

長寿医療研究開発費 2022年度 総括研究報告

老化に伴う睡眠変化の調節機構の解明 (22-3)

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

研究要旨

睡眠は生物に共通した生理現象であり、睡眠変化が身体機能に及ぼす影響も大きい。例えば、歳をとるとヒトを含む哺乳動物では中途覚醒の頻度が増加する睡眠の断片化が認められる。睡眠の断片化は記憶能や代謝能そして免疫能の低下につながる事が報告されている。また、こういった微細な睡眠変化は様々な老化関連神経変性疾患の発症前段階で認められる。したがって、日常生活に支障をきたしうる睡眠変化の予防や改善は健康寿命の延伸につながる重要な課題である、と考えられる。一方、睡眠の断片化のメカニズムとしては睡眠の深度の低下や脳の神経回路異常の関与が示唆されているが、その詳細は不明である。そこで本研究課題では、以下の2つの項目について研究を進めていくことで睡眠の断片化機構を明らかにしていく：1) 睡眠断片化に関与する脳内の分子制御機構の解明、2) 年齢や睡眠変化に伴い変動する液性因子の探索。また本研究課題は、将来的に高齢者に認められる睡眠の不具合を改善することのできる介入法やバイオマーカーの開拓を目指している。そのため、当センターの研究体制を生かし、基礎データと臨床・疫学データが融合されるよう本課題を推進していく。なお、本年度の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、動物愛護を配慮して実施した。またヒト検体を用いた研究は、臨床研究認定者制度講習会を受講し倫理を遵守し、課題内容について倫理申請を承認された後に解析を実施した。

主任研究者

佐藤 亜希子 国立長寿医療研究センター 統合生理学研究分野 (副部長)

分担研究者

伊藤 尚基 国立長寿医療研究センター 中枢性老化・骨格筋代謝・運動機能制御研究プロジェクトチーム (プロジェクトリーダー)

A. 研究目的

本研究課題では、以下の2つの項目について研究を進めていくことで睡眠の断片化機構を明らかにしていく：1) 睡眠断片化に関与する脳内の分子制御機構の解明、2) 年齢や睡眠変化に伴い変動する液性因子の探索。また本研究課題は、将来的に高齢者に認められる睡眠の不具合を改善することのできる介入法やバイオマーカーの開拓を目指している。そのため、当センターの研究体制を生かし、基礎データと臨床・疫学データが融合されるよう本課題を推進する。

B. 研究方法

モデルマウスの組織検体を採取し-80度に保存した。それぞれの検体からRNA抽出とトランスクリプトーム解析を行った。白色脂肪組織と肝臓については、RNAeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN)とRNAeasy kit (QIAGEN)を用いてそれぞれRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたRNA-sequencing (SMART-seq, TAKARA)を実施した。

(倫理面への配慮)

本年度の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、動物愛護を配慮して実施した。またヒト検体を用いた研究は、臨床研究認定者制度講習会を受講し倫理を遵守し、課題内容について倫理申請を承認された後に解析を実施した。

C. 研究結果

1) 睡眠断片化に関与する脳内の分子制御機構の解明.

今年度は、睡眠断片化に関与するシグナル系を同定するために視床下部神経核の遺伝子変化に着目したRNA-sequencingを行った。マウスとヒトに共通し、休息期には若齢個体と比べて老齢個体では体温などの顕著な生理機能変化が認められ、それら生理機能の制御中枢としては視床下部が知られている。そのため、休息期の視床下部神経核遺伝子発現変化は加齢に伴う生理機能変化を反映していることが予想された。予想通り、本解析から体温調節に関与する遺伝子群やシグナル伝達系が視床下部神経核で加齢に伴い変化する知見を得た。体温調節と睡眠制御には密接な関係があり夜間睡眠の質の向上が健康寿命延伸に繋がることは広く知られていることから、解析により変化が求められた遺伝子群とシグナル系の老化制御への関与が示唆された。

本課題では、視床下部神経核から末梢臓器への作用を検討することにより、睡眠に関連した脳内機構の統合的理解も目指している。本年度、視床下部特異的 *Prdm13* ノックアウトマウスを高脂肪食下で解析したところ、視床下部 *Prdm13* シグナル欠損から白色脂肪組

織と肝臓において免疫応答や組織損傷の増加が分子レベルで認められ、インスリン抵抗性などの生理機能に影響が及ぼされる知見を見出した（本年度サマリーサーチセミナー発表）。また分担研究者らは、フレイルのメカニズムとなりうる視床下部神経核と骨格筋間の臓器関連機序を明らかにした（本年度サマリーサーチセミナー発表、原著論文掲載）。

2) 年齢や睡眠変化に伴い変動する液性因子の探索.

マウス脳の解析から脳または視床下部に豊富に発現する分子群が存在し、血中にも存在することが示されている。最終的に以下の評価基準より候補分子を選定した。i)マウス脳において、他の脳領域よりも視床下部において相対的に高発現している、ii)マウス血清中の濃度に加齢変化が認められる、iii)マウス血清中の濃度が睡眠負荷により変化する、iv)ヒト血清中に検出される。当初の計画通り、今年度は NILS-LSA 血清検体（334 検体）を用いたトランスクリプトーム解析を実施し qRT-PCR による定量解析を行った。用いた検体における年齢と睡眠時間の間には男女共に正相関の傾向が認められた[男性 $r^2=0.194$ (n=183)、女性 $r^2=0.087$ (n=151)]。しかしながら、候補分子の血清中濃度と年齢の間に顕著な相関関係は認められなかった。一方、候補分子の血清中濃度と睡眠時間との間には、ヒト血清中濃度が睡眠時間 9 時間以上（または 7 時間以下）になると睡眠時間と候補分子の濃度に軽度な負（正）の相関関係が認められたが、顕著な変化ではなかった。

