

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

哺乳類における睡眠制御を介した中枢性老化制御メカニズム (19-13)

主任研究者 佐藤 亜希子 国立長寿医療研究センター 中枢性老化・睡眠制御研究プロジェクトチーム (プロジェクトリーダー)

研究要旨

近年、視床下部が哺乳類の老化・寿命を制御する上位中枢の一つであることが申請者を含む複数の研究グループにより明らかにされてきた。以後、哺乳類の老化・寿命の階層的支配の制御形態が注目されてきている。老化現象を多臓器間で相互関連性のある一つのシステムの破綻と捉えると、この破綻は上位中枢である視床下部の機能低下が引き金となり、全身性の機能低下へと繋がることが示唆される。従って、視床下部神経の老化に伴う形質的变化や生理学的機能低下のメカニズムを解明することは、老化・寿命の本質的なメカニズムを理解する上で重要である、と考えられる。そこで、本研究課題では、視床下部の **PR-domain containing protein 13 (PRDM13)**陽性神経細胞の睡眠制御機序に着目し、睡眠調節を介した老化寿命機構について解明している。初年度は、*Prdm13*ノックアウトマウスを用いた解析から、視床下部背内側核 PRDM13 神経が老化に伴う睡眠形態変容の制御に関与していることを明らかにした。また、視床下部背内側核 PRDM13 陽性神経細胞の神経細胞としての特徴や投射先も解明した。

主任研究者

佐藤 亜希子 国立長寿医療研究センター 中枢性老化・睡眠制御研究プロジェクトチーム (プロジェクトリーダー)

分担研究者

なし

A. 研究目的

本研究課題では、加齢に伴う睡眠変化、そして、これらに対する食餌制限の作用機序を明らかにすることを目的として、以下の研究を進めていく：1) 食餌制限の睡眠恒常性機能

改善作用における、視床下部 PRDM13 陽性 GABA 作動性神経の役割とその分子学的特徴を解明する。2) 介在ニューロン GABA 作動性神経の老化に伴う機能変化が、睡眠断片化に及ぼす影響を検討する。3) 慢性的な睡眠障害（制限）が、脳及び全身の生理学的機能に及ぼす影響を検討する。

## B. 研究方法

*Prdm13* 遺伝子領域を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子座を持つマウス (*Prdm13* floxed マウス) と NKX2-1 神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現しているマウス (*Nkx2-1* CreERT2 マウス) を交配し、3ヶ月齢でエストロゲン誘導体タモキシフェンを5日間連続腹腔内投与することで Cre リコンビナーゼを誘導させ、loxP で挟まれた *Prdm13* を欠損させた。これにより、成体において視床下部背内側核特異的に *Prdm13* を欠損したノックアウトマウス (*Prdm13*-KO マウス) を作製した。定常状態および食餌制限下において、*Prdm13*-KO マウスの睡眠解析を脳波/筋電図計測から実施した。

また、PRDM13 神経の機能解析を進めるため、*Prdm13*-CreERT2 マウスを作製した。まず、*Prdm13*-CreERT2 マウスと *Gt(ROSA)26Sor* 遺伝子座に CAG プロモーター、2つの loxP 配列に挟まれた転写停止配列、蛍光タンパク質 ZsGreen1 がノックインされたマウスを交配し、PRDM13 神経細胞を ZsGreen1 標識することで脳内の局在部位を確認した。加えて、*Ef1a* プロモーター下に2つの loxP 配列 (lox2272, loxP) に挟まれた状態

(doublefloxed inverted open-reading-frame, DIO) で逆向きに蛍光タンパク質 EYFP が挿入された遺伝子を、*Prdm13*-CreERT2 マウスの視床下部背内側核に、アデノ随伴ウイルス (AAV) により直接注入した。これにより、Cre 依存的に PRDM13 神経から順行性に投射先を同定した。さらに、免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーションにより、PRDM13 神経の特徴を検討した。

*Prdm13*-KO マウスの加齢に伴う機能変化を評価するため、体重、身体活動量、睡眠を若齢、中年齢、老齢時に計測した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト試料を対象とする研究は実施しなかった。すべての研究に関わる動物実験は、実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、動物実験倫理委員会による承認を受けた後、適切に実施した。

## C. 研究結果

1) 食餌制限の睡眠恒常性機能改善作用における、視床下部 PRDM13 陽性 GABA 作動性神経の役割とその分子学的特徴を解明する、および、2) 介在ニューロン GABA 作動性

