

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。昨年度までに、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、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。本年度は、視床下部背内側核 PRDM13 陽性神経細胞には、GABA 作動性神経とグルタミン酸作動性神経が混在した細胞群であることが明らかにされた。加えて、PRDM13 神経上には様々な神経ペプチドが発現しており、その共局在部位は、神経ペプチドにより異なる特徴があることが明らかとなった。さらに、Prdm13-KO マウスにおいて、加齢に伴う顕著な機能的および基質的な変化を示す末梢臓器として白色脂肪組織の他にいくつかの臓器・組織を同定した。

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

様々なモデルマウス (*Prdm13*-KO マウス、食餌制限マウス、睡眠制限マウス、老齢マウス)を用いて Electroencephalogram (EEG)と electromyogram (EMG)を計測し、SleepSignにより semi-automatic に睡眠解析を行った。また、Wheel-running test は身体活動量の計測に用いた。また、RNA1 分子を検出することのできる高感度な *in situ* ハイブリダイゼーション法である RNAscope を用い、脳切片上の遺伝子発現を解析した。さらに、モデルマウスから 4%パラホルムアルデヒド灌流固定後に組織を採取し、パラフィン包埋切片を作製、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い組織形態像について比較した。組織画像の解析には ImageJ を用いた。

(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。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。

これまで、*Prdm13*-KO マウスを作製し、睡眠解析から *Prdm13*-KO マウスが老化に伴う睡眠変化を模倣していることを見出した。また我々は、老化に伴う睡眠変化が食餌制限により改善され、この食餌制限の作用には、PRDM13 が必須の役割を持つことを示す知見を得た。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変化の制御に関与しており、且つ、可逆的な制御系に関与していることが示された。また、PRDM13 神経の機能解析を進め、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。

さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法から、*Prdm13* 陽性神経は GABA 作動性神経とグルタミン酸作動性神経が混在した細胞群であることが明らかにされた。加えて、*Prdm13* 陽性神経上には様々な神経ペプチド (*cholecystokinin*, *glucagon-releasing peptide*, *pro-melanin-concentrating hormone*) が発現しており、その共局在領域は、神経ペプチドにより異なりそれぞれ特徴があることが明らかとなった。この中で、*cholecystokinin* と *Prdm13* は背内側核において同一神経細胞上に発現しており、且つ、睡眠負荷により活性化される PRDM13 陽性神経細胞の半数以上が存在する背内側核の内側に半数以上局在していた。

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。

DMH-*Prdm13*-KO マウスにおいて、加齢に伴う顕著な機能的および基質的な変化を示す末梢臓器の一つとして白色脂肪組織を見出した。perigonadal 白色脂肪組織の組織重量は老齢 DMH-*Prdm13*-KO マウスにおいて重く、また、HE 染色像から白色脂肪細胞の直径が有意に大きいことが示された。鼠径部の皮下白色脂肪組織においても同様の組織像が観察された。白色脂肪組織の他にも、老齢 DMH-*Prdm13*-KO マウスと老齢コントロールマウスで有意な差が認められる組織があることを見出した。一方、摂餌量は老齢 DMH-*Prdm13*-KO マウスと老齢コントロールマウスで有意な差は認められなかった。Wheel-running test により、老齢 DMH-*Prdm13*-KO マウスの身体活動量が老齢コントロールマウスよりも顕著に低下していることが示された。

D. 考察と結論

これまでの結果は、視床下部背内側核 PRDM13 神経が老化に伴う睡眠変化の制御に関与しており、且つ、可逆的な制御系に関与していることを示している。背内側核 PRDM13 神経には GABA 作動性神経だけではなくグルタミン酸作動性神経も含まれ、複数の神経細胞種が混在した神経細胞群であることが明らかとなった。一方、睡眠負荷に反応する神経細胞が背内側核の内側に高局在していることから、この神経細胞群がどちらの神経細胞に属するのか、検討する予定である。加齢に伴う睡眠変化に関与する神経投射についてもあわせて検討し、神経ネットワークを明らかにしようとしている。

老齢 DMH-*Prdm13*-KO マウスでは体重の有意な増加が認められるが、今回の解析結果から、その一因として白色脂肪組織の蓄積が示唆された。白色脂肪組織重量の増加に加えて組織像解析から白色脂肪細胞の直径が増加していることが示されたことから、脂肪細胞が肥大化されていることが示された。そのメカニズムが神経系の制御なのか、または液性因子を介した制御なのかについては、今後の課題である。また、摂餌量の増加は認められないため、エネルギー代謝との関係についても今後の課題である。身体活動量が老齢

DMH-Prdm13-KO マウスで顕著に減少していることから、PRDM13 欠損による慢性的な睡眠障害により老化現象が加速されていることが示され、老化過程で PRDM13 活性もしくは発現量を維持することが、睡眠形態を維持し老化現象を遅延することが示唆された。そこで現在、視床下部 PRDM13 の発現量もしくは活性を調節する、睡眠形態を制御し且つ食餌制限で賦活化される因子の同定を行なっている。最終年度には、マウス実験で同定された因子がヒト血液中で、加齢や睡眠変化に伴いどのような動態を示すかを検討する予定である。この解析から、マウス実験で同定された睡眠・老化制御因子が、ヒトにおける加齢に伴う睡眠変化や視床下部機能変化の指標となりうるのかを検証する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 辻将吾, 佐藤亜希子: 哺乳類における睡眠、老化、寿命の中枢性制御機構. 細胞 52:4-7, 2020.
- 2) 佐藤亜希子: 哺乳類における中枢性の老化・寿命制御機序 健康寿命の延伸と病のない余生を考える. 生体の科学 71:1-7, 2020.

2. 学会発表

- 1) Shogo Tsuji, Cynthia S. Brace, Ruiqing Yao, Yoshitaka Tanie, Nicholas Rensing, Seiya Mizuno, Kazuhiro Nakamura, Satoru Takahashi, Michael Wong, Shin-ichiro Imai, Akiko Satoh: PRDM13-positive neurons regulate age-associated pathophysiology, and longevity through sleep homeostasis in mammals. 2020 Cold Spring Harbor meeting: Mechanisms of Aging (Virtual), September 22-25, 2020 (selected oral presentation).

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