

## 研究終了報告書

### 「グリア細胞光計測によるレム睡眠理解」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：常松 友美

#### 1. 研究のねらい

鳥類、および哺乳類の睡眠ステージはレム（急速眼球運動）睡眠とノンレム睡眠からなり、全く異なる脳活動を呈する。レム睡眠時には、覚醒時と同様に脳の電氣的活動は脱同期し、覚醒時に匹敵するレベルまで神経活動は活性化している。それに対し、ノンレム睡眠時には、多くの神経細胞の発火が同期しており、その活動は抑制されている。睡眠は生きていく上で必要不可欠な本能行動のひとつであるが、何故眠るのか？何故ノンレム睡眠とレム睡眠の2つの異なる睡眠ステージが存在するのか？等、多くの本質的なことが分かっていない。これまでの報告から、ノンレム睡眠は記憶の定着に重要であるとする知見が蓄積されてきている。一方で、レム睡眠の機能や生理的意義は未だはっきりとは解明されていない。

睡眠研究は、これまで主に神経細胞の役割解明に注目が向けられてきた。しかしながら、脳は神経細胞、グリア細胞、血管で構成されているため、睡眠を含む脳機能を真に理解するためにはグリア細胞や血管の役割も解明する必要があると考えた。神経活動を維持するため、エネルギー源の供給を担っているのはグリア細胞の一種であるアストロサイトである。神経発火に応じて血流量が増加し、血流に乗って運ばれてきたグルコースは、アストロサイトに取りこまれる。グルコースは、アストロサイト内で乳酸へと代謝され、神経細胞へと輸送することで神経活動を維持することができる。また近年の研究から、アストロサイトが能動的に神経細胞に働きかけ、神経活動を積極的に制御していることが明らかになりつつある。レム睡眠中は感覚入力が遮断されているにも関わらず、どのようにして脳活動を高めているのか全く分かっておらず、これらの生理反応にアストロサイトが関与している可能性を考えている。そこで本研究では、アストロサイト活動を光計測することで睡眠覚醒に伴う活動変化の有無を解明する。さらに、光操作等によりアストロサイト活動を人為的に変化させた時の睡眠覚醒に与える影響を検討し、特にレム睡眠時にアストロサイトが司る生理反応メカニズムを追究する。特に血流・代謝・夢見に着目し、研究を展開していくことを目的とする。本研究により、睡眠研究界のみならず脳科学界に一石を投じる。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

脳は神経細胞、グリア細胞、血管から構成されている。これらが協調的に働き、初めてひとつの脳としての生理的機能を果たす事が出来る。本研究は神経細胞だけでなく、睡眠・覚醒におけるグリア細胞、特にアストロサイトや血管の役割も解明することを目的としている。神経細胞と異なりアストロサイトはその活動に応じて、電氣的活動ではなく細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を呈する。そこで、睡眠覚醒ステージ変化に伴うアストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を複数の脳領域

(大脳皮質、海馬、視床下部、脳幹、小脳)でファイバーフォトメトリー法にて光計測した。その結果、睡眠覚醒ステージに伴ってダイナミックに変化し、その挙動が計測した全ての脳領域において一貫していることを見出した。マウスが覚醒するとアストロサイト細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が増加し、睡眠に入ると徐々に  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少し、レム睡眠で最も  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少した。本研究結果は、Journal of Neuroscience 誌に筆頭責任著者として発表した。

一方、アストロサイトは神経細胞へのエネルギー源供給という役割を担っている。そこで、睡眠覚醒ステージ変化に伴う大脳皮質神経細胞内 ATP 濃度変化をマクロズーム顕微鏡にて光計測した。その結果、神経細胞内 ATP 濃度も睡眠覚醒に伴った濃度変化が観察され、覚醒すると神経細胞 ATP 濃度が増加し、睡眠に入ると徐々に減少、レム睡眠で最も ATP 濃度が減少することを明らかにした。一方で、脳にエネルギー源を運ぶ血流はレム睡眠中に増加し、覚醒時に減少していた。これは、レム睡眠中にエネルギー消費量が増加していることを示唆している。本研究結果は、Communications Biology 誌に第二著者として発表した。

今後も、神経細胞だけでなく、グリア細胞や血管にも着目することで包括的な視点で睡眠研究を展開する。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「睡眠覚醒に伴うアストロサイト活動の解明」(主な研究成果リスト 1)

