

長寿医療研究開発費 2021年度 総括研究報告（総合報告）

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（21－8）

主任研究者 佐藤 亜希子 国立長寿医療研究センター 統合生理学研究部（副部長）

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ている。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。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、以下の研究目的を立案し、実施した：1) 食餌制限の老化性入眠潜時延長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の解明。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の検討。3) 長期的な就寝後2時間睡眠制限が、脳及び全身の生理学的機能に及ぼす影響の検討。本課題の遂行により、老化に伴う睡眠障害の予防及び治療だけではなく、老化関連疾患や全身の老化現象を遅延させる新規のインターベンションに繋がることが期待される。加えて、哺乳類の老化・寿命制御における脳の役割は研究者が大きな関心を寄せている研究対象であり、脳が新規の視床下部特異的シグナル伝達系を介して老化と睡眠を制御するその共通メカニズムを明らかにすることは、生命科学の研究対象として大きな関心を呼ぶことが期待される。実験動物を用いた研究では、倫理面に十分に配慮した。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

主任研究者

佐藤 亜希子 国立長寿医療研究センター 統合生理学研究部（副部長）

※研究開始当初より研究者に変更があった場合には、それぞれいつの年度に研究を行った研究者が分かるように記載すること。年度途中に変更があった場合には「(〇〇年〇月〇〇日～〇〇年〇月〇〇日)」と記載しても差し支えないこと。

研究期間 2019年4月1日～2022年3月31日

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、以下の研究目的を立案し、実施した：1) 食餌制限の老化性入眠潜時延長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の解明。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の検討。3) 長期的な就寝後2時間睡眠制限が、脳及び全身の生理学的機能に及ぼす影響の検討。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

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。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。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。その結果、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、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。これらのマウスを用い、様々な生理学的機能解析を行った。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

(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。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

C. 研究結果

研究目的 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、最近我々は、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ている。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-CreERT2 マウスを用いて Cre 依存的に PRDM13 神経から順行性に投射先を同定した結果、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、PRDM13 神経の機能解析の中で、免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーションにより、PRDM13 神経が GABA 作動性神経であることを明らかにした。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示唆された。実際にパッチクランプ法で PRDM13 神経の電気生理学的特徴を測定したところ、介在神経様の膜容量が示された。食餌制限における睡眠改善作用は Prdm13-KO マウスでは消失することから、Prdm13 が食餌制限の作用を発揮する上で必須の分子であることが示された。また、Prdm13 神経活性は老齢マウスで増加していることから、こういった神経の過興奮抑制が食餌制限の作用に関与している可能性が考えられた。

研究目標 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。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た。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、と考え実験を進めた。その結果、Prdm13-KO マウスにおいて、加齢に伴い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た。これにより、慢性的な睡眠障害により末梢臓器の機能が低下することが示唆された。複数の長寿マウスモデルでは睡眠断片化といった老齢マウスの睡眠変化が抑制されていることを報告している。本研究課題における Prdm13-KO マウスの長期的な機能解析は、背内側核神経が健康寿命と個体寿命制御に関与する可能性を指示している。

また、睡眠の断片化は睡眠と覚醒が切り替わる頻度が増加する状態であり、老化に伴いヒトやマウスにおいて認められる睡眠構造の変化である。最近の研究から、マウスにおいて慢性的に睡眠制限や睡眠の断片化により末梢臓器の機能に変化が及ぼされることが報告されている。例えば、睡眠制限により脳脊髄液と脳間質液中のタウ量およびタウ病変拡散が促進される。また、慢性的な睡眠の断片化により炎症性単球（Ly-6Chi 単球）産生が促進され大きな動脈硬化病変が形成される。このように睡眠の不具合から疾患や病変への影響は報告されているが、一方、自然な老化過程で起こる睡眠変化が生物の身体にどのように影響するのかについての詳細は明らかにされていない。本実験において、老齢マウスに認められる睡眠の断片化は睡眠制限チャンバーを用いて誘導した。睡眠チャンバーの下方部に左右に移動するバーが設置されており、このバーの移動頻度を設定することで睡眠制限の程度を調節することができる。マウスの就寝時である午前 6 時から 0.5、1、2 分毎にバーを動かす条件で脳波/筋電位計測を行ったところ、0.5 分毎では開始後 6 時間は完全に睡眠が制限され覚醒を維持している状態（強制覚醒）を確認した。また、1 分毎では開始後 3 時間までは強制覚醒が持続したが、その後、睡眠制限に伴う回復睡眠が認められ（定常状態よりもデルタ波の割合が増加したノンレム睡眠）、以降もノンレム睡眠とレム睡眠の出現が認められた。一方、2 分毎では、個体差はあるものの、変則的に覚醒期が誘導されることにより睡眠と覚醒が切り替わる頻度が増加していた。強制覚醒を維持すると背内側部を含む脳内の神経活動量が顕著に変化することが示された。このような神経細胞の活性変化は末梢臓器の機能へも反映されることが示唆され、睡眠制限から脳内の神経ネットワークに変化が生じ、種々の機能変化に繋がっていることが示唆された。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

