

新規睡眠制御遺伝子に基づく睡眠障害の解明

東邦大学医学部解剖学講座

船戸 弘正

1. 目的

睡眠と食事は心身の健康に欠かすことのできない要素である。不眠は、うつ病等の気分障害の症状であると同時に、肥満、糖尿病のリスクを高める。さらに、睡眠は広範な動物種に普遍的に認められる行動である。しかし、睡眠の機能や制御機構は明らかになっていない。私たちは睡眠制御の分子機構を明らかにするために、ランダムに遺伝子変異が導入されたマウスを調べることにより、遺伝的に過眠を示すマウス家系を樹立した。この過眠家系の検討から、リン酸化酵素SIK3の変異が顕著な睡眠時間延長をもたらすことが明らかになった。変異型SIK3は、エクソン13によってコードされる52アミノ酸を欠失する。この欠失するアミノ酸に、プロテインキナーゼAでリン酸化されるセリン残基が存在し、幅広い動物種で保存されている。このセリン残基をアラニンに置換すると過眠となることから、シグナル伝達分子のカスケードが睡眠制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

興味深いことに、SIK3変異マウスは睡眠異常に加えて、肥満、うつ・不安行動の亢進を示す。本研究計画の目的は、SIK3変異マウスやSIK3を標的として、睡眠と肥満、気分を制御する統合神経ネットワークの分子機構を明らかにすることである。具体的には、視索前野の神経ネットワークに焦点をあて、多行動の協調的制御機構を明らかにする。

2. 方法

野生型マウスおよび遺伝子改変マウスは、C57BL/6マウスである。

うつ行動の評価には、強制水泳試験および尾懸垂試験を行った。不安行動の評価には、高架式十字迷路、明暗箱試験およびオープンフィールドテストを行った。養育行動は生後1週以内の新生仔をホームページページの三隅に置き、巣に連れ戻す行動で評価した。

性行動は、精巣もしくは卵巣除去後にテストステロンもしくはエストラジオール・プロゲステロン補充して実施した。攻撃行動はレジデント-イントルーダーテストで評価した。雄マウスをホームケージで個飼いにした後、イントルーダーとして雄DBA2マウスをホームページ内に入れ、攻撃指標を評価した。

SIK3を介した行動変化をもたらす責任ニューロン集団の同定を、SIK3 Ex13 floxマウスにCreを発現するアデノ随伴ウイルスを投与することによって、現在進めている。Creマウスとしては、抑制性神経 (Vgat-Cre) , 興奮性神経 (Vglut2-Cre) , ダイノルフィン陽性神経 (Pdyn-Cre) , サブスタンスP陽性神経 (Tac1-Cre) , エンケファリン陽性神経 (Penk-Cre) を標的としている。

睡眠覚醒は脳波筋電図により判定した。イソフルラン麻酔下に、脳波電極をマウスに装着した。手術7日後以降に、マウスをテザーケーブルと接続した。脳波筋電シグナルは、明期開始時から48時間記録した。脳波筋電データは、20秒のエポックごとに、覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠に分類した。睡眠の恒常性を検討するため、明期にジェントルハンドリングによる断眠を行い、断眠終了後から翌日の明期開始までの脳波筋電を解析した。

脳局所での遺伝子操作にはアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた。HEK293系統の細胞にパッケージに必要な各種プラスミドをトランスフェクトし、ウイルス粒子をPEGや限外濾過で精製濃縮した。脳定位装置とガラスピペットを用いて、標的部位にマイクロインジェクトした。

免疫染色には、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した脳から、クリオスタットで凍結切片を

作成し、単染色もしくは二重の蛍光染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡で観察し、Image Jで画像解析した。

3. 結果

SIK3遺伝子の操作により、肥満傾向を認めた。また、強制水泳試験、尾懸垂試験で有意に抑うつ傾向を示した。高架式十字迷路やオープンフィールド試験で行動学的に不安傾向を認めた。養育はやや減弱傾向にあったら、野生型との間に有意な違いはなかった。攻撃行動も減弱傾向にあるものの、有意差は示さなかった。性行動は雄雌とも若年では有意ではなかった。

異なるCreマウスを用いた検討は進めている。睡眠を含めて様々な表現型はCreドライバーマウスによって異なることがわかってきた。また、全身的にSik 3 変異を持つマウスで見られない表現型が、Creドライバーマウスとの交配によってSik3変異マウスに限局することで出現することもあった。

AAVの脳局所投与による検討も並行して行っており、Creドライバーマウスとの結果と同様に脳部位によって得られる表現型に違いが出ることも確認している。ただし、個体ごとのばらつきもあるため、十分な個体数とよくコントロールされた実験によって再現性のよい結果が得られるよう進めている。