睡眠覚醒を繰り返すマウスから、アストロサイト活動の指標として細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を光計測した。実験には  $\text{Ca}^{2+}$ センサーである YCnano50 をアストロサイト特異的に発現する遺伝子改変マウス (Mlc1-tTA; TetO-YCnano50 bigenic mice) を用いた。YCnano50 は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に応じて、蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) が起こるため、YFP/CFP レシオ (Y/C レシオ) の増加はすなわち細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度増加を意味している。ファイバーフォトメトリー法にて、小脳アスト

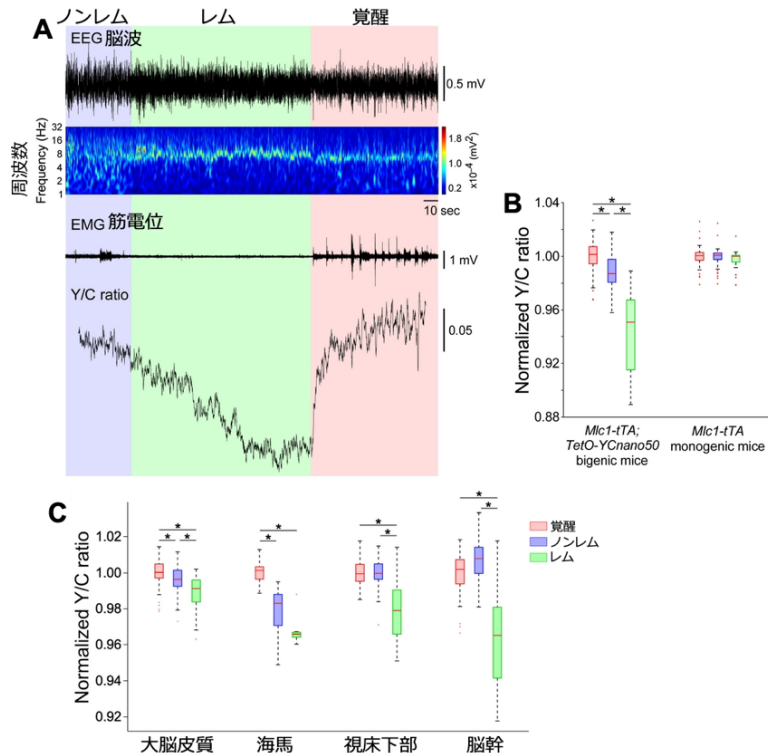


図1 睡眠覚醒ステージに応じたアストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化

A) レム睡眠中に小脳アストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少し、覚醒と同時に  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が一気に増加する。

B) Aの図をまとめた箱ひげ図。覚醒時のY/Cレシオの平均を1としている。コントロールとして、アストロサイトに何も発現していないMlc1-tTAマウスを用いた。

C) 各脳領域におけるアストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の箱ひげ図。

\*:  $p < 0.05$

ロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を光計測した結果、睡眠時、特にレム睡眠時に  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少し、覚醒と同時に一気に増加することを明らかにした(図 1A, B)。一方、コントロール(Mic1-tTA monogenic mice)では、Y/C レシオに有意な変化は観察されなかった(図 1B)。小脳だけでなく、大脳皮質、海馬、視床下部、脳幹からも計測を行ったところ、どの脳領域においても、レム睡眠中に Y/C レシオが最小値を示し、覚醒時に増加しており、今回計測した脳領域では一貫した挙動であった(図 1C)。これまでの研究より、睡眠覚醒ステージに応じた神経活動は、脳領域によって異なることが知られている。しかしながら、本研究により、睡眠覚醒ステージに応じたアストロサイト活動パターンは全く異なることが示された。

一方、ノンレム睡眠時の  $\text{Ca}^{2+}$ レベルは脳領域により異なっていた。小脳、大脳皮質、海馬では覚醒時と比較し有意に減少したが、視床下部、脳幹においては有意な差は見られなかった(図 1B, C)。主成分分析により、この  $\text{Ca}^{2+}$ 動態を詳しく解析すると、分布が異なり、今回計測した脳領域では 3 つのクラスター(クラスター1:大脳皮質・海馬、クラスター2:小脳、クラスター3:視床下部・脳幹)に分類できることが示唆された。この結果は、脳領域によって睡眠覚醒におけるアストロサイトの生理的役割が異なる可能性を示唆している。本研究をきっかけに、グリア細胞も含めた脳全体での睡眠のメカニズムや生理的役割の全貌解明に繋がることが期待される。本研究結果内容は、本さがけ研究者が単独筆頭責任著者として、Journal of Neuroscience 誌に掲載された(Tsunematsu\* et al., *J Neurosci* 2021)。

