

## レム睡眠の意義の解明に向けた生涯にわたってレム睡眠量の多いマウスの確立

谷口 心平 (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】

睡眠は全ての動物に共通してみられる生存に必要不可欠な生理的行動である。しかし、睡眠のメカニズムや必要性の根拠に関しては、未だに十分な説明がなされていない。睡眠はレム (Rapid Eye Movement: REM) 睡眠とノンレム (non-REM) 睡眠という 2 つの睡眠段階にわけられる。レム睡眠は、覚醒に似た脳波状態、急速眼球運動や筋弛緩などの身体的変化を伴う特徴をもち、またこれは一部の脊椎動物のみにみられる現象である。レム睡眠の機能については不明な点が多いが、その割合は幼児期に最も多く、加齢にしたがって減少するため、脳機能発達や加齢に伴う神経疾患との関連が示唆されている。

私の所属する研究室では、レム睡眠の生理的役割や進化的起源の解明を目的として、マウスを用いてレム睡眠を生み出す脳部位の同定・解析・操作を行っている。これまでに、当研究室の柏木らによって、脳幹に位置する SLD-Cre (+) ニューロンがレム睡眠を阻害するはたらきをもつことが明らかにされた (柏木ら、投稿中)。さらにこのニューロン特異的にジフテリア毒素 (DTA) を発現させて細胞死を誘導することで、生涯にわたってレム睡眠を増加させることができると示唆された。

私はこの SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスがレム睡眠の機能的意義の研究に有用であると考えた。このマウスを研究へ活用するにあたり、検討すべき事項は 2 つある。第一に、マウスのサンプル数が不十分であるため、引き続き解析を行う必要がある。第二に、このマウスは与えるエサ種によって睡眠表現型の変化や体重の低下がみられるため、原因を特定する必要がある。SLD-Cre (+) 細胞は腸にも存在しており、原因のひとつとして、それらが細胞死を起こすことにより睡眠へ二次的な影響が生じている可能性が考えられる。

そこで、本研究では、SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスのサンプル数を十分に増やして睡眠解析を進めるとともに、脳での SLD-Cre (+) ニューロンに加えて腸でも SLD-Cre (+) 細胞が破壊されている可能性を検討することを目的とした。このマウスが確立されれば、レム睡眠の増加に関連した神経機能の若返り効果 (加齢に伴う成人病や認知症などの疾患の減少、若い時の高い学習能力の維持) の検討などへの活用も期待される。

## 【方法】

## (1) SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスの作製

SLD-Cre (+) ニューロンを特異的に除去するため Cre/loxP システムを用いた。SLD-Cre マウスと Cre 依存的に神経においてジフテリア毒素 (DTA) 遺伝子を発現するマウス (NSE-loxp-stop-loxp-DTA) とを交配した。マウスは離乳後、ゲルタイプのエサを与えて飼育した。生後 10 週目にマウスの頭部には脳波測定及び筋電図測定用の電極を外科的手術により取り付けた。10 日間以上の回復期間の後に睡眠測定を行った。生後 12 週目から固形細断エサを与え、12 日間の馴化の後に再度睡

眠測定を行った。対象群として DTA 遺伝子のみをもつ Cre (-) のマウスを用いた。

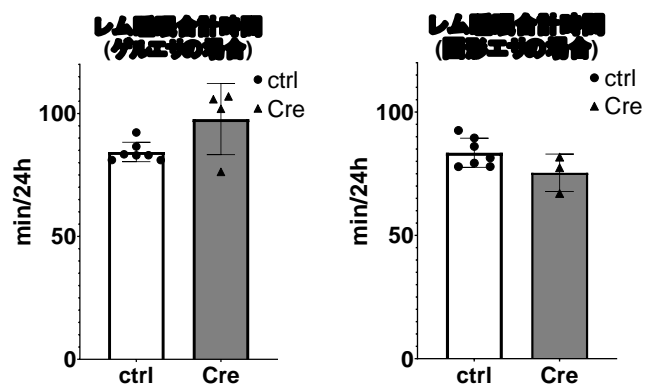
(2) SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスの睡眠の解析  
マウスは 12 h ほどの明暗サイクルのもと、睡眠チャンバー内で飼育した。マウスは自由に飲水・摂餌が可能であった。睡眠測定は 48 h 実施した。記録された脳波と筋電図は 4 秒ごとのエポックで区切り、覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の 3 つの状態に振り分けた。また解析は遺伝子型のわからないよう、ブラインドで行った。

## (3) 腸の mRNA の定量的逆転写 PCR

腸での SLD-Cre (+) 細胞が破壊されているかを確認するため、定量的逆転写 PCR (quantitative Reverse Transcription-PCR) を行った。今回、SLD-Cre (+) 細胞が多く存在するとされる小腸 (回腸) を対象とした。サンプルを採取し、液体窒素による急速凍結後、RNA 分離試薬を用いて RNA 抽出の後、イソプロパノール沈殿による精製を行った。RNA は電気泳動と吸光度測定によってクオリティチェックを行った。その後、逆転写によって cDNA を合成し、リアルタイム PCR を行った。

## 【結果】

(1) SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスの睡眠解析  
睡眠解析の結果、SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスでは特に暗期での睡眠量の増加がみられた。またその変化はゲルタイプのエサを用いたときに著しく、固形細断エサではみられない。



## (2) 腸の mRNA の定量的逆転写 PCR

qRT-PCR の結果、腸においても SLD-Cre (+) 細胞が一部のマウスで破壊されている可能性が示唆された。

## 【考察・展望】

今回の条件で飼育した SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスはエサ条件依存的にレム睡眠量の増加が示唆された。今後、さらに睡眠解析および qRT-PCR のサンプル数を増やして腸での影響をみると共に脳部位や発現時期などを限定することで詳細なメカニズムとレム増加の神経生理的影響を検討していきたい。