食餌制限では様々な老化に伴う生理機能の低下を改善させることが報告されている。睡眠変化への作用は非常に顕著であったことから、食餌制限による睡眠改善作用は老化現象を遅延し寿命を延伸させる作用に繋がるのではないかと考えている。実際に、複数のマウスモデルを用いた寿命研究は睡眠変化と個体寿命の正相関を示しており、老化過程における睡眠制御の重要性を示唆している。視床下部背内側核に発現する PRDM13 神経もしくは Prdm13 シグナル系は、こういった老化に伴う睡眠変化調節に関与する神経・分子の一例ではあるが、遺伝学的な改変により個体寿命へ影響を及ぼすことが示された。さらに、食餌制限の作用を発揮する上で Prdm13 が必須の分子であることから、視床下部神経を介した睡眠制御と寿命の制御系には Prdm13 が含まれていることが示唆された。

視床下部には睡眠覚醒制御に関与する神経核や神経細胞が複数報告されている。今後さらに、睡眠覚醒制御に関与する神経核間のネットワークが老化過程でどのように変化し寿命制御に関与するのかを明らかにすることは、重要な課題であると考えられる。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

E. 健康危険情報

なし。

※該当がある場合には年度別に記載すること。（班のすべての健康危険情報について記載すること。該当がない場合には年度区分をしないで「なし」と記載すること。

F. 研究発表

1. 論文発表

2019年度

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) 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

2020年度

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

2021年度

1) 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、生体と科学、72、84-90、2021

2) 佐藤亜希子. 睡眠と脳内の寿命制御因子. 別冊医学のあゆみ 279:352-359、2021

3) Satoh A. Central mechanisms linking age-associated physiological changes to healthspan through the hypothalamus. Aging Mechanisms II: Longevity, Metabolism, and Brain Aging"(Springer), in press

※発表誌名、巻号・頁・発行年等も記載すること。

※年度別に記載すること。

2. 学会発表

2019年度

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

2020年度

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

2) Akiko Satoh: PRDM13-positive neurons regulate age-associated pathophysiology, and longevity through sleep homeostasis in mammals. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Mechanisms of Aging, Virtual, September 22-25, 2020

2021年度

1) Akiko Satoh: Central regulation of aging and longevity through sleep control in mammals. 10th Symposium of the Smart-Aging Center, Tohoku University, Virtual, April 16, 2021

2) 佐藤亜希子: 視床下部背内側部神経による睡眠調節と中枢性老化・寿命制御機構. 第32回日本老年医学会シンポジウム, 名古屋(Web参加), 2021年6月13日

3) Shogo Tsuji and Akiko Satoh : Prdm13-expressing neurons regulate sleep-wake patterns during aging. 第40回基礎老化学会, 大府(Web参加), 2021年6月12日

4) Shogo Tsuji and Akiko Satoh : Prdm13-expressing neurons regulate sleep-wake patterns during aging. 第32回日本老年学会合同ポスター, 大府(Web参加), 2021年6月12日

5) 佐藤亜希子: TBA. 第21回日本抗加齢医学会総会シンポジウム, 京都(Web参加), 2021年6月25-27日

6) 佐藤亜希子: 加齢に伴う睡眠形態の変容とその可逆性について, OYC バイオシンポジウム, 東京 (Web 参加), 2021 年 6 月 8 日

7) 佐藤亜希子: 加齢に伴う睡眠の変化と老化寿命制御への関与、第 31 回新薬創薬談話会、ウェブ開催、令和 3 年 8 月 31 日

8) 佐藤亜希子: 視床下部背内側部神経による睡眠調節と中枢性老化・寿命制御機構, 日本生化学会シンポジウム, 2021/11/3-5.

※年度別に記載すること。

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