



Title	睡眠覚醒回路の解明に向けたペプチド性神経伝達物質の同定
Author(s)	神田, 元紀
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56093
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (神 田 元 紀)	
論文題名	睡眠覚醒回路の解明に向けたペプチド性神経伝達物質の同定 Identification of peptidic neurotransmitters for understanding sleep/wake neural circuits
論文内容の要旨 ヒトをはじめとした多くの動物は睡眠を必須とするもののその制御機構、特に総量制御（ホメオスタシス）については未知の部分が数多く残されている。睡眠を司る脳回路の解明にはまず構成因子の同定が必要である。構成因子の実体となりうる神経伝達物質はアミノ酸、モノアミン、ペプチドの3つに大別できる。特にペプチドはアミノ酸やモノアミンと異なり、発現部位や発現時間が限局していることが多く睡眠覚醒回路を紐解く際にも良い手がかりになると考えられる。そこで本研究では睡眠ホメオスタシスを司るペプチドを同定することを目的とした。候補ペプチドとして、大脳皮質のGABA作動性ニューロン（介在ニューロン）に発現するペプチドに着目した。一般に睡眠にはGABAによる抑制性神経伝達が重要であることが知られている。中でも介在ニューロンはその下流の興奮性ニューロンを制御することで個体行動を制御していると言われている。一方で介在ニューロンではGABA以外にもソマトスタチン（SST）やニューロペプチドY（NPY）などの神経性ペプチドが発現しており、神経伝達物質として作用している可能性が示唆されているものの、個体行動に与える機能は未だにわかっていない。そこで本研究ではこの介在ニューロンに発現するペプチドであるSST、NPYおよびコレシストキニン（CCK）に着目し、これらのペプチドが睡眠ホメオスタシスを制御している、と仮説をたてその検証を行った。 1. 大脳皮質における<i>Sst</i>、<i>Npy</i>、<i>Cck</i>発現細胞はGABA作動性ニューロンである 介在ニューロンがGABA作動性であり、そのマーカー遺伝子である<i>Sst</i>、<i>Npy</i>、<i>Cck</i>が発現していることは古くから知られているものの、<i>Sst</i>、<i>Npy</i>、<i>Cck</i>発現細胞全てがGABA作動性ニューロンであるかどうかは自明ではなかった。TAI-FISH（tyramide-amplified immunohistochemistry-fluorescence <i>in situ</i> hybridization）法を用いてペプチド発現細胞の特徴を解析したところ、<i>Sst</i>、<i>Npy</i>発現細胞はほぼ全てがGABA作動性ニューロンであることが確認できた。<i>Cck</i>発現細胞は多くがGABA作動性ニューロンであるものの、少数の細胞がグルタミン酸作動性ニューロンである可能性が示唆された。 2. 大脳皮質における<i>Sst</i>、<i>Npy</i>発現細胞中の<i>c-fos</i>発現細胞数割合は夜間に上昇する これらのペプチド発現細胞が睡眠制御に寄与するためには、ニューロンとしての活動があることが求められる。また、1日のうちで特定の時間に多く活動している時間帯が存在し、ノックアウト変異体においてその時刻特異的な睡眠量の加減が認められれば、本仮説は強く支持されうる。<i>c-fos</i>の発現を神経活動の積分値として捉え、それぞれのペプチドが<i>c-fos</i>と共発現するのか、また、共発現する細胞数が時系列で変動しうるかどうかをTAI-FISHを用いて検証したところ、<i>Sst</i>発現細胞における<i>c-fos</i>の共発現細胞数割合が夜間に有意に増加していた。<i>Npy</i>発現細胞においては<i>c-fos</i>の共発現細胞数割合について明け方にピークをもつ概日振動をしている部位が観察された。 3. <i>Sst</i>、<i>Npy</i>、<i>Cck</i>ノックアウトマウスでは睡眠量が有意に減少する CRISPR/Casを用いて<i>Sst</i>、<i>Npy</i>、<i>Cck</i>それぞれのノックアウトマウスを作製し、Snappy sleep stager（SSS、Sunagawa et al. <i>Cell Rep</i> (2016)）を用いて睡眠表現型解析を行ったところ、全てのノックアウトマウス系統において1日の睡眠時間の有意な減少が認められた。このとき、<i>Sst</i>、<i>Npy</i>ノックアウトマウスについては共に睡眠時間の減少がそれぞれ夜間、明け方に観察されており、先のTAI-FISHの結果と一致した。 以上により、<i>Sst</i>、<i>Npy</i>発現細胞はその発現細胞は特定の時刻に神経活動が活発であり、ノックアウト変異体においてはその時刻周辺で睡眠量が有意に減少したことから、<i>Sst</i>、<i>Npy</i>は睡眠覚醒回路の構成因子であると考えられる。また、睡眠量の減少はともに覚醒から睡眠に遷移する確率の減少に由来するものであり、<i>Sst</i>、<i>Npy</i>は覚醒から睡眠への遷移を担う因子であると推察される。また、<i>Cck</i>においても、ノックアウト変異体においては睡眠量が有意に減少したことから、<i>Cck</i>が睡眠覚醒回路の構成因子であることが示唆された。今後は、コンディショナルノックアウトマウスやウイルスを用いた実験による作用部位の同定やさらなる表現型の解析が望まれる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (神 田 元 紀)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	特任教授	柳 田 敏 雄
	副 査	教 授	山 下 俊 英
	副 査	教 授	吉 森 保

論文審査の結果の要旨

睡眠・覚醒リズムは多くの動物で極めて重要な機構であるもののその制御機構、特に総量制御（ホメオスタシス）については未知の部分が数多く残されている。本研究は睡眠覚醒回路を紐解く第一歩として、ホメオスタシスに寄与するペプチドを逆遺伝学的手法により同定したものである。本論文では、介在ニューロンに発現するペプチドの睡眠覚醒機構への寄与を仮説として提唱し、脳スライスを用いた組織化学実験および候補遺伝子のノックアウト変異体の作製を通してその検証を行っている。見いだした3つのペプチドはそのノックアウト変異体の睡眠時間が野生型に比べてそれぞれ1.4 S.D.（70.2分）、1.0 S.D.（52.6分）、2.4 S.D.（122分）短いという極めて顕著な睡眠表現型を示している。本論文が示す結果は、その神経回路の同定という基礎研究に留まらず、新規睡眠薬の標的を提示しうる社会的にも重要な知見である。

以上により、本論文の申請者が博士（理学）の学位授与に値するものと判断する。