

令和 3 年 1 月 31 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860720

氏名 本多隆利

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Cambridge, MA（国名：USA）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

新規レム睡眠異常マウス家系を用いた記憶固定の分子神経基盤の解明3. 派遣期間：平成 30 年 12 月 20 日 ~ 令和 2 年 12 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：Massachusetts Institute of Technology (MIT)部局名：Department of Brain and Cognitive Sciences5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【緒言】

「睡眠」は我々ヒトやマウスを含む脊椎動物から、線虫やショウジョウバエなどの無脊椎動物まで進化的に広く保存された動物行動である一方、その機能や生物学的意義は未だ謎に包まれている。睡眠の基礎生物学における中心課題として、断眠後に不足分を補完するリバウンド睡眠があるように、日々の睡眠量を一定に保つ睡眠恒常性 (sleep homeostasis) があるが、その分子神経メカニズムは十分に明らかにされていない。また、睡眠障害は、気分障害をはじめ様々な精神・神経疾患と密接に関わり、睡眠覚醒制御の破綻は、学習・記憶を含む高次機能や日常的な認知機能にも影響を及ぼす。従って、これら相互関連性の理解を進めることは睡眠医学の側面においても重要課題である。

研究代表者は、睡眠覚醒行動と高次行動の関連を多角的に探るべく、マウスをモデル生物とした網羅的行動テストバッテリーを構築・実施し、その行動表現型の分子神経基盤の追求を分子生物学・遺伝子工学・電気生理学等を組み合わせて進めてきた。本研究期間を通じて、上記テーマと方針に基づいて得られてきた研究成果と遂行状況を以下2つのパートにて示す。

【Part I】

双極性障害 (躁うつ病) における躁病エピソードにおいては、気分の高揚、活動性の亢進、睡眠欲求の減少等が持続的に確認されることが診断基準として挙げられる (American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5*, 2013)。しかし、どのような脳部位や神経細胞集団が躁病エピソードの発症に関わるかなど、その分子神経機序は十分に分かっていない。本研究においては、腹側内側中脳橋 (Ventral Medial Midbrain/Pons: VMP) 領域の γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性神経を特異的に欠損したマウスが躁様行動 (活動量の亢進、抗うつ様行動、抗不安様行動、睡眠量減少等) を呈することを見出した。また、欠損マウスは断眠後のリバウンド睡眠がみられず、VMP 領域の GABA 作動性神経が睡眠恒常性制御に役割を果たしていることが考察される。さらに、躁様行動のうち短眠の表現型についてはドーパミン D2 受容体 (D₂R) を介したメカニズムが関与していることが示唆された。以下に本研究成果の内容を示す。

VGAT-Cre マウスに対して、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) 及びジフテリア毒素フラグメント A (DTA) を用いることで、VMP 領域の GABA 作動性神経を特異的に欠損したマウスを作製した (図 1A・B: VGAT-Cre^{DTA/VMP} マウス: 以下、欠損群)。対照群においては、DTA の代わりにヒト化 *Renilla reniformis* 緑色蛍光タンパク質 (hrGFP) を用いた (図 1B: VGAT-Cre^{hrGFP/VMP} マウス: 以下、対照群)。これらのマウス群に対して、多面的に表現型を評価するために、多種の行動実験を組み合わせた網羅的行動テストバッテリーを構築・実施した。その結果、欠損群はオープンフィールドテストにおいて総移動距離の増加による活動量の亢進を示した (図 1C)。また、尾懸垂試験並びに強制水泳試験においても一貫して不動時間の減少が検出され、欠損群における抗うつ様行動が示唆された (図 1D・E)。社会的行動を解析した結果、欠損群は、空のチャンバーに比べ新奇マウスが設置された区画への選好性が対照群と比べ増加していた (図 1F)。高架式十字迷路においては、オープンアームでの滞在時間が増加しており、欠損群における抗不安様行動とリスクを伴う行動の増加が示唆された (図 1G)。巣作り行動においては、対照群に比べ成績の低下が示された (図 1H)。また、各マウス群の学習・記憶能力の評価を行った。新奇物体認識試験において、対照群においては新奇物体に対する選好性の増加が確認されたが、欠損群においては新奇物体に対する選好性の増加はみられなかった (図 1I)。さらに、作業記憶 (ワーキングメモリー) を評価するために Y 字迷路課題を実施した。欠損群ではアームへの合計進入回数は対照群に比べ増加しており (図 1J 左)、活動量の亢進を示した前述の結果と一貫していた。作業記憶を評価するために自発的交替行動率 (3 回連続で異なるアームに進入した回数の割合を算出) を測定したところ、対照群との差はみられず (図 1J 右)、空間作業記憶能力については正常であることが示唆された。一連の結果は、VMP の GABA 作動性神経が活動量の亢進、抗うつ様行動、抗不安様行動など、報告のある複数の躁病モデルマウス並びに患者の躁病エピソードにおける症状において指標とされる様々な側面に関与していることを示唆する (Logan RW & McClung CA., *Neuroscience*, 2016; American Psychiatric Association, *DSM-5*, 2013; Perry W et al., *Arch. Gen. Psychiatry*, 2009; Yong JW et al., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2007)。