#### 研究テーマB「睡眠覚醒に伴う脳内エネルギー源動態の解明」(主な研究成果リスト 2)

アストロサイトはエネルギー源を神経細胞に渡すことで、神経細胞の活動維持に寄与している(図 2)。そこで、次に睡眠覚醒ステージに伴う神経細胞内アデノシン三リン酸(ATP)濃度変化を光計測した。実験には、ATPセンサーであるATeamを神経細胞特異的に発現する遺伝子改変マウス

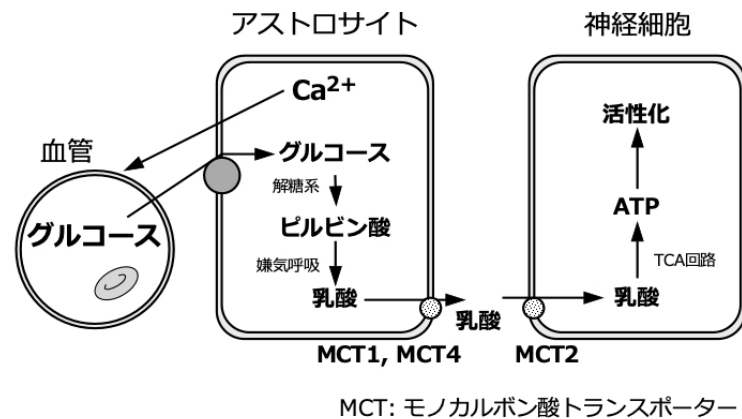


図2 血管-アストロサイト-神経細胞間エネルギー源動態

(Thy1-ATeam mice)を用いた。ATeamもY/Cnano50と同様に、FRETを用いており、Y/Cレシオの増加がすなわち細胞内ATP濃度の増加を示している。本研究では、マクロズーム顕微鏡を用いた。マクロズーム顕微鏡を用いることで、マウス脳表面全体といった広範囲で、かつシグナル・ノイズ比の良い蛍光イメージの取得が可能となった。大脳皮質の神経細胞内ATP濃度は睡眠時に減少し、レム睡眠時に最も減少し、覚醒すると増加した(図 3A, B)。これは、アストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の挙動と同じであった。一方、エネルギー源となるグルコースを運搬する血流量は、レム睡眠時に増加していたことから、レム睡眠中には神経細胞でのエネルギー消費が亢進し、それによりエネルギーバランスが負に傾いている可能性を示唆している。本研究結果は、Communications Biology 誌に掲載された(Natsubori, Tsunematsu et al., *Commun Biol*, 2020)。

