

オーストラリアドラゴンの前障の役割の解明

北海道大学大学院医学研究院 細胞薬理学教室
乗本 裕明

【背景・目的】

生命活動を維持するために脳は定期的に休息状態になる必要がある。睡眠はその代表的な例であり、身体の回復や記憶の定着等に必要であることが広く知られている。しかし実際に脳内でどのようにして睡眠状態が生み出されるのか、その神経メカニズムはまだ全くと言っていいほど明らかになっていない。哺乳類の睡眠には「レム睡眠」と「ノンレム（徐波）睡眠」と呼ばれる特徴的なステージが存在するが、なぜ二つの睡眠が存在するのか、その理由は未だに明らかになっていない。それぞれの状態が生み出されるメカニズムの解明は、睡眠の本質を理解するために必須である。

ヒトをはじめとする昼行性の動物は、夜間長時間眠る傾向にあり、その間にレム睡眠とノンレム睡眠が種固有の周期長とともに規則正しく切り替わる。このことから脳内にレム・ノンレムを生み出す中心パターン生成器（central pattern generator, CPG）が存在すると考えられる（図1）。しかしその機構は全く明らかになっていない。解明が遅れている理由は二つある。一つ目は研究室で用いられる動物が夜行性であり、睡眠が断片化されているためである。例えば睡眠研究に頻用されているマウスの平均睡眠長は2分であることが知られており、睡眠と覚醒をランダムかつ高頻度に繰り返す。これでは CPG の有無を検証することは困難である。解明が遅れている二つ目の理由に、（当たり前ではあるが）生体動物を用いることでしか睡眠研究ができない点にあることが挙げられる。もし、*in vitro* 実験系でレム睡眠・ノンレム睡眠の研究ができれば、*in vivo* 実験では困難な、詳細な神経活動の記録を行うことにより、CPG の探索を行うことができるようになる。また、抽出された候補因子から睡眠ステージの「再構成」に挑むことが可能になる。つまり睡眠の必要十分条件に迫ることができる。

このような背景を受け、我々は昼行性動物であるオーストラリアドラゴン（*Pogona vitticeps*, 以下ドラゴン（図1右下））を新たな睡眠のモデル動物として導入した。なぜならば、ドラゴンも前障という脳領域の神経活動からレム睡眠およびノンレム睡眠を定義できることが明らかになったためである。（Norimoto et al., *Nature*, 2020）。

ドラゴンの睡眠は一周期が約100秒という短時間かつとても規則正しく、CPGの探索に最適である。また、一周期に数十分から数時間かかる哺乳類に比べ、睡眠ステージ切替えの研究が容易である。さらに、全脳を摘出した後も、数日間にわたり人工脳脊髄液中で培養可能である。

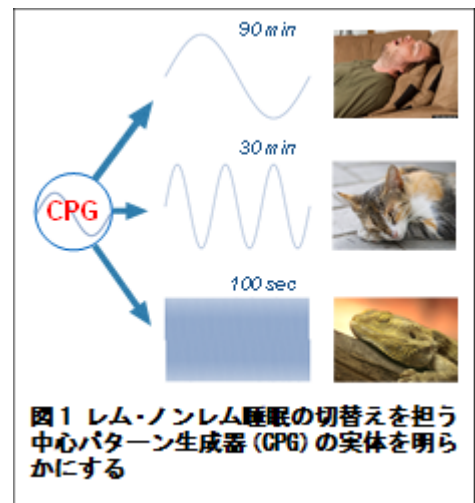




図 2-1 眼球-脳摘出標本（左）と実験の模式図（右）

眼球-脳標本の立ち上げに成功したため、全脳 ex vivo 標本に、視覚刺激を与えながらパッチクランプ、多電極アレイ（MEA）記録、カルシウムイメージングを同時に行うことが可能となった。

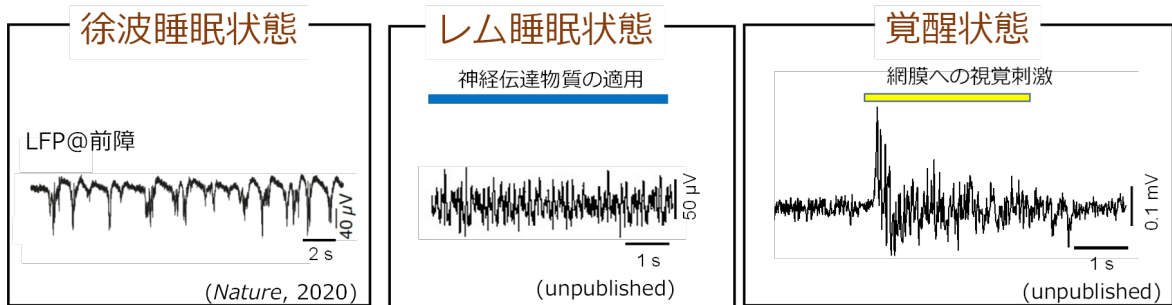


図 2-2 全脳標本上で再現した徐波睡眠・レム睡眠・覚醒状態

その一方で、本実験動物についての知見があまりにも乏しいためドラゴンの睡眠の性質が哺乳類とどの程度似ているかは不明であった。そこで、本研究期間では、in vitro 睡眠・覚醒実験系の構築に加え、前障睡眠時脳波の恒常性および概日性の有無を検討した。