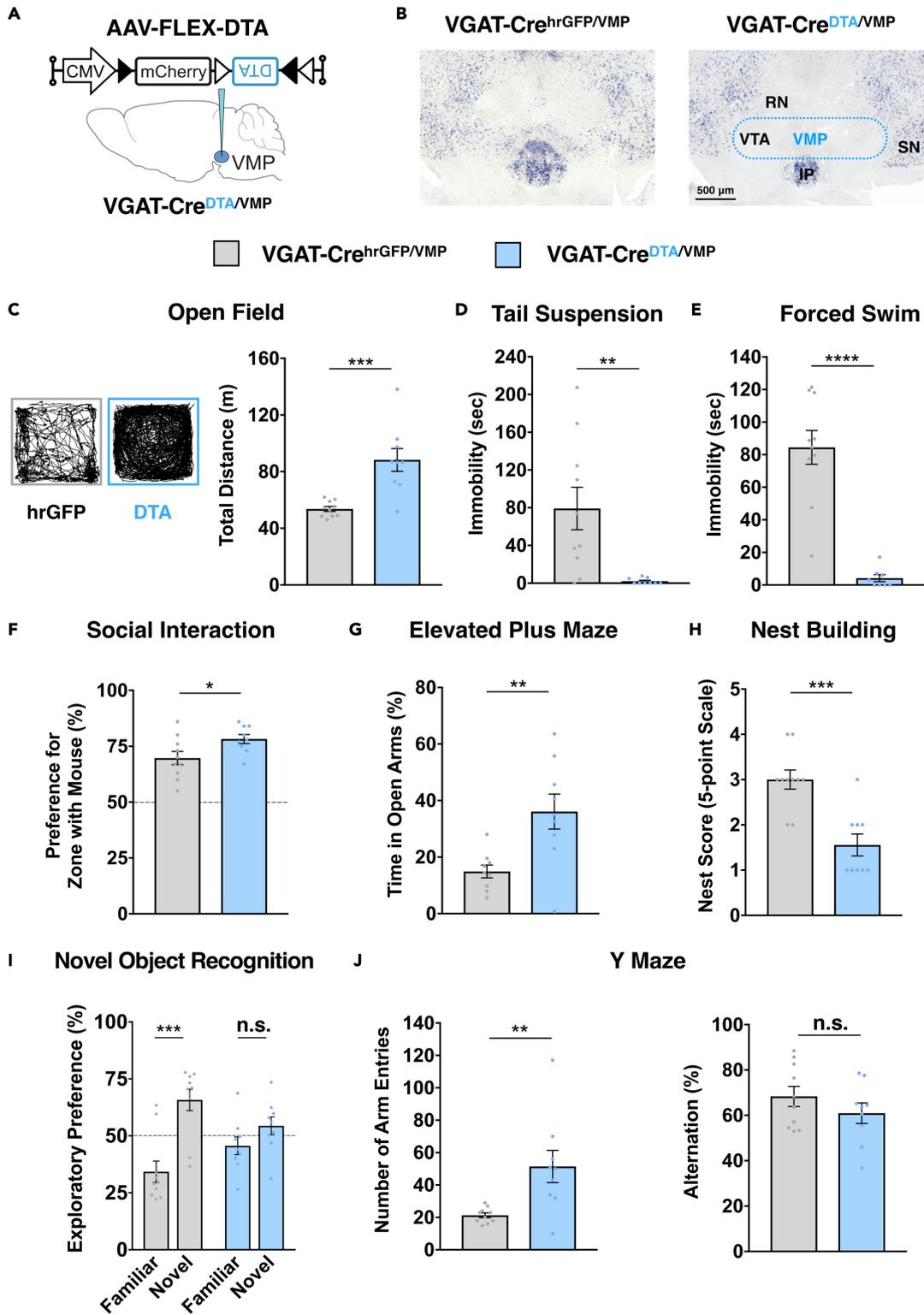


図 1. VMP 領域 GABA 作動性神経の選択的欠損は多動性, 抗うつ様行動, 抗不安様行動等を誘発する

(A) VGAT-Cre マウスの VMP 領域に AAV-FLEX-DTA (欠損群用) あるいは AAV-FLEX-hrGFP (対照群用) を導入。(B) VMP 領域の VGAT mRNA を染色した脳組織切片。RN, red nucleus; VTA, ventral tegmental area; SN, substantia nigra; IP, interpeduncular nucleus. Scale bar, 500 μ m. (C) オープンフィールドテストにおける移動トレースの例と総移動距離。(D) 尾懸垂テストにおける不動時間。(E) 強制水泳テストにおける不動時間。(F) 社会性テストにおける新奇マウスが配置された区域への選好性。(G) 高架式十字迷路テストにおけるオープンアームでの滞在時間。(H) 巣造り行動における 5 段階評価のスコア。(I) 新奇物体認識テストにおける馴染物体あるいは新奇物体に対する選好性。(J) Y 字迷路テストにおける総アーム進入回数と自発的交替行動率。Individual values are plotted in the graphs. Data are presented as the mean \pm SEM. n.s., not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Two-tailed unpaired t test / two-tailed Mann-Whitney U test. 各図の行動テストの方法や順番、統計値等の詳細情報は最終ページ「発表論文 1」を参照。

