

人為的レム睡眠操作マウスの解析によるレム睡眠の機能の探索

中井 彩加 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

ヒトの睡眠はレム(急速眼球運動)睡眠とノンレム睡眠に大別され、私たちは一晩にレム睡眠、ノンレム睡眠、短い覚醒を繰り返している。レム睡眠は夢の主な生成源として古くから注目されており、さらに記憶の形成や消去に関わることがこれまで提唱されてきた。しかし、確たる証拠はほとんどなく、レム睡眠の意義は未だ不明である。研究が進んでいない原因として、レム睡眠を有効に阻害できる方法がなかったことが挙げられる。そのような中で、私が所属している研究室では、レム睡眠の制御に関わる脳部位を複数同定している。そこで、本研究では、これらの脳部位の機能を遺伝学的に操作することでレム睡眠を減少させ、その際の表現型を探ることで、レム睡眠の機能的意義の一端を明らかにすることを目標とした。

古典的なレム睡眠の阻害方法として、動物がレム睡眠に陥るたびに物理的刺激を加え覚醒させる方法がある。しかし、これらの方法は起こすための刺激そのものによるストレスが大きく、レム睡眠を減少させた効果というよりもストレスの影響を見ている可能性が否定できなかった。

私が所属している研究室では、これまでに、脳幹橋の特定の部位にジフテリアトキシンのAサブユニット(DTA)を発現させて細胞死を誘導することで、レム睡眠量を大きく減少させることに成功している(Liuら、未発表)。これは、この脳領域にレム睡眠の制御に重要な役割を担う神経細胞があるためと考えられる。このような遺伝学的にレム睡眠量を減少させる方法では、マウスへのストレスの影響を抑えることができる。そこで、私はこの遺伝学的レム睡眠阻害マウスに注目して、どのような影響が現れるかを解析することにした。

レム睡眠を低下させたマウスの解析にあたり、私は、レム睡眠が脳の恒常性維持に必要ではないかと仮定した。そして、レム睡眠の減少は脳の恒常性に異常をきたし、脳内に損傷をもたらすと予想した。損傷は炎症応答により判断することができるため、私はレム睡眠量を減少させたマウスの脳内における炎症応答に着目した。脳内での炎症応答ではミクログリアがその中心的役割を果たしている。炎症の状況に応答してミクログリアは活性化し、形態の変化や発現因子の変動が起こる。そこで、本研究ではまずミクログリアの形態や活性化状態などを調べるため、免疫組織化学の確立を試みた。

なお、ここで破壊した神経細胞がレム睡眠の制御以外の機能を担っている可能性もあり、観察された表現型が本当にレム睡眠量の減少がもたらした影響かを考慮する必要がある。本研究ではさらに柏木らによって特定された別のレム睡眠制御神経細胞群(柏木ら、未発表)にも DTA を発現させ、レム睡眠を減少させることも試みることにした。そして、これらのレム睡眠阻害マウスに共通してみられる表現型を探ることで、レム睡眠の機能を探索することにした。

【方法】

(1) Iba-1 および CD68 の免疫組織化学によるミクログリアの状態の観察

ミクログリアの状態を観察するために、まず、野生型の C57BL/6J マウス、アルツハイマーモデルマウスを用いて、最適な免疫組織化学の条件を決定した。染色にはミクログリア全般のマーカーとして Iba1 に対する抗体を、活性化型ミクログリア特異的なマーカーとして CD68 に対する抗体を用いた。条件決定後、レム睡眠減少マウスの免疫組織化学を実施した。

(2) 新規レム睡眠量減少マウスの作成

(i) ウイルスベクター注入と睡眠解析

マウスの脳幹被蓋野の左右両側に、DTA を発現するウイルスベクター、または対照群として、蛍光タンパク質 mCherry を発現するウイルスベクターを微量注入した。さらに、マウス頭部に電極を取り付けることで、脳波および筋電位を記録した。記録した脳波と筋電位を 4 秒ずつのエポックで区切り、ノンレム睡眠、レム睡眠、および覚醒の 3 つの状態に振り分け、それぞれのマウスの睡眠状態を解析した。

(ii) ウイルスベクター由来の外來遺伝子の発現の確認

睡眠記録が終わったマウスの脳を固定し、冠状断面の脳切片を作製した。mCherry に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学により、目標の脳部位にウイルス由来の遺伝子が発現しているかを確認した。

【結果】

(1) ミクログリアの状態の観察

Iba1 の免疫組織化学により、典型的なミクログリアの形態の細胞(図)を検出することができた。また、CD68 に関しては、Iba1 との二重染色の結果、一部の Iba1 陽性ミクログリアにおいて、CD68 由来のシグナルが検出でき、活性化型ミクログリアの検出に成功した。

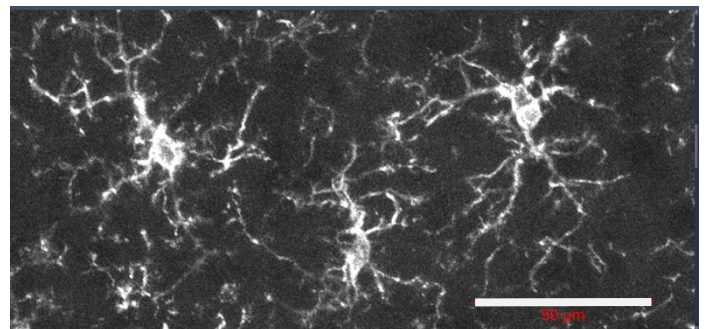


図. 野生型 C57BL/6J マウスの海馬のミクログリアの Iba-1 免疫組織化学による観察 (スケールバー: 50 μ m)

(2) 新規レム睡眠量減少マウスの作成

現在、睡眠状態を解析中である。