D. 考察と結論

本研究部の先行研究から、老化に伴う睡眠の断片化制御には視床下部に発現する *Prdm13* 陽性神経細胞が責任神経として関与することが示された（原著論文アクセプト）。当初の計画では *Prdm13* 陽性神経細胞の特徴と加齢変化を遺伝子レベルで明らかにするために、脳切片を用いたオミクス解析を行う予定であった。しかし、実験系の最適化とマウスモデルの不足から、予定していたオミクス解析については今年度後半実施へと変更した。今年度は視床下部神経核の遺伝子変化に着目した RNA-sequencing 解析を行なったが、依然として、*Prdm13* 陽性神経細胞のオミクス解析を実施する必要があると考えている。

なぜ背内側部特異的 *Prdm13* 欠損マウスでは高脂肪食下において末梢組織の炎症や損傷が増加しインスリン抵抗性が認められるのかについては、詳細は不明である。白色脂肪組織では、高脂肪食負荷により炎症が起こると pro-inflammatory mediator (e.g. TNFalpha, IL6, MCP1)の産生分泌が増加し、他組織臓器に影響が及ぼされる。例えば、肝臓ではアポトーシスが促進され nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)の一因となる。背内側部特異的 *Prdm13* 欠損マウスでは慢性的に睡眠が断片化されているため、様々な生体内を循環する液性因子量へも影響を与えることがわかってきた。これら液性因子への作用が高脂肪食負荷による末梢臓器への作用を増悪化させているか、については、今後の検討課題である。

ヒト血清中の解析では、個体間の分散の大きさ以上に他因子（認知機能、栄養状態、糖尿病の既往歴など）を考慮した解析の必要性がある。当初の計画通り、今年度後半から多変数解析を進め、候補因子と共存症の関連が示唆されるデータを得たが、年齢や睡眠変化を顕著に反映する結果には至らなかった。アルツハイマー病モデルマウスにおける記憶や認知機能制御に関与する知見も報告されていることから、さらに、認知機能との関連など、注意深く解析を進める必要があると考えられる。加えて、前述した候補分子以外にも、本年度内にはバイオバンクリソース等を活用し睡眠変化や障害に関連する新規の液性因子の探索を目指した解析を実施するなど、他のアプローチからも課題2)を進めていく必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(主任研究者)

- 1) Furukawa M, Tada H, Wang J, Yamada M, Kurosawa M, Satoh A, Ogiso N, Shikama Y, Matsushita K. Molar loss induces hypothalamic and hippocampal astrogliosis in aged mice. *Sci. Rep.* 12(1):6409, 2022 (共著) .
- 2) Satoh A. Central mechanisms linking age-associated physiological changes to healthspan through the hypothalamus. *Aging Mechanisms II: Longevity, Metabolism, and Brain Aging*(Springer), pp289-306, 2022.
- 3) Mizumoto T, Yoshizawa T, Sato Y, Ito T, Tsuyama T, Satoh A, Araki S, Tsujita K, Tamura M, Oike Y, Yamagata K. SIRT7 Deficiency Protects against Aging-Associated Glucose Intolerance and Extends Lifespan in Male Mice. *Cells.* 11:3609, 2022 (共著) .

(分担研究者)

Ito N, Takatsu A, Ito H, Koike Y, Yoshioka K, Kamei Y, Imai I. Slc12a8 in the lateral hypothalamus maintains energy metabolisms and skeletal muscle functions during aging. *Cell Rep.* 40(4): 111131, 2022.

2. 学会等発表

(主任研究者)

- 1) 佐藤亜希子, 睡眠調節を介した老化寿命制御機構について, レドックス R&D 戦略委員会第2回企画シンポジウム, 2022年5月13日, オンライン
- 2) Akiko Satoh, The role of hypothalamic neurons in sleep, aging and longevity. The 17th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. October 13-14, 2022, Kanazawa (Best Oral Presentation Award 受賞)
- 3) 佐藤亜希子, 睡眠調節を介した視床下部による老化寿命制御機構, 第100回日本生理学会学術総会大会シンポジウム, 2023年3月15日, 京都
- 4) 丸山栞穂, 清塚麻衣, 後藤三緒, 壁谷慶子, 辻将吾, 多田敬典, 佐藤亜希子, 高脂肪食下における背内側部特異的 Prdm13 欠損が代謝能にもたらす機能変化について, 第100回日本生理学会学術総会大会ポスター発表, 2023年3月15日, 京都
- 5) 佐藤亜希子, 視床下部 Prdm13 系の老化に伴う睡眠変化における役割, 第22回日本再生医療学会総会シンポジウム, 2023年3月25日, 京都
- 6) 細山徹, 林大鈞, 漆畑拓弥, 佐藤亜希子, 関根圭輔, 渡邊研, 老化骨格筋の Spatial Transcriptomics, 第9回骨格筋生物学会, 2023年3月4日, 神奈川

(分担研究者)

伊藤 尚基, 高津 藍, 伊藤 裕美, 小池 悠華, 吉岡 潔志, 亀井 康富, 今井 眞一郎, 外側視床下部における NAD+関連分子と骨格筋機能およびフレイル・サルコペニアとの関係について, 第8回日本筋学会学術集会, 2022年8月6日, 東京

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