【研究の進捗】

以下の二点に取り組んだ。

1. ドラゴンの前障の睡眠時神経活動の基本的性質（睡眠恒常性および概日性）の精査
2. in vitro 標本上での睡眠・覚醒状態を再現できる条件の検討

1. ドラゴンの前障の睡眠時神経活動の基本的性質の精査 (in vivo 実験)

睡眠時における前障の基本的な活動特性を理解するために、概日リズムおよび断眠処置によって前障の神経活動がどのような影響を受けるか観察した。

断眠実験

ドラゴンの前障も睡眠はく奪によりリバウンド（睡眠時の δ (0.1-3Hz) パワーの増加) を示すことが明らかになった。大脳皮質を切除した動物に睡眠はく奪を施したところ、リバウンドは見られなかった。これは、前障による睡眠リバウンドは大脳皮質の活動変化に起因するものであることを示唆している。この成果は現在論文の執筆が完了し、投稿直前である。

概日リズム実験

まず、動物を恒常暗条件に7日間曝露したところ、行動と前障における睡眠時脳波は24時間周期で現れたが、この動物の特徴である、規則正しいレム睡眠とノンレム睡眠の切替が阻害された(図3)。最終日に光条件に曝露し、再度記録を行ったところ、リズムの安定性が回復した。これは、規則正しいレム・ノンレム睡眠の切替え

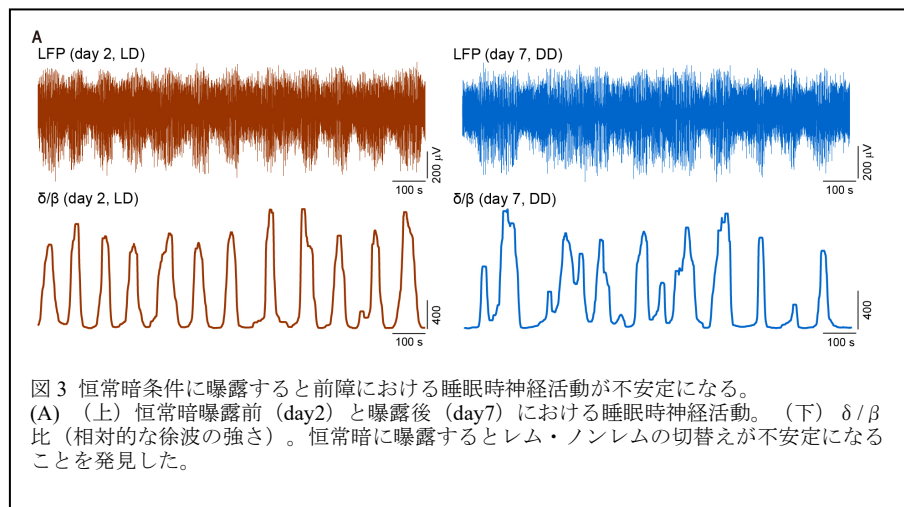


図3 恒常暗条件に曝露すると前障における睡眠時神経活動が不安定になる。(A) (上) 恒常暗曝露前 (day2) と曝露後 (day7) における睡眠時神経活動。(下) δ/β 比 (相対的な徐波の強さ)。恒常暗に曝露するとレム・ノンレムの切替が不安定になることを発見した。

のためには昼間に光を浴びることが必要であることを意味している。(in minor revision)。

2. in vitro 標本上での睡眠・覚醒状態の再現

全脳標本上の前障において、徐波睡眠・レム睡眠・覚醒状態を再現することを目指した。ドラゴンから脳を摘出し、培養条件の最適化を行ったところ、神経伝達物質の適用により、徐波睡眠・レム睡眠の脳状態を再現することに成功した(図 2-2)。さらに、眼球に光を当てることにより、前障の神経活動は覚醒状態に切り替わり、光を消すと睡眠状態に戻ることを見出した。

【まとめ】

本研究の結果から、以下の三点が明らかになった。

- ドラゴンの前障の睡眠時神経活動にも恒常性が存在する。これには大脳皮質が関与する。
- レム・ノンレム睡眠の切替えには日中に光を浴びることが必要である。
- in vitro 標本で睡眠・覚醒状態を再現できる。

とくに、in vitro 標本で睡眠・覚醒状態を再現できるようになった点は大きな進展であるといえる。この技術確立により、今後は「睡眠・覚醒」という現象に in vitro 実験でアプローチすることが可能になった。今後は、in vitro 標本上で規則正しい徐波・レムの切り替えを誘導することにより、CPG の詳細なメカニズムに迫りたい。

引き続き本モデル動物を用いることで、種を越えて保存された睡眠の神経原則を明らかにすることを目指す。数十年先になるかもしれないが、数十年後に臨床の場へ届く発見が生み出されるきっかけとなるような、確かな知見を蓄積してゆきたい。