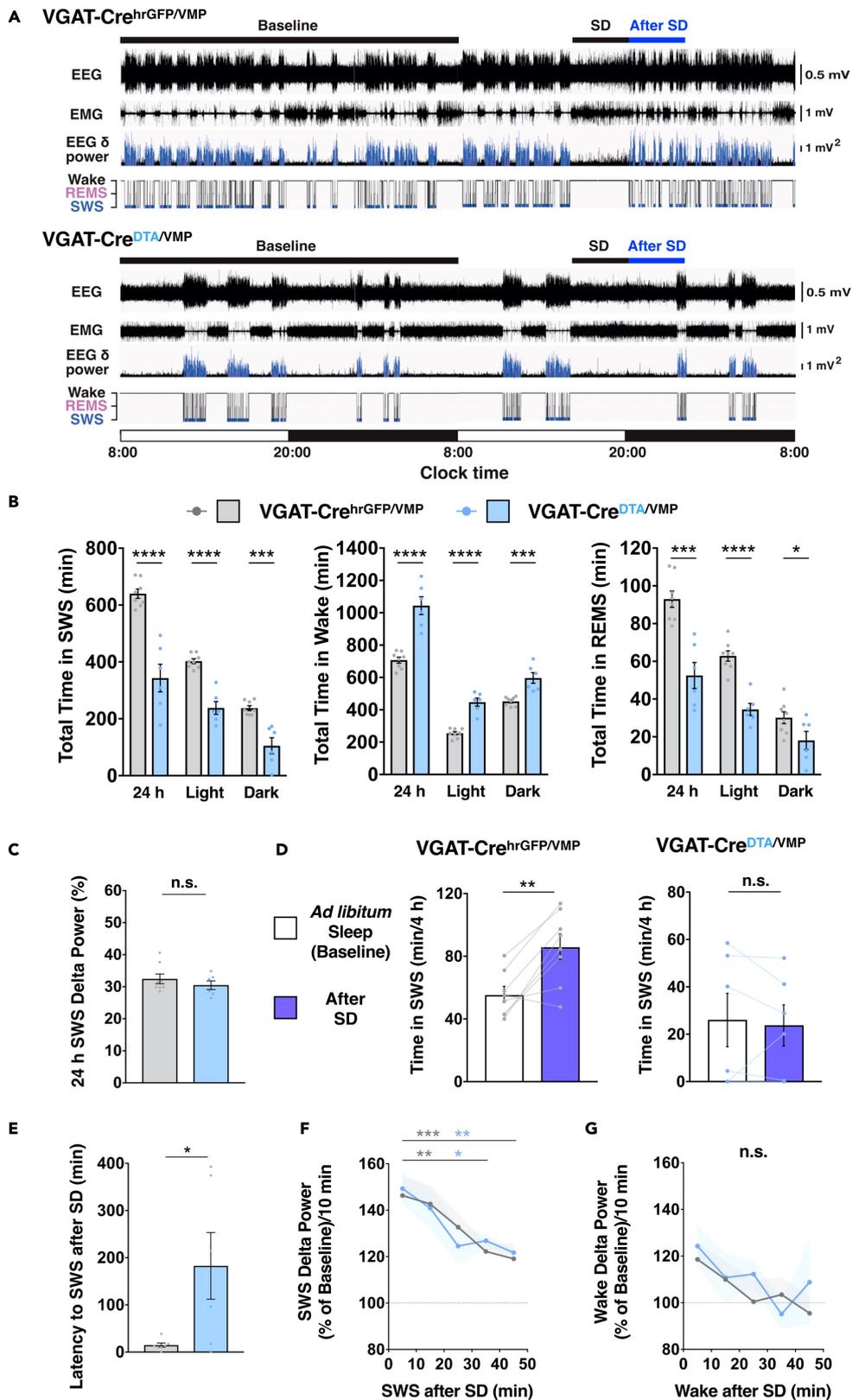


図2. VMP 領域 GABA 作動性神経の選択的欠損は睡眠量の減少とリバウンド睡眠の消失を誘発する

(A) 脳波 (EEG), 筋電図 (EMG), EEG デルタパワー並びに覚醒/徐波睡眠/レム睡眠ヒプノグラムの例. ベースラインと SD (sleep deprivation): 断眠処理. (B) ベースライン 24 時間/明期/暗期における総徐波睡眠/覚醒/レム睡眠量. (C) ベースライン 24 時間における徐波睡眠時の平均デルタパワー(%). (D) 4 時間の断眠処理後のリバウンド睡眠量. (E) 断眠処理後の最初の徐波睡眠エピソードまでの時間 (睡眠潜時). (F) 断眠処理後の徐波睡眠時デルタパワーの時間経過に伴う変化 (24 時間ベースライン時の平均徐波睡眠時デルタパワー絶対値と比較した変化量 (%)). 断眠後にみられた徐波睡眠 10 分間分ごとのデルタパワーの経時変化. (G) 断眠処理後の覚醒時デルタパワーの時間経過に伴う変化 (24 時間ベースライン時の平均覚醒時デルタパワー絶対値と比較した変化量 (%)). 断眠後にみられた覚醒 10 分間分ごとのデルタパワーの経時変化. Individual values are plotted in the graphs. Data are presented as the mean \pm SEM. n.s., not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Two-tailed unpaired t test / two-tailed paired t test / two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons. 各図の統計値等の詳細情報は最終ページ「発表論文」を参照.

活動性亢進や気分高揚といった主要な構成要素に加え、躁病エピソードにおける特徴として睡眠欲求の減少があり (American Psychiatric Association, *DSM-5*, 2013; World Health Organization, *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems: ICD-10*, 2004)、多動性を伴う注意欠如・多動性症 (attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD) 等との区別においても有効である (Marangoni C et al., *Curr. Psychiatry. Rep.*, 2015)。従って、続いて睡眠覚醒行動の詳細な解析を進めた。

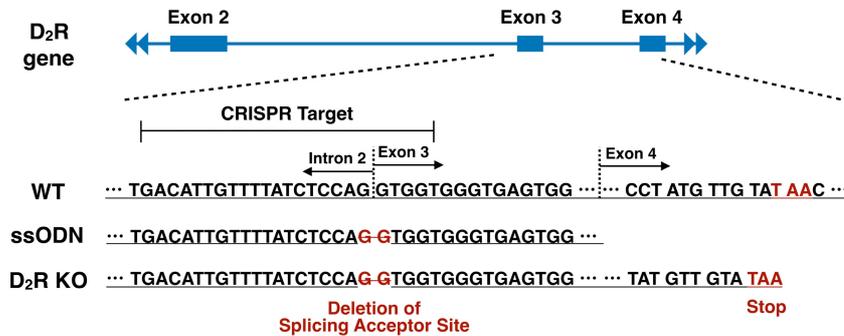
欠損群 VGAT-Cre^{DTA/VMP} マウスにおいては、24 時間・明期・暗期を通じて、徐波睡眠 (slow wave sleep: SWS/ノンレム睡眠) 量が減少、覚醒量の増加、レム睡眠量の減少が確認された (図 2A・B)。脳波 (EEG) はフーリエ変換によって周波数成分に分解することができ、周波数ごとの強さを定量的に算出する処理をスペクトル解析という。このうちデルタ波 (0.5~4 Hz 付近) 帯域成分量は徐波量 (デルタパワー) と呼ばれる。デルタパワーは徐波睡眠中に優位になり、断眠に伴い高まることから、睡眠要求量 (sleep need)・眠気を反映する指標とされ、睡眠負債に深く関わる。徐波睡眠時のデルタパワーの増加は、覚醒状態が長時間続いた後 (Daan S et al., *Am. J. Physiol.*, 1984; Lazarus M et al., *Front. Neurosci.*, 2019) や、日中を通じて睡眠量が増加した変異マウス家系においても確認される (Funato H, ... Honda T, Yanagisawa M et al., *Nature*, 2016; Honda T et al., *PNAS*, 2018)。脳波スペクトル解析の結果、欠損群の徐波睡眠時のデルタパワーは日中を通じて対照群と比べ同等であることが示された (図 2C)。大幅に睡眠量が減少しているものの、徐波睡眠時デルタパワーの増大を伴わないレベルであることから、欠損群においては十分な睡眠量をとれていることが考察される。すなわち、欠損群である VGAT-Cre^{DTA/VMP} マウスは長時間の覚醒状態が続いているにも関わらず、日中を通じて強い眠気に晒されているわけではないことが示唆された。