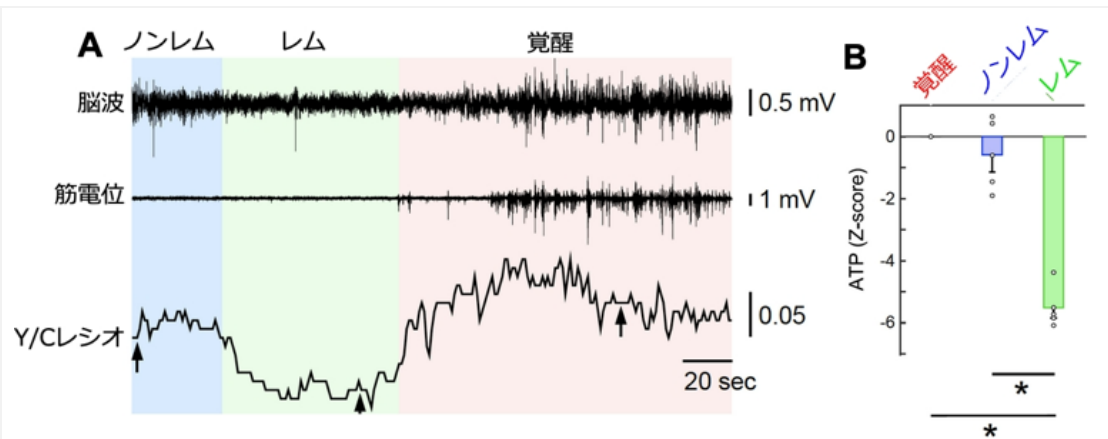


図3 睡眠覚醒ステージに応じた大脳皮質神経細胞内ATP濃度変化

A) レム睡眠中に神経細胞内ATP濃度が減少し、覚醒すると増加する。

B) Aの図をまとめた箱ひげ図。

\*:  $p < 0.05$

### 研究テーマC「アストロサイトに着目したマウスにおける夢見の立証」

レム睡眠の特徴のひとつに「夢見」がある。アストロサイトがレム睡眠中に神経細胞へエネルギー源を供給し、それにより神経活動の活性化、脱同期により夢見が可能な脳状態創出に一役買っているのではないかと予想した。レム睡眠中のマウス一次視覚野よりアストロサイト活動を記録することで、夢見の一端を立証することを目的とした。しかし、本研究は当初の研究計画を見直し、まずは神経活動記録によりマウスの夢見を立証すべきだと考えた。マウスの夢見立証後、夢見におけるアストロサイトの役割解明を展開する。

### さきがけ領域内共同研究「 $\beta$ ホウ酸バリウム(BBO)による新規光照射法の開発」

さきがけ「光操作」3期生の横浜国立大学古川太一博士との共同研究を行った。古川博士が開発している非線形光学結晶である $\beta$ ホウ酸バリウム(BBO)の蛍光のマウス脳内での透過を観察するために、パラホルムアルデヒドで灌流固定したマウス脳切片を提供した。さらに、東北大学の当研究グループにてマウス個体を用いた *in vivo* 実験に協力した。神経細胞特異的にチャネルロドプシン2を発現するマウスの大脳皮質内にBBOを投与し、レーザーを照射することで、神経活動の活性化を惹起できるかどうかを検討した。

### 3. 今後の展開

本研究により、睡眠覚醒ステージ変化に伴い、アストロサイト活動、血流量、神経細胞内ATP濃度がダイナミックに変化していることを見出した。今後は、アストロサイトから神経細胞へと受け渡されるエネルギー源動態の全容解明を目指して研究を進めていく。一方、本研究は睡眠覚醒ステージとそれぞれの生理的変化の相関関係を明らかにするに留まっており、それぞれの因果関係は未解明のままである。アストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化、血流量変化、神経細胞内ATP濃度変化が、睡眠覚醒において担う生理的役割を解明する必要があると考えている。

本研究は基礎的な研究であるため、すぐに社会実装には繋がらないと考えられるが、スト

レスの多い現代社会では睡眠に何らかの問題を抱えている人が多く存在する。そのため、睡眠覚醒のメカニズムや意義を解明することは社会的にも急務の課題である。本研究により、睡眠覚醒に神経細胞だけでなくグリア細胞も関与していることを明らかにしたことから、将来的にはグリア細胞等をターゲットとした新しい作用機序を持つ睡眠薬の開発等に繋がっていくことが期待される。

#### 4. 自己評価

研究目的の達成状況はおおむね順調であったと自己評価している。ひとつめの目標であった、睡眠覚醒ステージ変化に伴うアストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に関する研究成果は、2021年に筆頭責任著者として Journal of Neuroscience 誌に掲載された。その直前に、同様の内容の論文が二報発表されていたが、大脳皮質アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ 挙動の解明に留まっており、様々な脳領域でのアストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を比較、検討したのは本さきがけ研究員だけであり、独自の視点で研究を展開できた。一方、アストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化のメカニズムや睡眠覚醒における生理的役割解明までには至らず、今後の課題となった。ふたつめの目標であったエネルギー源動態解明は、当初使用する予定であった遺伝子改変マウスが使用できなくなり、計画が遅れてしまったが、当初の予定にはなかった、睡眠覚醒に伴う血流量変化、神経細胞内 ATP 濃度変化を解明し、刊行論文 (Natsubori, **Tsunematsu** et al., Commun Biol, 2020)として発表できたことは、自身でも高く評価したい。多くが神経細胞だけに着目されてきた睡眠研究の流れの中で、グリア細胞や血流量に着目した本研究は脳全体での睡眠メカニズムや生理的機能の全貌解明に繋がっていくことが期待される。

研究費の執行状況も妥当であったと考える。2019年度に独自の研究グループを立ち上げたため、実験設備や遺伝子改変マウスの導入への投資が多かったが、そのおかげでスムーズに研究室のセットアップが完了した。当グループはメンバーが少なく、技術補助員を2名雇用した。大変優秀な技術補助員のおかげで、限られた時間の中で効率的に研究を進めることが出来たと自負している。

#### 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:4件

1. **Tsunematsu T\***, Sakata S, Sanagi T, Tanaka KF, Matsui K (2021)  
Region-specific and state-dependent astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics during the sleep-wake cycle in mice.  
**J Neurosci** 41(25): 5440-5452.