SIK3の発現する細胞種はISHや免疫染色で検討している。基本的に神経細胞に出現しており、SIK1やSIK 2に比べて、SIK3の発現レベルが高い。SIK3は大脳皮質、視床、視床下部を含めて脳に広範囲に発現している。興奮性ニューロンにも抑制性ニューロンにも発現している。

4. 考察

以上のように、本研究計画に沿って、研究を進めている。その結果、SIK3の変異によって睡眠覚醒を中心に異なる行動異常を示すことが明らかになってきた。CreドライバーマウスやAAVマイクロインジェクションを用いた検討によって、各行動の責任神経集団を同定していく。その後は、その責任神経集団を中心とした神経回路の可視化と操作を、光遺伝学、薬理遺伝学およびin vivoイメージングによって行う。

この研究をすすめることによって、睡眠と覚醒という脳の状態の遷移機構解明を進めたい。さらに、睡眠、摂食、運動、性行動が個別ではなく、相互に直接関連しながら制御されていることを示していきたい。マウスという動物モデルを用いた研究から、睡眠と運動に関する望ましいライフスタイルを科学的根拠に基づいて立案・普及することができることを目指している。また、うつ病などの精神疾患や肥満、糖尿病等の代謝性疾患の治療法や、生活指導にも役立てることができるはずである。

さらに、睡眠と発生、睡眠と老化の研究においても、SIK 3 変異マウスはよい研究リソースとなると考えられるため、エピジェネティクス研究も含めた研究に展開していきたい。

5. 発表論文

1. **Hiromasa Funato**. Forward genetic approach to behavioral neuroscience using animal models. *Proceedings of the Japan Academy Series B*, in press
2. Masato Yamabe, Kazumasa Horie, Hiroaki Shiokawa, **Hiromasa Funato**, Masashi Yanagisawa, Hiroyuki Kitagawa. MC-SleepNet: Large-scale Sleep Stage Scoring in Mice by Deep Neural Networks. *Scientific Reports* 9; 15793, 2019
3. Miyo Kakizaki, Yousuke Tsuneoka, Kenkichi Takase, Staci J. Kim, Jinhwan Choi, Aya Ikkyu, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Masashi Yanagisawa*, **Hiromasa Funato***. Differential roles of each orexin receptor signaling in obesity. *iScience* 20: 1-13, 2019
4. Tamio Furuse, **Hiromasa Funato**, Masashi Yanagisawa, Shigeharu Wakana, et al. A new mouse model of GLUT1-deficiency syndrome exhibits abnormal sleep-wake patterns and alterations of glucose kinetics in the brain. *Dis Model Mech*, 12, dmm038828, 2019
5. Chika Miyoshi, Staci J. Kim, Masashi Yanagisawa*, **Hiromasa Funato***, et al. Methodology and theoretical basis of forward genetic screening for sleep/wakefulness in mice. *Proc Natl Acad*

6. Takato Honda, **Hiromasa Funato***, Masashi Yanagisawa*, et al. A single phosphorylation site of SIK3 regulates daily sleep amounts and sleep need in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 10458–10463, 2018
7. Kanako Iwasaki, **Hiromasa Funato***, Masashi Yanagisawa*, et al. Ablation of central serotonergic neurons decreased REM sleep and attenuated arousal response. *Front Neurosci* 12: 535, 1–13, 2018
8. Fumika Shigiyama, Naoki Kumashiro, **Hiromasa Funato**, Takahisa Hirose, et al. Mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance induced by sleep deprivation in mice. *Am J Physiol, Endocrinol and Metab* 315: E848–E858, 2018
9. Sachine Yoshida*, **Hiromasa Funato***, Kumi O. Kuroda*, et al. Corticotropin-releasing factor receptor 1 in the anterior cingulate cortex mediates maternal absence-induced attenuation of Transport Response in mouse pups. *Front Cell Neurosci* 12: 204, 2018
10. Tomoyuki Fujiyama, **Hiromasa Funato***, Mikio Hoshino*, et al. Forebrain Ptf1a is required for sexual differentiation of the brain. *Cell Reports* 24: 79–94, 2018
11. Zhiqiang Wang, **Hiromasa Funato***, Masashi Yanagisawa*, Qinghua Liu*, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need. *Nature* 558: 435–439, 2018
12. Yibing Wang, Liqin Cao, **Hiromasa Funato**, Kobayakawa*, Bruce Beutler*, Qinghua Liu*, et al. Large-scale forward genetics screening identifies Trpa1 as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nature Comm* 9: 2041, 2018
13. Satoko Oda, **Hiromasa Funato**, et al. Immunolocalization of muscarinic M1 receptor in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 526: 1329–1350, 2018
14. Haruna Komiya, **Hiromasa Funato***, Masashi Yanagisawa*, et al. Sleep/wakefulness behaviors in mice during pregnancy and pregnancy-associated hypertensive mice. *SLEEP* 41: zsx209, 2018