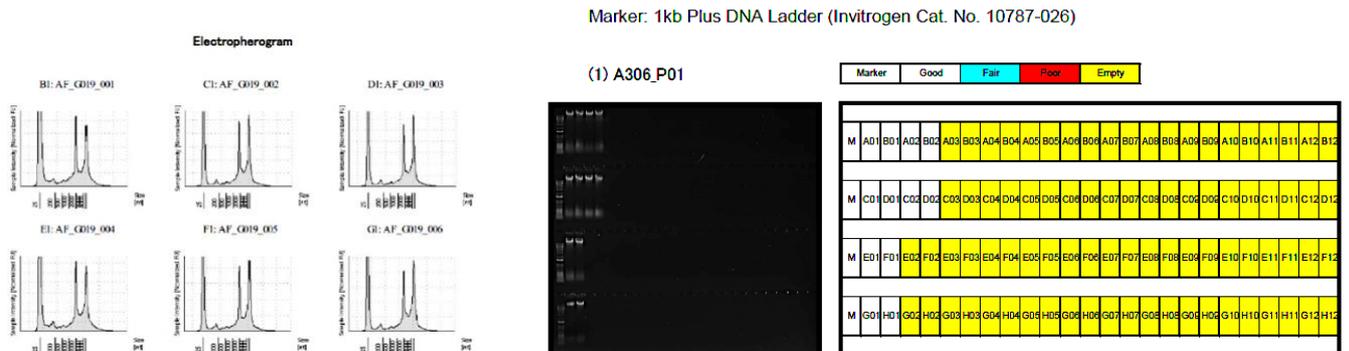


図4 : 抽出したmRNA, DNAの品質管理 (QC)

#### [4] 結果

急性・慢性レム睡眠短縮マウスの海馬神経細胞群の遺伝子発現で有意に変化する遺伝子群を同定した。

(図5) 特に慢性レム睡眠短縮マウスの海馬組織で優位に低下した遺伝子Xは神経幹細胞の維持に関わる遺伝子であり、慢性レム睡眠減少が、海馬神経幹細胞の分化・維持に影響を及ぼしている可能性を示唆した。

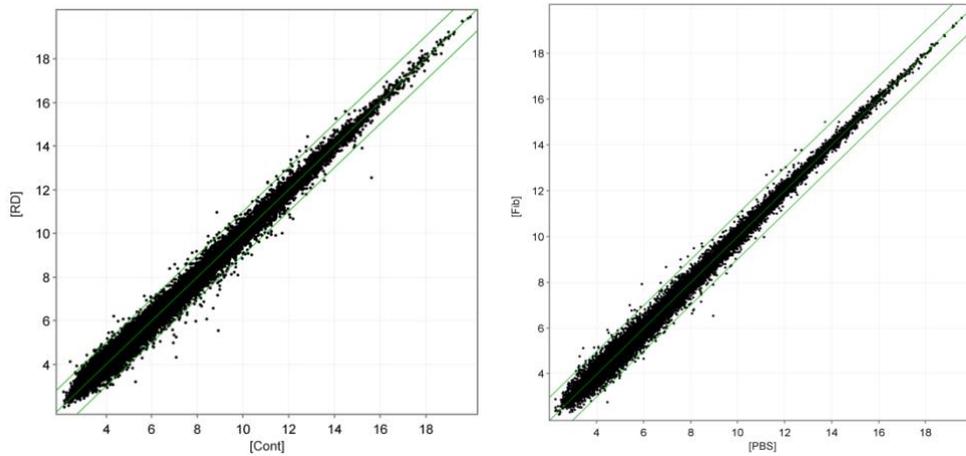


図5：(左) 急性 (右) 慢性レム睡眠短縮モデルマウス海馬抽出RNA Scatter plot

現在、急性・慢性レム短縮によって誘導される共通の遺伝子発現・遺伝子発現関連性を検討している。

さらに、DNAメチル化アレイを実施し、急性・慢性レム睡眠短縮モデルマウスの海馬において、優位に変化したDNA領域を同定した。現在、特に発現変化のみられた遺伝子群の転写活性領域におけるDNAメチル化の変化について着目し、睡眠構築によるDNAメチル化領域の変化とそれに伴う遺伝子群の同定を試みている。

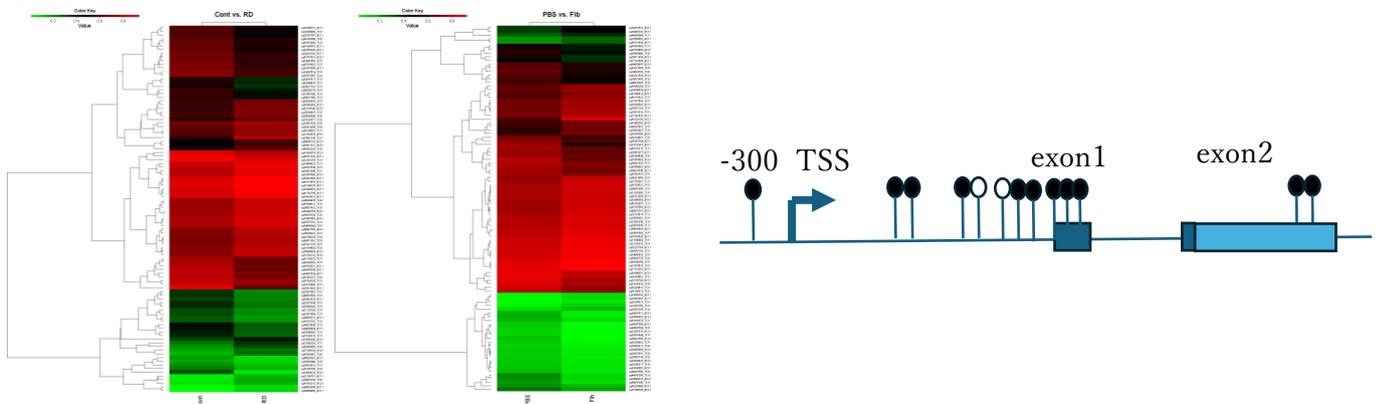


図6：(左) 急性 (中) 慢性レム睡眠短縮モデルマウス海馬抽出DNAメチル化アレイHeat map  
(右) 慢性レム睡眠短縮マウス海馬における遺伝子Xの転写活性領域のDNAメチル化

#### [5] 文献

(文献1) Narwade, S. C. et al. (2017) Front. Mol. Neurosci.10:67. doi: 10.3389/fnmol.2017.00067

(文献2) Egawa, N., et al. (2019). Glia 67, 718-728. doi: 10.1002/glia.23567

#### [6] 謝辞

本研究に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厚く御礼申し上げます。  
また、本研究にご協力いただいた東京大学大学院理学系研究科林悠先生に厚く御礼申し上げます。