さらに、断眠 (sleep deprivation : SD) 実験の結果、欠損群である VGAT-Cre^{DTA/VMP} マウスにおいては、対照群で確認されたリバウンド睡眠がみられなかった (図 2D)。これに一貫して、欠損群においては、断眠後、最初に徐波睡眠エピソードに入るまでの時間 (睡眠潜時 : Latency to SWS) が延長していた (図 2E)。一連の結果は、VMP 領域の GABA 作動性神経が日々の睡眠量の制御と断眠応答としての睡眠恒常性制御の両側面に重要な役割を果たしていることを示唆する。続いて、断眠後の徐波睡眠中のデルタパワーの経時変化を解析した結果、両群共に断眠後には増加しており、徐波睡眠時間を経る (徐波睡眠量が積算される) ごとに徐々に減少していくことが示された (図 2F)。すなわち、欠損群は断眠後のリバウンド睡眠 (徐波睡眠の量的変化) みられなかった一方で、断眠後の徐波睡眠中のデルタパワーの増減機構は対照群と同等であることが分かった。両群において見られたこの結果は、徐波睡眠量の制御と徐波睡眠時のデルタパワーの制御は分離可能なメカニズムが存在している可能性も示唆している。また、断眠後の覚醒中には両群共に顕著なデルタパワーの増減は確認されなかった (図 2G)。従って、断眠応答としてのデルタパワーの増加とその後の緩やかな減少は主に徐波睡眠中に機能するシステムであり、途中で挟む覚醒中には停止していることが考察される。

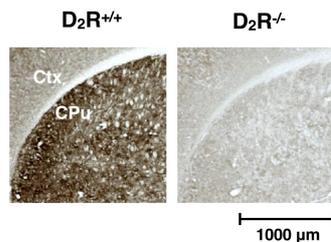
先行研究 (Takata Y et al., *J. Neurosci.*, 2018) における薬理実験から VMP 領域の GABA 作動性神経の欠損・抑制による覚醒促進作用については D₂R 及び/又は D₃R の関与が示唆された点から、本研究で示された一連の躁様行動表現型について D₂R の関与を検証した。VGAT-Cre マウスの受精卵ドナーを用いて、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムにより D₂R 欠損 VGAT-Cre マウス (VGAT-Cre;D₂R^{-/-} マウス系統) を新たに作製した (図 3A~C)。

このマウス系統を用いて D₂R の有無の遺伝的背景のもと、AAV-FLEX-DTA あるいは AAV-FLEX-hrGFP を VMP 領域に導入し、欠損群・対照群の一連の行動解析を進めた。その結果、D₂R かつ VMP GABA 作動性神経を欠損したマウス系統 (VGAT-Cre^{DTA/VMP};D₂R^{-/-}) では、明期における睡眠量減少の表現型がレスキューされ、D₂R 依存性が示された (図 4A~D)。一方で、断眠後の睡眠リバウンドの消失、徐波睡眠潜時の延長、オープンフィールド試験における活動量の増加、尾懸垂試験と強制水泳試験における不動時間減少、の躁様行動表現型については D₂R 非依存的であることが示された (図 4E~I)。

A VGAT-Cre Fertilized Egg Donor



B



C

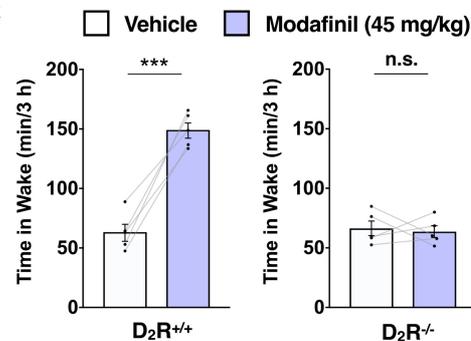


図3. CRISPR/Cas9 システムを用いた D2R 欠損 VGAT-Cre マウス系統 (VGAT-Cre;D2R^{-/-}) の作製

(A) VGAT-Cre マウスの受精卵ドナーを用いた CRISPR/Cas9 法による D2R 遺伝子ノックアウト. PAM 配列を含む CRISPR ターゲット配列 (全 23 bp) は D2R 遺伝子の splicing acceptor (SA) site が位置する Intron 2 と Exon 3 の一部を含む. ssODN, single-stranded oligodeoxynucleotide. (B) D2R 遺伝子ノックアウトの組織学的検証. 抗 D2R 抗体を用いた免疫染色で VGAT-Cre;D2R^{-/-} マウスの脳組織においては D2R シグナルが検出されなかった. Ctx, cortex; CPu, caudate putamen (striatum). Scale bar, 1,000 μ m. (C) D2R 遺伝子ノックアウトの *in vivo* 機能的検証. VGAT-Cre;D2R^{-/-} マウス群においてはモダフィニル投与による覚醒効果がみられなかった. Individual values are plotted in the graphs. Data are presented as the mean \pm SEM. n.s., not significant, *** p < 0.001, Two-tailed paired t test. 各図の統計値等の詳細情報は最終ページ「発表論文」を参照.

欠損群に関する考察として、オープンフィールド試験における活動量の亢進、尾懸垂試験・強制水泳試験における抗うつ様行動、社会的行動における新奇マウスへの選好性の増加は、躁病エピソードの DSM-5 診断基準における「*目標指向性の活動の増加 (increased goal-directed activity)」や「*精神運動焦燥 (psychomotor agitation)」と共通しており (*和名用語は『DSM-5 精神疾患の診断・統計マニュアル』日本精神神経学会 日本語版用語監修 (2014) より引用。以降同様)、多動性や抗うつ様行動は、*Shank3* 過剰発現マウス (Han K et al., *Nature*, 2013) や *GSK3- β* 過剰発現マウス (Prickaerts J et al., *J. Neurosci.*, 2006) といった躁病モデルマウスにおいて報告されている表現型と一貫している。客観的に計測された患者における活動性亢進とドーパミン過剰性モデルの齧歯類における多動を比較評価し定量的に類似性を示したトランスレーショナル研究もなされている (Young JW et al., *Br. J. Pharmacol.*, 2011a; Perry et al., *Arch. Gen. Psychiatry*, 2009; Yong JW et al., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2007)。また、腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) のドーパミン作動性神経の活性化が多動性を誘導することが報告されている (Boekhoudt L et al., *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2016)。VMP 領域は解剖学的に VTA を包含することから (図 1B)、VMP 抑制性ニューロンの欠損により VTA ドーパミン作動性神経への抑制性出力が解除されることで多動に至る可能性もある。従って、VTA の主要ターゲットである側坐核 (nucleus accumbens: NAc) でのドーパミン量の計測等が欠損マウスを用いた実験として今後重要である。高架式十字迷路における抗不安様行動やリスクを伴う行動の増加は DSM-5 診断基準の「*困った結果につながる可能性が高い活動に熱中すること (excessive involvement in activities that have a high potential for painful consequence)」と共通する。リスクを伴う行動は、患者における行動評価とドーパミン過剰性を示すドーパミントランスポーター欠損 (DAT-KO) マウスを用いた橋渡し研究においても報告されている (van Enkhuizen J et al., *Neuropsychopharmacology*, 2014; Young JW et al., *J. Psychopharmacol.*, 2011b)。営巣行動における成績低下は、診断基準における「*注意散漫 (distractibility)」の側面を反映していると考察される (American Psychiatric Association, DSM-5, 2013; World Health Organization, ICD-10, 2004; Oltmanns TF, *J. Abnorm. Psychol.*, 1978)。