睡眠の生理的役割を脳全体で包括的に理解するためには、神経細胞だけでなく、同じく脳を構成するグリア細胞活動や血管にも着目する必要がある。グリア細胞の一種であるアストロサイトの活動を観察したところ、睡眠覚醒ステージに応じてダイナミックに変化しており、覚醒時に高く、レム睡眠時に最も低くなっていることを見出した。この動態は複数の脳領域で一貫

しており、神経活動パターンとは全く異なっていた。これは睡眠においてアストロサイトが神経細胞とは異なる役割を担っている可能性を示唆している。

2. Natsubori A, Tsunematsu T, Karashima A, Imamura H, Kabe N, Trevisiol A, Hirrlinger J, Kodama T, Sanagi T, Masamoto K, Takata N, Nave KA, Matsui K, Tanaka KF, Honda M (2020)

Intracellular ATP levels in mouse cortical excitatory neurons varies with sleep-wake states.

**Commun Biol.** 3: Article number 491

細胞のエネルギー通貨として知られているアデノシン三リン酸(ATP)は、生理的条件下では一定に保たれていると考えられてきたが、睡眠覚醒ステージに伴って大脳皮質神経細胞内 ATP 濃度がダイナミックに変化していることを見出した。レム睡眠中に減少し、覚醒で増加する。一方、脳にエネルギー源を運ぶ血流はレム睡眠中に増加し、覚醒時に減少した。これは、レム睡眠中にエネルギー消費量が増加していることを示唆している。

3. Tsunematsu T, Patel AP, Onken A, Sakata S (2020)

State-dependent brainstem ensemble dynamics and their interactions with hippocampus across sleep states.

**eLife** 9: e52244

脳幹は睡眠覚醒ステージ、特にレム睡眠制御に重要な脳領域である。本研究では、記憶に重要な海馬の神経活動と脳幹の神経活動を同時記録した。その結果、ノンレム睡眠では海馬から脳幹へ情報が伝達さえ、逆にレム睡眠では脳幹から海馬へ情報が伝達されることを見出した。同じ睡眠状態であっても、異なる脳領域間の情報伝達方向が逆転しうることを世界で初めて発見した。これは、ふたつの睡眠ステージが担う生理機能が異なる可能性を強く示唆している。

## (2)特許出願

該当なし

## (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)

### 【国際会議・招待講演】

○Tomomi Tsunematsu 「Neural ensemble dynamics during REM sleep and P-waves in mice」The 7<sup>th</sup> Annual IIS Symposium, ~ Solving the mystery of sleep ~, Shinagawa, Japan December 2018

### 【国内会議・招待講演】

○常松友美 「睡眠覚醒ステージおよび脳領域に応じたアストロサイト Ca<sup>2+</sup>ダイナミクスの解明」日本睡眠学会第46回定期学術集会 福岡(オンライン参加) 2021年9月24日

○常松友美 「睡眠ステージに応じて変化するマウス脳内グリア細胞活動の光計測

(Optical imaging of glial cell activity which varies during sleep-wake cycle in mice)」第  
92 回日本動物学会 米子(オンライン開催) 2021 年 9 月 4 日

【著書】

Tomomi Tsunematsu 「Elucidation of Neural Circuits Involved in the Regulation of  
Sleep/Wakefulness Using Optogenetics」Optogenetics. Advances in Experimental Medicine  
and Biology, Springer 2021 年 1 月

【プレスリリース】

「睡眠覚醒における脳細胞に関する新知見 アストロサイトの活動が睡眠覚醒で変化する  
ことを発見」2021 年 5 月 19 日

URL: <https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/05/press20210519-01-sleep.html>

「睡眠-覚醒に伴う、脳内エネルギー変動を発見 ～レム睡眠中に神経の細胞内エネルギー  
が大きく低下する～」2020 年 9 月 8 日

URL: <https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/09/press20200904-01-rem.html>