

アストロサイトによるシナプス貪食に着目した睡眠不足が老化を誘導する機序の解明
(19-44)

主任研究者 辻 将吾 国立長寿医療研究センター 流動研究員

研究要旨

睡眠不足が老化につながることを示唆されているが、その機序に関しては未だ不明な点が多い。一方で近年、睡眠不足がアストロサイトによるシナプス貪食を誘導することが報告されている。本研究ではこの報告に着目し、慢性的な睡眠不足が、アストロサイトの性質変化につながり、その結果アストロサイトが本来担っている機能の喪失、ひいては認知機能など個体としての機能低下につながるという仮説を立て、これを検証する。具体的には、①アストロサイトに貪食を誘導する睡眠条件の検討、②持続的なシナプス貪食の誘導がアストロサイト自体に及ぼす影響の解析、③シナプス貪食誘導因子の検討、④アストロサイトによる貪食が睡眠、及び老化に与える影響の検討、を行う。これらの実験によって、睡眠、アストロサイト、老化の関係性を明らかにすることを目指す。

主任研究者

辻 将吾 国立長寿医療研究センター 流動研究員

A. 研究目的

睡眠の量的、又は質的な不足が様々な生理的機能低下をもたらすことが知られている。例えば、長期に覚醒がつづき、睡眠欲求が高い状態になると認知機能は低下する。慢性的な睡眠不足は認知症、糖尿病、心血管疾患などの老齢疾患のリスクを上昇させる。また、睡眠の質の維持が寿命延長に寄与する可能性があることも報告されている。これらの事象から、睡眠不足が老化につながることを示唆されるが、その機序に関しては不明な点が多い。

近年、アストロサイトの機能と、老化および睡眠との間に相関関係があることが複数報告されている。例えば、老化に関連して、老齢マウスの海馬アストロサイトにおいては神経新生促進因子 *Wnt3* の産生が低下することが報告されている (M. Okamoto *et al.*, *FASEB J.*, 2011, 25, 3570-82)。また、加齢によりアストロサイトで細胞老化マーカー

p16^{INK4a}の発現が上昇し、それが認知機能の低下に繋がることが報告されている(T. J. Bussian *et al.*, *Nature*, 2018, 562, 578-582)。これらのことは、加齢に伴ってアストロサイトの性質が変様することを示唆している。一方で、睡眠不足によりアストロサイトによる脳シナプスの貪食が促進されることが報告されており(M. Bellesi *et al.*, *J. Neurosci.*, 2017, 37, 5263-5273)。睡眠不足がアストロサイトの性質変様をもたらすことが示唆される。これらの事象から申請者は、慢性的な睡眠不足によって、アストロサイトに貪食が持続的に誘導されることが、不可逆的なアストロサイトの性質変化につながり、その結果アストロサイトが本来担っている機能の喪失、ひいては認知機能など個体としての機能低下につながるのではないかと考えた。

本研究では上記の考えに基づき実験を行い、アストロサイトと、睡眠、老化との関係に関して知見を得ることを目的とする。これは睡眠による老化制御機序の解明につながると考えた。

B. 研究方法

① アストロサイトに貪食を誘導する睡眠条件の検討

1日あたりの睡眠時間や、睡眠制限の日数が異なるマウスにおけるアストロサイトの貪食能を比較することで、睡眠条件とアストロサイトの貪食能との関係を調べる。貪食能の評価は、脳からアストロサイトを ACSA-2 分子を認識する抗体を用いて単離した後、RNA を回収し、貪食に関与する遺伝子群の発現量を qRT-PCR で定量することで行う。

② 持続的なシナプス貪食の誘導がアストロサイト自体に及ぼす影響の解析

成体マウス脳からアストロサイトを単離、培養する。また、マウス脳からシナプトソームを遠心法により回収し、培養アストロサイトに添加することで貪食を誘導する (W. S. Chung *et al.*, *Nature*, 2013, 504, 394-400)。貪食の評価は、蛍光標識したシナプトソームの細胞内への取り込み量をフローサイトメーターで定量することで行う。貪食を誘導しつつ長期培養した際に、アストロサイトにどのような変化が生じるかを調べる。具体的には、貪食能、細胞老化マーカーの発現、分泌物、神経伝達物質の取り込み量、などの変化を解析する。