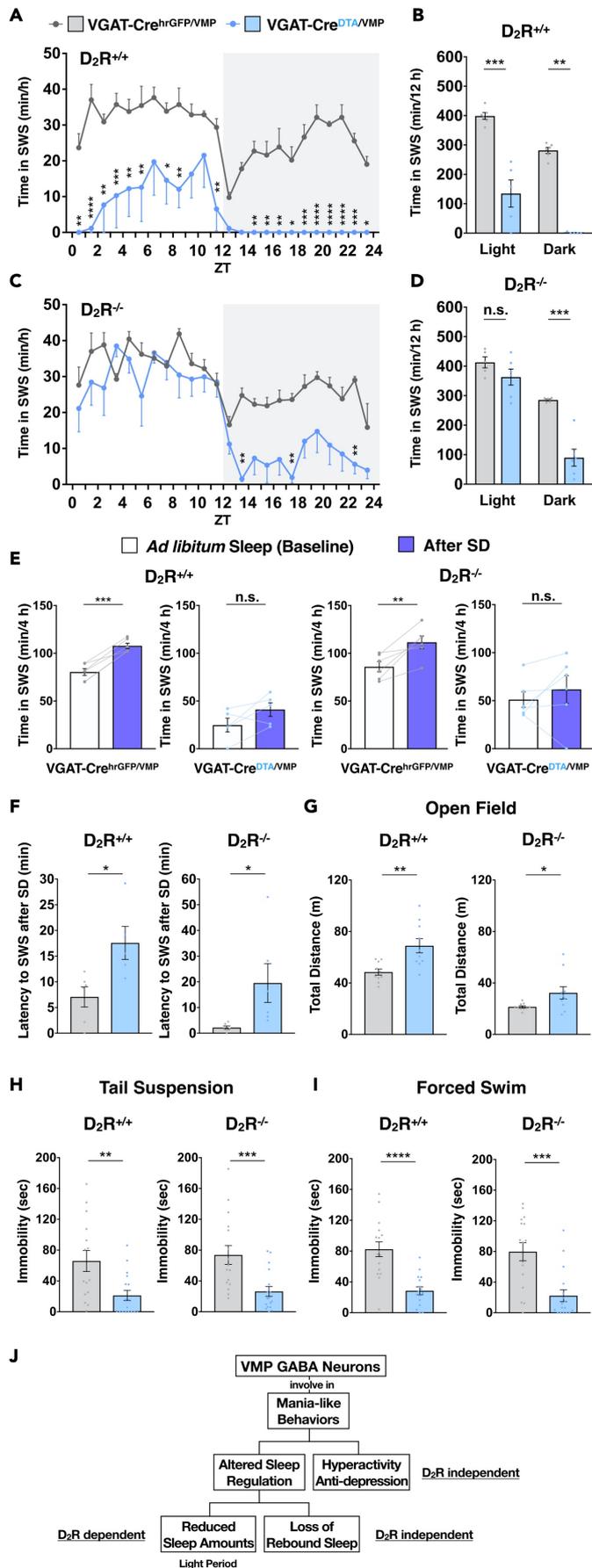


図 4. ドーパミン D₂R が VMP 領域 GABA 作動性神経の選択的欠損による睡眠量の減少に関与する

$D_2R^{+/+}$ あるいは $D_2R^{-/-}$ 遺伝的背景の VMP 領域 GABA 神経欠損群と対照群における (A)・(C) 1 時間ごとの徐波睡眠量. (B)・(D) 明期/暗期における徐波睡眠量. (E) 断眠処理後のリバウンド睡眠量. (F) 断眠処理後の徐波睡眠潜時. (G) オープンフィールドテストにおける総移動距離. (H) 尾懸垂テストにおける不動時間. (I) 強制水泳テストにおける不動時間. (J) VMP の GABA 神経は多動性, 抗うつ様行動, 短眠等の躁様行動の表出に関わる. 短眠は D₂R の関与が示唆された. Individual values are plotted in the graphs. Data are presented as the mean \pm SEM. n.s., not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Two-tailed unpaired t test / two-tailed paired t test / two-tailed Mann-Whitney U test / two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons. 各図の統計値等の詳細情報は最終ページ「発表論文」を参照.

躁病エピソードの出現が、学習・記憶や認知機能にどのような影響を及ぼすかについては未だ十分に分かっていない。本研究においては、欠損群は新奇物体認識において成績が低く異常がみられた。一方、Y字迷路課題における自発交替行動は正常であったことから、直前に進入したアームの位置をワーキングメモリとして記憶・参照し、異なるアームを選択できていることが示唆される。Y字迷路課題とは異なり、新奇物体認識試験は1日目の見本段階と2日目のテスト段階から構成され、マウスが睡眠時間を十分に確保できる24時間のインターバルを挟む。断眠処理や睡眠の遮断が、睡眠時の記憶固定化を阻害し、新奇物体認識試験における成績低下を導くことが報告されており (Palchykova S et al., *Learn. Mem.*, 2006; Rolls A et al., *PNAS*, 2011)、欠損群における睡眠量の減少が新奇物体認識試験におけるパフォーマンスに影響を及ぼしていることが考察される。

欠損群における大幅な睡眠量の減少は、DSM-5 診断基準における「※睡眠欲求の減少 (decreased need for sleep)」と一貫しており、躁病モデルマウスとして研究が進んでいる *Clock19* 変異マウス (Naylor E et al., *J. Neurosci.*, 2000; Logan RW & McClung CA., *Neuroscience*, 2016) とも共通している。睡眠恒常性に関して、睡眠前の経験・行動によっては眠気や睡眠圧を克服できる例が知られており、例えば、ケージ交換による環境変化を伴う断眠は、穏やかに触れることによる断眠 (gentle handling) に比べ睡眠潜時を延長し、リバウンド睡眠の減少を示す (Suzuki A et al., *PNAS*, 2013)。欠損群における断眠後の睡眠リバウンドの消失については、VMP の GABA 作動性神経が断眠に応答した睡眠状態の構築に重要であるか、あるいは、欠損で誘発された覚醒時の行動によって断眠に伴う睡眠圧を克服している可能性も考えられる。

