

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告（総合報告）

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 特任研究員

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、睡眠不足が、アストロサイトの性質変化を誘導し、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、睡眠、アストロサイト、老化の関係性に関して検証した。その結果、睡眠の量的不足時に起きるアストロサイトによるシナプス貪食は、加齢した場合にも若齢時と同程度起きることがわかった。また睡眠の質的な低下はアストロサイトによる貪食に影響しないことが示唆された。

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

研究期間 2019年4月1日～2021年3月31日

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。一方で近年、アストロサイトの機能と、老化および睡眠との間に関連があることが複

数報告されている。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。また加齢によりアストロサイトで細胞老化マーカーp16<sup>INK4a</sup>の発現が上昇するが、そのような細胞老化様アストロサイトを除去することで認知機能の低下が抑制され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誘導されることで、アストロサイトの老化につながり、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。そこで本研究ではアストロサイトと、睡眠、老化との関係に関して知見を得ることを目的とした。

## 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

睡眠制限を施した際のマウスの様子を観察することで睡眠の不足具合を推察した。また、睡眠制限を施し睡眠不足状態にしたマウスでのアストロサイトの貪食能を調べた。貪食能の評価は、アストロサイトを含む画分からタンパク質を回収し、貪食能のマーカータンパク質である MERTK の発現量をウエスタンブロットで解析することで行った。睡眠状態の違いによる貪食能への影響を調べた。

### ②睡眠不足による貪食能の増加が加齢による影響を受けるかの検討

若齢および老齢のマウスに対して睡眠制限を施し、アストロサイトでの貪食マーカータンパク質の増加の程度を比較した。

### ③睡眠の質の低下が貪食能に影響するかの検討

これまでに睡眠の量的な低下がアストロサイトに貪食を誘導することは報告があったが、睡眠の質的な低下がアストロサイトの貪食にどう影響するかは不明である。睡眠の質の低下を示す指標として睡眠の断片化程度が用いられる。当研究室では視床下部に高発現している遺伝子 Prdm13 をノックアウトしたマウス(Prdm13-KO マウス)において、睡眠の断片化がおこるということを見出している。そこで Prdm13-KO マウスを睡眠の質が低下したマウスのモデルとし、貪食能をコントロールマウスと比較した。

### 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

睡眠の不足がアストロサイトの貪食を増強することは報告されているが、逆に貪食作用が睡眠に及ぼす影響は不明である。また貪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、アストロサイトを培養し、シナプトソームを貪食させた際にアストロサイトにどのような変化が起きるか調べることを試みた。

(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確実に管理、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

### ①アストロサイトに食食を誘導する睡眠条件の検討

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入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。そこで、4時間の睡眠制限を施した後、大脳皮質を採取し、アストロサイトを含むシナプトソーム画分を回収した。シナプトソーム画分からタンパク質を抽出し、食食マーカータンパク質 **MERTK** の発現量をウエスタンブロットで解析した。その結果、睡眠制限を施した群では通常睡眠群と比べて、**MERTK** の発現量が増加しており、4時間の睡眠制限によって食食能の増加が誘導されていることが示唆された。

### ②睡眠不足による食食能の増加が加齢による影響を受けるかの検討

①で認められた食食能の増加が、マウスの加齢によって影響を受けるかを検討するため、若齢(7ヶ月齢)および老齢(27ヶ月齢)のマウスに対して4時間の睡眠制限を施し、シナプトソーム画分中の **MERTK** の発現量をウエスタンブロットで定量した。その結果、睡眠制限によって、老齢マウスにおいても若齢マウスと同程度の **MERTK** 発現量の増加が認められた。このことから、睡眠制限時に誘導される食食能の増加の程度は、加齢した際にも変化しないことが示唆された。

### ③睡眠の質の低下が食食能に影響するかの検討

**Prdm13-KO** マウス、およびコントロールマウスを自由睡眠下で飼育し、睡眠期である明期に、シナプトソーム画分タンパク質を回収、**MERTK** 発現量を定量、比較した。その結果、**MERTK** 発現量に有意な差は認められなかった。この結果から睡眠の質的な変化はア

astrocyteによる食食には影響しないことが示唆された。

#### 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

成体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、アストロサイトの単離率、生存率が低く、実験に使用することはできなかった。アストロサイト選別の前段階として、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、遠心操作によるデブリの除去を行なったが改善はみられなかった。結果として培養アストロサイトを用いた食食評価実験系の確立には至らなかった。

#### D. 考察と結論

本研究においても、睡眠の量を制限したマウスでは、アストロサイトによる食食が増加することが確認された。また、その増加の程度は加齢したマウスの場合でも若齢のマウスの場合と比べて顕著な変化はないことが明らかになった。加齢したマウスでは細胞老化様のアストロサイトが増加していると考えられることから、アストロサイトは細胞老化しても食食反応性を保持していると推察できる。

睡眠の量的な低下がアストロサイトによる食食を増加させる一方で、睡眠の質的な低下は食食への影響は認められなかった。しかし、本研究では自由睡眠下での比較を行なったため、マウスがより長時間の睡眠をとり、睡眠の質的低下が補われてしまった可能性がある。睡眠の量が制限されるような状態においては、睡眠の質による影響があることも考えられる。

#### 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。