

徐波発生機構における海馬の役割

須貝 麻央 (筑波大学 生物学類)

指導教員：本城 咲季子 (筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構)

【背景・目的】

徐波とはノンレム睡眠時においてみられる 0.5~4.0 Hz の脳波であり、大脳皮質において発生する脳波である。しかし、その発生機構の詳細は明らかになっていない。

海馬は睡眠時の記憶統合において重要な役割を果たしていると考えられており、記憶統合の際には徐波と海馬において発生する Sharp Wave Ripple が同期すると考えられているが、海馬がノンレム睡眠時の大脳皮質脳波生成に関与しているかどうかは明らかになっていなかった。近年、ヒトを対象とした実験において両側の海馬を特異的に損傷した患者群ではコントロール群に比べ NREM 睡眠中の徐波睡眠の減少が見られたという報告があった (Spanò et al., 2020)。しかし、齧歯類において両側海馬の損傷と睡眠の特徴との関係を検証したという報告は見つからなかった。

本研究では、齧歯類においても両側の海馬が損傷した場合に NREM 睡眠中の徐波睡眠の減少がヒトと同様に見られるのかを検証した。本研究は、ヒトでは難しい侵襲の実験を行うことのできる齧歯類において海馬と睡眠特徴の関係を明らかにすることで徐波発生機構の解明へ貢献することを目的としている。

【実験方法】

ウイルス注入

実験には生後 90~120 日の C57BL/6J マウスを使用した。マウスの両側の海馬を標的とし、アデノ随伴ウイルス (AAV) を注入した。コントロール群には、ウイルス注入した場所に mcherry を発現するウイルス (CMV-mCherry/CMV-cre)、実験群には mcherry を発現するウイルスと Cre 依存的にアポトーシスを起こすウイルス (CMV-mCherry/CMV-cre/EF1a-FLEX-taCasp3-TEVp)0.5 μ L を 100 nL/min の速度で注入した。

電極手術

脳波測定のため、頭蓋骨に穴を開け、脳表に電極を 4ヶ所 (ground, frontal, parietal, cerebellum) に埋め込んだ。また、覚醒の判定のためにマウスの僧帽筋に電線を差し込んだ。

睡眠の記録と解析

手術による回復を待つため、術後 3~4 日後にレコーディング用ケージにマウスを移動させ、12/12h 明暗サイクルの飲水・摂餌が自由な環境で 1ヶ月間にわたり、脳波と筋電位を記録した。睡眠の解析にはウイルス注入日から 1週間ごと 4週目までの脳波と筋電位の記録を使用し、Matlab により解析を行なった。解析では脳波、筋電位記録を 4秒ごとのエポックで区切り、明期 12時間、暗期 12時間の合計 24時間の睡眠覚醒状態を覚醒、NREM、REM のいずれかと判定した。

脳の免疫組織化学染色

目的の脳領域にウイルスが注入できているのか、目的領域の細胞が除去できているのかを確かめるために免疫組織化学染色を行なった。4%PFA により灌流固定を行なったマウスの脳を 50 μ m でスライスしたものを使用した。神経細胞のみに反応する抗 NeuN 抗体を一次抗体、Alexa488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を二次

抗体として免疫染色を行い、自家蛍光を軽減するために Sudan Black B solution 処理を行なった。

画像解析

海馬の細胞がどの程度除去できているかを調べるために免疫染色後、Axio zoom を用いて撮影した脳切片の画像のうち、ウイルス注入の標的となる脳領域の画像を ImageJ によって解析した。

【結果】

免疫組織化学染色により、両側の海馬にウイルスが注入できていることが観察されたが、海馬の中でもウイルス注入されている場所にばらつきが見られた。実験群においてはウイルス注入場所での細胞の除去が観察され、また海馬全体の縮小が見られた。

脳波についてウイルスを注入してから 1週目と 2週目のデータを解析したところ、parietal EEG においてのみ紡錘波、シータ波にコントロール群と実験群で有意に差が見られた。ノンレム睡眠時に見られる 8~15 Hz の紡錘波は明期、暗期ともに 2週目において実験群に有意に減少がみられた。レム睡眠時に見られる 6~11Hz のシータ波では明期の 2週目、暗期の 1、2週目において実験群が有意に減少していた。

【考察】

parietal EEG でのみ実験群に有意に差が見られたことに関して、今回ウイルス注入を行なった海馬の位置により近い電極で測定された脳波であったために frontal EEG では見られなかった脳波の違いが見られたと考えられる。

2週目の実験群において紡錘波の減少が見られたのは 1週目と比較し、アポトーシスがより進んだ結果である可能性が考えられる。

海馬の神経細胞集団の同期活動によりシータ波が生じることが報告されていることからシータ波が実験群で減少していることは、海馬の神経細胞の減少により神経細胞集団の同期活動が減少したためと考えられ、これまでの実験結果と矛盾しない。

実験群でのデルタ波の減少が有意に見られなかった原因として考えられるのは、ウイルス注入場所のばらつきが挙げられる。また、実験個体数が少なかったこともその影響を大きくした原因だと考えられる。

【展望】

コントロール群、実験群ともに個体数が少ないため、さらに個体数を増やし、実験の信頼性を高める。

海馬領域においてもウイルス注入ができた場所にばらつきが見られた。個体数を増やすことで海馬の中でも特定の領域に絞った解析を行い、徐波に影響を与えた場所をより詳細に調査する。