本研究では VGAT-Cre; D₂R KO マウスを作製し、欠損群での明期での睡眠量減少 (覚醒促進) における D₂R 依存性を示した。ドーパミンと D₂R は睡眠を抑制し覚醒促進に働いていることが示唆されている (Oishi Y & Lazarus M, *Neurosci. Res.*, 2017; Oishi Y et al., *Brain Struct. Funct.*, 2017; Qu WM et al., *J. Neurosci.*, 2008, 2010)。この点から、VMP 領域の GABA 作動性神経はドーパミン神経系と D₂R を抑制することで、過剰な覚醒量の増加を防いでいると考察される。一方、VMP 領域の GABA 作動性神経がどのドーパミン神経系回路に抑制的に作用しているかは不明瞭であるため、今後理解を進めることが重要となる。近年、VTA の GABA 作動性神経から視床下部外側野 (lateral hypothalamus: LH) への投射が明らかになり (Taylor SR et al., *J. Comp. Neurol.*, 2014; Yu X et al., *Nat. Neurosci.*, 2019)、同領域において覚醒維持に重要なオレキシン神経への投射も報告された (Chowdhury S et al., *eLife*, 2019)。VTA の GABA 作動性神経から LH への入力を光遺伝学的に活性化させると覚醒が抑制されることが示された (Chowdhury S et al., *eLife*, 2019; Yu X et al., *Nat. Neurosci.*, 2019)。また、LH における反復電気刺激が多動性等の躁様行動を誘発する報告もあり (Abulseoud OA et al., *Int. J. Bipol. Disord.*, 2014)、LH 領域が VMP 領域の GABA 作動性神経欠損による躁様行動の表出において役割を果たしていることも考えられる。

本研究により、VMP 領域の GABA 作動性神経は一連の躁様行動 (活動量の亢進、抗うつ様行動、抗不安様行動、睡眠量減少等) の表出に関わり、睡眠量の減少については、D₂R 依存的なドーパミン神経系を介したメカニズムが関与していることが示唆された (図 4J)。VGAT-Cre^{DTA/VMP} マウスにおいては断眠後のリバウンド睡眠が失われていた点から、VMP 領域の GABA 作動性神経は正常な睡眠恒常性制御を保つ上で重要な役割を担うと考えられる。将来的に VGAT-Cre^{DTA/VMP} マウスや VMP 領域と関連脳領域に着目した更なる研究を通じて、双極性障害 (躁うつ病) の病態メカニズムや睡眠恒常性制御の分子神経機序の両側面において、より詳細な理解が進むことが期待される。

研究代表者は、筆頭著者・責任著者として本成果をまとめ、本研究成果は論文投稿・査読を経て、Honda T et al., “Ablation of Ventral Midbrain/Pons GABA Neurons Induces Mania-like Behaviors with Altered Sleep Homeostasis and Dopamine D₂R-mediated Sleep Reduction”. *iScience*, 23(6):101240 (2020) にて掲載された。本研究内容に関する更なる詳細情報については、原著論文を参照 (関連項目: 最終ページ「発表論文」・「謝辞」)。

【Part II】

睡眠時の脳では、様々な周波数のオシレーションを介した情報処理が多様な脳領域ネットワーク間において生じている。脳広領域におけるオシレーションは、神経細胞集団の周期的な同期活動を反映しており、徐波睡眠時のデルタ波（0.5～4 Hz 付近）やレム睡眠時のシータ波（6～9 Hz 付近）といった特徴的な脳状態を織り成す。異なる睡眠ステージにおいて、脳領域間の特定のオシレーションを介した情報伝達が学習・記憶をはじめとする高次機能にいかに関与しているかの理解を進めることは重要である。後述する高時間分解能で自由行動下／睡眠時の長期的な神経活動計測を実現する多細胞同時記録法のアプローチによって、局所回路や領域ネットワーク間の情報動態を捉えることが可能となる。また、領域ネットワーク間の相互作用やオシレーション・同期活動に着目したアプローチは、学習・記憶障害や精神・神経疾患の病態理解においても新たな知見を提供できると考えられる。研究代表者は、異なる脳状態（徐波睡眠／レム睡眠／覚醒／安静覚醒／課題遂行時等）において、動的に変化する局所回路の神経細胞集団活動と脳領域間を行き交うダイアログがいかなる情報を表現・符号化し、処理・伝達しているのか、また、その動態を支える分子神経基盤の理解を深めることを長期的に目指している。本プロジェクトにおいては、睡眠と学習・記憶の両側面、並びにオシレーション制御に関与する可能性のある新規睡眠制御遺伝子とその遺伝子変異マウス家系に着目した研究を進めてきた。

研究代表者はこれまでにフォワード・ジェネティクスに基づく新規睡眠覚醒制御遺伝子の探索研究に取り組んできた（Funato H, ... Honda T, Yanagisawa M et al., *Nature*, 2016; 本多 & 柳沢, *医学のあゆみ*, 2017; Honda T et al., *PNAS*, 2018）。その過程で我々はレム睡眠時間が顕著に減少し断片化した *Dreamless* 変異マウス家系を樹立した。責任遺伝子 *Nalcn* は非選択的陽イオンチャンネル NALCN をコードしており、原因の *Dreamless* 変異は膜貫通ドメイン内のアミノ酸置換を伴いレム睡眠異常を引き起こす。*Nalcn* 遺伝子欠損マウスは生後直後に呼吸障害による致死性を伴うことから（Lu B et al., *Cell*, 2007）、個体レベルでの NALCN の生理学的機能は十分に明らかにされていない。*Dreamless* 変異マウス家系は覚醒量と徐波睡眠量は正常であることから、レム睡眠の機能を探る上で有効なモデルと言える。マウスの脳波はレム睡眠に移行するとシータ波（6～9 Hz 付近）が観察されるが、*Dreamless* 変異マウス家系は徐波睡眠・レム睡眠時に顕著にシータ波帯域成分量（シータパワー）が減少していた。また、研究代表者は前述の網羅的行動テストバッテリー（Honda T et al., *iScience*, 2020）をベースに展開し、多角的に *Dreamless* 変異マウス家系の行動表現型を解析したところ、特徴的な表現型として海馬依存的な学習・記憶に異常があることが示唆された。そこで本研究では、*Dreamless* 変異マウス家系における学習・記憶表現型とその神経回路メカニズムを追求する中で、レム睡眠が学習・記憶に果たす役割や、NALCN チャンネルがシータ波等を介したオシレーション制御や情報処理にいかに関与しているのかの理解を目指している。