③ シナプス貪食誘導因子の検討

自由睡眠、又は睡眠制限状態のマウスから回収したシナプトソームを、培養アストロサイトに添加した際の貪食量を比較し、シナプス状態の変化が、睡眠不足時に生じる貪食増加の原因なのかを評価する。また、睡眠不足時にはシナプスタンパク質全体のリン酸化レベルが上昇することが報告されている (Z. Wang *et al.*, *Nature*, 2018, 558, 435-439)。そこで、リン酸化処理、又は脱リン酸化処理を施したシナプトソームでの貪食誘導能を比較することで、シナプスタンパク質のリン酸化が貪食の誘起に関与しているかを評価する。また、週齢

の異なるマウスでも実験を行い、加齢による影響に関しても検討する。

④ アストロサイトによる食食が睡眠、及び老化に与える影響の検討

睡眠の不足がアストロサイトの食食を増強することは報告されているが、逆に食食作用が睡眠に及ぼす影響は不明である。また食食の増減が老化に影響するかも明らかではない。これらに関して知見を得るため、アストロサイトによる食食に重要な役割をもつ遺伝子である *Megf10* をアデノ随伴ウイルスベクターによりアストロサイト特異的に発現、あるいはノックダウンすることで、食食能を増減させたマウスを作製する。このマウスにおける睡眠の量、質的变化を脳波/筋電位を測定し評価する。また、認知機能や、代謝能、身体活動量などを測定することで老化に及ぼす影響を評価する。

(倫理面への配慮)

本申請に関して、申請者の属する施設 (NCGG) ではヒト試料を対象とする研究は実施していない。一方、すべての研究に関わる動物実験に関しては実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえて的確に管理、実施した。さらに、今後脳特定領域を標的としたモデルマウス、あるいは初代培養細胞への一部の遺伝子導入実験は国立長寿医療研究センター遺伝子組換え実験委員会、ならびに動物実験倫理委員会による承認を受けた後、適切に実施する。その他、移動等を伴う遺伝子組換え体の扱いについてはカルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組換え生物等の使用に規則による生物多様性の確保に関する法律」に従って遂行する。

C. 研究結果

本年度は、まず、①アストロサイトに食食を誘導する睡眠条件の検討、に関連して、マウスに睡眠制限を施した際のマウスの反応を観察した。睡眠制限はマウスが睡眠の兆候を示した際に、マウスに軽く触れることで覚醒させるという方法で行なった。マウスが睡眠期になる明期の始まりから睡眠制限を施した。睡眠制限の開始から時間が経過するにつれて、マウスに入眠の兆候がより高頻度に現れる様子が観察された。また、睡眠制限の開始から4時間程度経過した時点で、頻繁に入眠の兆候が観察されるようになった。

また、②持続的なシナプス食食の誘導がアストロサイト自体に及ぼす影響の解析、③シナプス食食誘導因子の検討、に関連して、マウスからのアストロサイトの単離、培養法の確立を試みた。単離の方法として、アストロサイト標識に用いられる抗 ACSA2 抗体と磁気ビーズとの結合体を使用した磁気細胞分離法を用いた。しかし、現在のところアストロサイトの単離率、生存率が低く、培養法の確立には至っていない。

D. 考察と結論

①アストロサイトに貪食を誘導する睡眠条件の検討に関して、マウスの睡眠制限を施した際の反応から、睡眠不足状態での脳を解析するためには、4時間程度の睡眠制限を施すことが適当であると示唆された。今後さらに、睡眠制限後のマウスからアストロサイトを単離し、貪食関連遺伝子の発現量を定量することで、より詳細に睡眠条件の検討を進める。得られた条件を元にアストロサイトによる貪食作用がもつ生理的な役割を明らかにしていく予定である。

また、②持続的なシナプス貪食の誘導がアストロサイト自体に及ぼす影響の解析、③シナプス貪食誘導因子の検討、に関しては、アストロサイトの培養方法が確立できていない。アストロサイト単離の前段階として、脳を回収後、細胞を解離、分散し、細胞集団を取得するが、この集団に細胞以外のデブリが多数混入していることが低い単離率、生存率の原因ではないかと考えている。そのため、遠心操作によるデブリの除去を検討しているところである。その他の諸条件に関しても最適化を行うことで、高効率なアストロサイト培養が可能になるのではないかと考えている。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。