

マウス大脳皮質におけるノンレム睡眠中の徐波を制御する分子機構の探索

中村 彩希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 本城 咲季子 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

睡眠は、動物に普遍的にみられる必須の生理現象であるが、その神経学的機能や制御機構の多くが未だ明らかになっていない。ヒトやマウスを含む哺乳動物の睡眠は、一般的にレム睡眠とノンレム睡眠に分けられ、脳波の特徴が異なる。睡眠の多くを占めるノンレム睡眠中には、徐波、紡錘波およびシャープウェーブリップルといった波形が見られる。なかでも大脳皮質においてみられる徐波は、高振幅で低周波数 (0.5~4 Hz) の成分で、睡眠時ではノンレム睡眠に特異的にみられる脳波である。これまでに、徐波は覚醒履歴から推定される睡眠圧や記憶の固定との相関が報告されており、睡眠の機能を説明する可能性がある。

徐波をつくる神経活動として、神経細胞群間での膜電位変動の同期が明らかになっている。ノンレム睡眠時の視床および大脳皮質の多くの神経細胞は、膜電位が脱分極していて激しい発火を伴う UP 状態と、過分極していて発火を伴わない DOWN 状態の 2 つの状態を繰り返している。この UP/DOWN 状態が神経細胞群で高度に同期しているために、脳波では振幅の大きな波として観察される。この同期は大脳皮質の広い範囲でみられ、一方で時間的に均一でなく、主に前頭部から後方に向かって伝播することが知られている。

大脳皮質の神経細胞は、覚醒中は常に入力に応じて発火する脱分極状態にあり、ノンレム睡眠中の DOWN 状態、すなわち同期した神経細胞の過分極は、徐波に特異的な現象である。神経細胞の過分極がどのようにして同期して生じるのか、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。

ノンレム睡眠中の DOWN 状態をつくるのは抑制性神経の活動ではなく、興奮性入力の減少による活動低下とする報告 (Timofeev et al., 2001) 以来、UP/DOWN 状態の同期に抑制性神経は関与しないと考えられていた。その後、大脳皮質に広く投射する抑制性神経が他の神経細胞を抑制することによって同期した DOWN 状態が作り出されるとする報告 (Funk et al., 2017) や、視床からの入力を受ける抑制性神経が GABA_B 受容体を介して他の神経細胞を抑制することによって同期した DOWN 状態が作り出されるとする報告 (Hey et al., 2021) があった。しかし、いずれも徐波をつくる UP/DOWN 状態の同期を十分には説明しておらず、他にも未知のメカニズムが存在しうると考えられる。

本研究の目的は、徐波をつくる UP/DOWN 状態の遷移と、その遷移の同期および伝播の分子機構を明らかにすることである。そのためマウス大脳皮質への受容体拮抗剤などの薬剤の局所投与を行い、そのノンレム睡眠中の徐波への影響を解析した。

【材料と方法】

材料

野生型マウス (C57BL/6J) の 12 週齢以降の成熟雄個体を用いた。飼育および薬剤投与実験は 12 時間/12 時間の明暗サイクル、自由行動下で行った。

脳波・筋電図測定および睡眠判定

頭骸骨の前側左右および後側左右の 4 か所に脳波測定用電極を、頸部および顔面 (ヒゲの生えている部分) に筋電図測定用電極を設置し、脳波および筋電図を記録した。脳波および筋電図のデータを用い、明期開始からの 6 時間の睡眠覚醒状態 (覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠) を 4 秒ごとに区切って判定した。

薬剤投与

薬剤の投与には、マウス前頭前野へのリバースマイクロダイアリースを用いた。リバースマイクロダイアリースとは、先端が半透膜のプローブを組織内に埋め、薬剤等の投与物質を溶解した人工細胞外液をプローブ内に還流させることで半透膜を介して細胞外液に物質を投与する手法である。本研究では、プローブをマウス前頭前野に設置して 4 種いずれかの薬剤を溶解した人工脳脊髄液を還流した。自由行動下のマウス前頭前野に局所的に薬剤を投与する目的でこの手法を用いた。薬剤の投与はノンレム睡眠の時間の長い明期開始後 30 分後前後に行い、薬剤を溶解していない人工脳脊髄液の還流をコントロールとした。

投与した薬剤は以下の 4 種である。

- Bumetanide: Na-K-Cl 共輸送体 1 (NKCC1) アンタゴニスト
- DK-AH: 過分極活性化環状ヌクレオチドゲートチャネル (HCN) アンタゴニスト
- CGP55845: GABA_B 受容体アンタゴニスト
- Danegaptide: ギャップ結合修飾因子

脳波の解析

明期開始後 6 時間の脳波をパワースペクトル解析した。さらに、睡眠覚醒状態の判定に基づき、ノンレム睡眠中の脳波から徐波成分を取り出し、解析した。

【結果と考察】

1. 徐波の伝播

コントロールでの 4 極の測定データを用いてノンレム睡眠中の徐波発生タイミングの解析を行ったところ、後側左右では前側左右よりも徐波の発生が平均で数ミリ秒〜十数ミリ秒遅かった。

この結果から、マウスの大脳皮質での徐波の前方から後方への伝播が確認できた。

2. 薬剤投与による徐波の変化

現在、解析を進めているため詳細は発表会にて示す。

【今後の展望】

現時点では、一匹のマウスのみの実験結果であるので、今後さらに複数のマウスで実験を行い、データを増やしていく。

これまでの薬剤投与実験では、薬剤投与による大脳皮質広範の徐波への影響を観察するため、神経活動の総和を捉える脳波での記録を行った。今後、さらに前頭前野の投与部付近の局所レコーディングを行い、薬剤投与によるより局所的な神経活動への影響を観察したい。