マウスにおいて内側中隔（medial septum: MS）からの海馬（hippocampus: HPC）への GABA 作動性神経による入力をレム睡眠時特異的に光遺伝学的に抑制することで海馬でのシータ波成分量が減弱し、海馬依存的なタスクにおいて成績低下がみられることが報告されている（Boyce R et al., *Science*, 2016）。*Dreamless* 変異マウス家系においては、レム睡眠時の脳波（EEG）におけるシータパワーの減少、海馬依存的な課題での学習・記憶障害の側面から、MS-HPC 回路におけるシータ波を介した相互作用と情報伝達様態に着目した。合わせて、脳深部における各領域の局所回路レベルでのシータ波帯等成分量の変化や、時空間的発火パターンを観察することを目的とした。この目的のために、MS と海馬 CA1 両領域の座標に特化した構造のマイクロドライブを新たに設計・作製した（図 5A・B：作製したマイクロドライブと作製工程。マイクロドライブは自由行動下／睡眠時の多細胞同時記録を可能にする多数の微小電極を実装した駆動装置）。機体部分は 3D プリンタにより出力し、細胞外記録用の微小電極束であるテトロード（四極管）を作製・装填した（図 5A・B：最大 64 チャンネルの同時記録が可能）。テトロードを装填したマイクロドライブは約 2 g と軽く、マウス頭部への装着後も負担が少なく自由に行動できる。装着手術後の回復期間の後に両領域に時間をかけて徐々にテトロードを下ろすことで自由行動下／睡眠時を通じて慢性細胞外記録を可能にした。

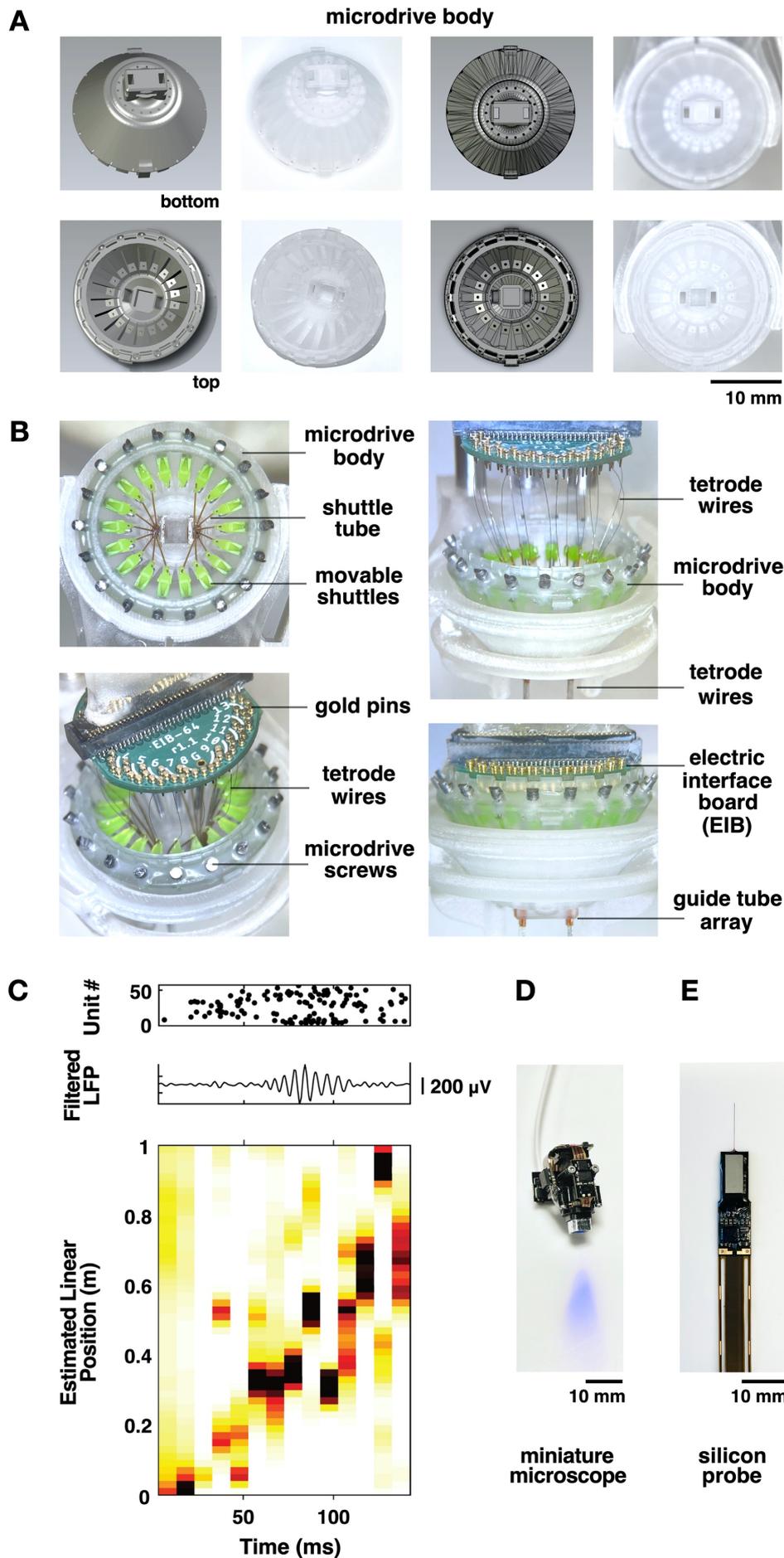


図 5. (A) MS-HPC 回路を標的としたマイクロドライブの設計と 3D プリンタで出力した機体部分. Scale bar, 10 mm. (B) マイクロドライブの作製工程と各構成部品. テトロドを充填したマイクロドライブの全体図. (C) 徐波睡眠時リプレイの例. Filtered (150 Hz–250 Hz) LFP for detection of hippocampal SWR events. Darker shades indicate higher probabilities. (D) 小型蛍光顕微鏡 (Miniscope) 全体図. Scale bar, 10 mm. (E) シリコンプローブ (Neuropixels probe) 全体図. Scale bar, 10 mm.

この技術を用いた各領域のマルチニューロン記録と局所フィールド電位 (local field potential: LFP) 記録により、発火タイミングやシータ波位相との関係性を評価、特にレム睡眠時の MS-HPC 間のシータ波位相固定・同期性に着目した解析を進めている。特定の覚醒/睡眠ステージにおける位相の揃い具合・干渉のしやすさを示すコヒーレンス (coherence) 値の算出や、相互相関解析等、観測データを定量的に評価する解析を検討している。また、*Dreamless* 変異マウス家系においては、空間記憶形成において認識精度が低く、広がりのある場所受容野 (place field) が形成されている可能性もあることから、空間探索時の海馬 CA1 領域の場所細胞 (place cell) の活動記録とその応答性についても合わせて調べていく。

研究代表者のアドバイザーである Wilson 博士らは、テトロードを用いた多細胞同時記録により、課題遂行中にみられた海馬の場所細胞の神経活動パターンがその後の徐波睡眠時に繰り返されることを示した (Wilson MA & McNaughton BL, *Science*, 1994 : 覚醒学習時に同時に活動した神経細胞間の相関が徐波睡眠時においても保持されていた)。この再活性化現象はリプレイ (replay) と呼ばれ、睡眠が記憶の固定化に果たす役割を示唆した重要な例と言える。

本プロジェクトにおいても、前述のマイクロドライブを用いた海馬 CA1 領域での多細胞同時記録とスパイク情報に基づいた Bayesian decoding (ベイズ推定に基づくデコーディング) により、空間迷路課題後の睡眠時・覚醒安静時のリプレイ解析を進めている (図 5C : 野生型マウスにおける徐波睡眠中のリプレイの例。徐波睡眠時や安静覚醒時に海馬で観測される 150~250 Hz 付近のリップル波 (sharp wave ripple: SWR) に合わせてみられる。課題遂行時に比べ、徐波睡眠中は時間的圧縮がみられる点の特徴)。これらの一連のアプローチを軸に学習・記憶表現型とその神経回路機序を多角的に追求していく。

また、新たに立ち上げ進めてきたプロジェクトとして、小型蛍光顕微鏡 (図 5D : miniature microscope) による自由行動下の神経活動のカルシウムイメージングと、現時点では脳波 (EEG) ・筋電図 (EMG) 計測を組み合わせ、様々な脳状態 (学習課題遂行時/覚醒/安静覚醒/徐波睡眠/レム睡眠 等) の海馬や皮質における多様な表象 (representation) について、機械学習アルゴリズムに基づく解析による探索研究に取り組んでいる。この実験系についても、変異マウス家系を用いた覚醒・睡眠時の脳内表象の解析に応用可能である。また、多点同時記録を目的とした異なる技術的アプローチとして、シリコンプローブ (図 5E) の運用も進めており、本研究においても状況に応じて導入を検討する。前述のテトロードを用いた多細胞同時記録法と合わせて、一連の技術と解析方法は、今後も適材適所で研究・実験目的に応じて使い分け・組み合わせていく。

本研究期間を通じて、継続的な神経活動の記録が可能な機器装置一式・実験系の立ち上げと運用、その後の解析を含むパイプラインの構築を重点的に進めることができた。現在用いている電気生理学的手法や計算論的神経科学に基づく手法等は、様々な脳領域間ネットワークや局所脳部位における情報処理・動態解析、時空間的活動パターン解析や符号化された情報の解読等において軸となるアプローチであり、研究目的に応じて将来的に多岐の応用・展開が可能である。

【謝辞】

日本学術振興会海外特別研究員事業による本助成をいただきましたことに深く御礼申し上げます。ご助言・お力添えいただいているマサチューセッツ工科大学 (MIT) Wilson 研究室の皆様、また、筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構 (WPI-IIIIS) 柳沢/船戸研究室並びに Lazarus/大石研究室の皆様をはじめ、共同研究者の方々に深く感謝の意を表します。上記研究機関に加え、記載内容は、テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター (UTSW Medical Center) ・筑波大学トランスオーダー医学研究センター/生命科学動物資源センター・東邦大学医学部との共同研究を含みます。

【発表論文：2018年～2020年】

1. **Honda T**^{*}, Takata Y, Cherasse Y, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Funato H, Yanagisawa M, Lazarus M^{*}, Oishi Y^{*}. Ablation of Ventral Midbrain/Pons GABA Neurons Induces Mania-like Behaviors with Altered Sleep Homeostasis and Dopamine D₂R-mediated Sleep Reduction. *iScience*, 23(6):101240 (2020)
^{*}Corresponding author
2. Park M, Miyoshi C, Fujiyama T, Kakizaki M, Ikkyu A, **Honda T**, Choi J, Asano F, Mizuno S, Takahashi S, Yanagisawa M, Funato H. Loss of the conserved PKA sites of SIK1 and SIK2 increases sleep need. *Scientific Reports*, 10(1):8676 (2020)
3. Yasugaki S, Liu CY, Kashiwagi M, Kanuka M, **Honda T**, Miyata S, Yanagisawa M, Hayashi Y. Effects of 3 Weeks of Water Immersion and Restraint Stress on Sleep in Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 13:1072 (2019)
4. **Honda T**, Fujiyama T, Miyoshi C, Ikkyu A, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Funato H, Yanagisawa M. A single phosphorylation site of SIK3 regulates daily sleep amounts and sleep need in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41): 10458-10463 (2018)
5. Komiya H, Miyoshi C, Iwasaki K, Hotta-Hirashima N, Ikkyu A, Kanno S, **Honda T**, Gosho M, Hamada H, Satoh T, Fukamizu A, Funato H, Yanagisawa M. Sleep/Wake Behaviors in Mice during Pregnancy and Pregnancy-Associated Hypertensive Mice. *Sleep*, 41(3) (2018)

【受賞等：2018年～2020年】

1. 井上科学振興財団 井上研究奨励賞 (2020)
2. 日本神経科学学会 時実利彦記念神経科学優秀博士研究賞 (2019)
3. 第68回リンダウ・ノーベル賞受賞者会議 (生理学・医学) 最優秀賞 (1st Prize) (2018)
4. 第43回日本睡眠学会 ベスト・プレゼンテーション賞 (2018)

(その他・備考欄)

派遣期間中、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の深刻な感染拡大の影響により、米国の受入先機関においても対策として ramp down が実施され、研究室での実験を含む学内での研究活動に著しい制限を伴った。これに伴い、日本学術振興会からの通知「新型コロナウイルス感染症の影響に伴う海外特別研究員採用者への特例措置」における最長 3 ヶ月間の期間延長の対象となった。2021 年より他財団からの助成をいただく予定であった点を踏まえ、2020 年内までを上記措置による延長期間として設定させていただいた。

各国の採用者の様々な状況をご配慮いただき、迅速に柔軟な各種措置のご準備を進めてくださいました日本学術振興会海外特別研究員事業の関係者の方々にこの場を借りて重ねて深く御礼申し上げます。