神経の老化に伴う機能変化が、睡眠断片化に及ぼす影響を検討する、について。

睡眠解析から、*Prdm13*-KO マウスが老化に伴う睡眠恒常性機能低下や睡眠の断片化促進など、老化に伴う睡眠の変容を模倣していることを見出した。また我々は、老化に伴う睡眠の変容が食餌制限により改善され、この食餌制限の作用には、PRDM13 が必須である知見を得た。これらの結果から、視床下部背内側核 PRDM13 神経が老化に伴う睡眠形態変容の制御に関与しており、且つ、可逆的な老化に伴う睡眠変化の制御に関与していることが示された。また、PRDM13 神経細胞が ZsGreen1 標識されたマウスモデルの解析から、PRDM13 神経が視床下部背内側核に高発現していることを見出した。また、視床下部背内側核 PRDM13 神経の投射先として睡眠制御に関与する視床下部や脳幹の神経核が同定された。この結果から、老化に伴う睡眠の変容は、睡眠制御に関与する神経ネットワークの制御を介して調節されている可能性が示唆された。加えて、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、視床下部背内側核 PRDM13 神経細胞に発現している神経伝達物質、輸送担体、または神経ペプチドを同定した。

3) 慢性的な睡眠障害（制限）が、脳、及び全身の生理学的機能に及ぼす影響を検討する、について。

*Prdm13*-KO マウスの加齢に伴う機能変化については、現在も検討中であるが、プレリミナリーデータとして、対照群と比較して、*Prdm13*-KO マウスでは体重の有意な増加が認められた。

#### D. 考察と結論

視床下部背内側核 NKX2-1 神経には GABA 作動性神経が豊富に含まれることから、*Prdm13*-KO マウスの睡眠表現型は、主に PRDM13-GABA 神経を介して制御されていることが予想される。現在、睡眠制御に関与する神経ネットワークの中で、*Prdm13*-GABA 神経がどのように機能するのか、オプトジェネティクス的手法により解明しようとしている。

一方、視床下部における *Prdm13* 発現量が低いことから、これまでは、*in vivo* システムでの PRDM13 の機能解析が困難であった。その為、現在、*Prdm13*-PA Tag マウス (*Prdm13* の C 末端に LG3 linker-PA tag をノックインしたマウス) も作製した。このマウスモデルを用いて、今後、更に、PRDM13 神経の機能解析と分子作用機序の解明を進めていく。

先述の結果から、*Prdm13*-KO マウスは、老化に伴う睡眠形態の変容を模倣しているマウスモデルであることが示唆される。そこで、*Prdm13*-KO マウスに認められる加齢により生じる機能変化は、慢性的な睡眠障害に起因するのではないかと考えている。*Prdm13*-KO マウスにおいて、後発的に顕著な機能的および基質的な変化を示す末梢臓器を見出し、更にその臓器の睡眠制御への関与も解析中である。既に、マウスモデルを用い、睡眠の断片化を抑制することが個体寿命延長に繋がることを報告している (Yoshida *et al. Cell Metab.* 2019)。したがって、*Prdm13*-KO マウスの長期的な機能解析 (健康寿命) に加え、個体寿

命への影響も考慮し、現在、検討中である。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 佐藤亜希子. 哺乳類サーチュイン SIRT1/SIRT6 を介した寿命制御機序. **特集：老化のバイオロジー**. 老年医学 57:781-785, 2019

2) Zhang B, Guo D, Han L, Rensing N, Satoh A, Wong M. Hypothalamic orexin and mechanistic target of rapamycin activation mediate sleep dysfunction in a mouse model of tuberous sclerosis complex. Neurobiol. Dis. 134:104615, 2019

3) 佐藤亜希子, 中村和弘. 睡眠と体温調節能の老化変容における視床下部神経回路の役割. 基礎老化研究 43:23-28, 2019

4) Yoshida M, Satoh A, Lin JB, Mills KF, Sasaki Y, Rensing N, Wong M, Apte RS, Imai SI. Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. Cell Metab. 30:329-342.e5, 2019

##### 2. 学会発表

1) 佐藤亜希子. 老化に伴う睡眠形態の変容と末梢臓器への影響について. 第19回日本抗加齢医学会総会 若手プログラム 2 分子メカニズムからメタボリックドミノに挑む, 2019-6-15, 横浜

2) Akiko Satoh. DMH neurons control sleep, metabolism, and aging. NIPS international workshop “Sensing food/nutrient/environment toward integrative metabolic regulation”, July 7-8, 2019, Okazaki

3) Akiko Satoh. DMH neuron-mediated co-regulation of sleep and aging. Gordon Research Conference on Biology of Aging, July 14-19, 2019, Newry, ME USA

4) Akiko Satoh. DMH neuron-mediated co-regulation of sleep and aging. Special Seminar at Washington University School of Medicine, July 22, 2019, St. Louis, MO USA

5) 佐藤亜希子. 老化に伴う睡眠形態の変容と末梢臓器への影響について. 第9回認知症予防学会学術総会 HOT TOPICS, 2019年10月18日、名古屋

6) 佐藤亜希子. 哺乳類の睡眠および老化・寿命の共通制御メカニズムの解明. Diabetes Hybrid Seminar (MSD 社主催), 2019年11月22日、東京

7) Akiko Satoh. Age-associated sleep alterations and its impacts on aging. Annual RIKEN Aging Project Meeting 2020, January 20-21, 2020, Kobe

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし