

長寿医療研究開発費 2024年度 総括研究報告（総合報告）

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 統合生理学研究部（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）（2022年度のみ）

研究期間 2022年4月1日～2025年3月31日

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。

また、モデルマウスを高脂肪食下で飼育した。使用した餌は総カロリーあたり40%脂肪を含む固形飼料である。3ヶ月齢マウスを高脂肪食と通常食をそれぞれ与えたマウス群に分け、9週間飼育した。その間、毎週体重測定をおこなった。その後、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験、血液生化学パラメーターの計測を行った。そして臓器を採取した。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。各組織からパラフィンブロックを作製、パラフィン切片を作製した。各臓器のパラフィン切片についてはHE染色を行い、脳切片についてはNissl染色も行った。

(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.

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。

また本課題では、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た。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。群間の顕著な体重変化は認められなかったが、対照群と比較してノックアウトマウスではインスリン抵抗性のさらなる増悪化が認められた。この結果から、高脂肪食下におけるノックアウトマウスの末梢臓器の機能変化が示唆された。

1) 白色脂肪組織では免疫応答亢進、肝臓ではアポトーシス亢進を示す遺伝子プロファイルが得られたこと、また、2) *Prdm13*-CreERT2 マウスの視床下部神経核に AAV-Ef1a-EGFP を注入する順行性トレーシング実験から、*Prdm13* 陽性神経細胞の神経投射先が同定されていた：この2つの結果から、ノックアウトマウスで認められる末梢臓器の機能変化が中枢の神経ネットワーク変化が原因となっている可能性を検証した。ノックアウトマウスとコントロールマウスの脳切片の HE 染色像を比較したところ、視床下部の神経細胞数がノックアウトマウスで対照群と比較すると有意に低下している知見が得られた。

2) 年齢や睡眠変化に伴い変動する液性因子の探索。

先行研究から、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た。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。候補分子について NLS-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ところ、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。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、老年学・社会科学センター老化疫学研究部との共同研究から共存症と相関を示す候補分子が見つかった (原著論文発表)。

D. 考察と結論

なぜ視床下部特異的 *Prdm13* ノックアウト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ると pro-inflammatory mediator (e.g. TNF α , 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。ノックアウト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。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、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年齢や睡眠変化に伴い変動する液性因子の探索を進めていくことが有効であると考えられる。

ノックアウトマウスの脳切片の Nissl 染色像の変化について、末梢組織に認められるインスリン抵抗性への関与が考えられる。例えば、視床下部弓状核は全身の代謝制御に関与することが知られている。高脂肪食による視床下部の神経細胞数の変化については、すでにいくつか報告されている。1ヶ月程度の短期高脂肪食では視床下部神経細胞数が有意に減少すること、一方、8週間以上の長期実験では、減少、増加また不変と、常に一致する結果ではないようである。一因として、長期高脂肪食によりもたらされる視床下部の細胞外領域の増加が考えられる。高脂肪食が視床下部で炎症応答を増大させることから、視床下部の細胞外領域増加も炎症応答から誘導されることが示唆される。実際に、脳の細胞外領域の増加は阻止損傷などでも認められる。Prdm13 欠損により神経細胞数が減少する知見をさらに検証するためには、1) 通常食と高脂肪食とで視床下部神経細胞数及び細胞外領域の大きさの比較、2) 通常食と高脂肪食とで Prdm13 発現神経の投射先の神経細胞数の計測をすることが必要である。また、通常食と高脂肪食とで視床下部内で神経細胞数現象につながるアポトーシスを誘導する遺伝子が増加しているかを検証することは、高脂肪食で誘導される視床下部神経細胞数の減少機序の解明につながると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2022 年度

(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

- 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

(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

2023 年度

- 1) Urushihata T, Goto M, Kabetani K, Kiyozuka M, Maruyama S, Tsuji S, Tada H, Satoh A. Evaluation of cellular activity in response to sleep deprivation by a comprehensive analysis of the whole mouse brain. *Front Neurosci*, 17:1252689, 2023
- 2) Tsuji S, Brace CS, Yao R, Tanie Y, Tada H, Rensing N, Mizuno S, Almunia J, Kong Y, Nakamura K, Furukawa T, Ogiso N, Toyokuni S, Takahashi S, Wong M, Imai SI, Satoh A. Sleep-wake patterns are altered with age, Prdm13 signaling in the DMH, and diet restriction in mice. *Life Sci Alliance*, 6:e202301992, 2023
- 3) 辻将吾, 佐藤亜希子. 加齢に伴う睡眠変化に關与する視床下部神経細胞の同定. *実験医学*, 2023
- 4) 辻将吾, 佐藤亜希子. 脳による老化制御とエピジェネティクス. *Geriatric Medicine*, 61: 29-33, 2023
- 5) 今井眞一郎, 佐藤亜希子. 特集 抗老化医療の未来をさぐる : 哺乳類における老化・寿命制御の理解とその社会実装 序文. *Geriatric Medicine*, 61: 5-7, 2023 (特集号監修)

2024 年度

- 1) Yao N, Kinouchi K, Katoh M, Ashtiani KC, Abdelkarim S, Morimoto H, Torimitsu T, Kozuma T, Iwahara A, Kosugi S, Komuro J, Kato K, Tonomura S, Nakamura T, Itoh A, Yamaguchi S, Yoshino J, Irie J, Hashimoto H, Yuasa S, Satoh A, Mikami Y, Uchida S, Ueki T, Nomura S, Baldi P, Hayashi K, Itoh H. Maternal circadian rhythms during pregnancy dictate metabolic plasticity in offspring. *Cell Metab.* 37(2):395-412. e6, 2025
- 2) Chu WM, Goto M, Kabetani K, Nishita Y, Zhang S, Shimokata H, Lee MC, Satoh A,

- Otsuka R. Circulating miR-323-3p as a novel potential plasma biomarker for multimorbidity burden and cognitive decline in middle-aged and older adults: Results from the national institute for longevity sciences-longitudinal study of aging in Japan. *Archives of Gerontology and Geriatrics Plus*, 1(4):100099, 200, 2024
- 3) Qi N, Franczyk MP, Yamaguchi S, Kojima D, Hayashi K, Satoh A, Ogiso N, Kanda T, Sasaki Y, Finck BN, DeBosch BJ, Yoshino J. Adipocyte-specific inactivation of NAMPT, a key NAD⁺ biosynthetic enzyme, causes a metabolically unhealthy lean phenotype in female mice during aging. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 327(1):E81-E88, 2024
 - 4) Urushihata T, Satoh A. Role of the central nervous system in cell non-autonomous signaling mechanisms of aging and longevity in mammals. *J Physiol Sci*. 74(1):40, 2024
 - 5) 辻将吾, 佐藤亜希子. 脳神経におけるヒストン修飾と老化制御. *Precision Medicine*. 8:8-9, 14-17, 2025
 - 6) 佐藤亜希子. 特集 脳老化研究の最前線: 総論 老化・寿命制御における脳の役割を紐解く. *Precision Medicine*. 8:8-9, 2025 (特集号監修)
 - 7) 佐藤亜希子. 脳神経細胞の加齢変化と老化・寿命制御における役割. *診断と治療*. 112:1016-1020, 2024

2. 学会発表

2022 年度

(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回骨格筋生物学研究会, 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

2023年度

- 1) 佐藤亜希子. 睡眠と深い思考: 高齢マウスモデルにおける脳波とMRI. 「高齢者の深い思考〜あるいは年の功への認知神経科学の可能性」シンポジウム. 2024年2月27日. 仙台.
- 2) 佐藤亜希子. 哺乳類における睡眠覚醒形態老化への視床下部 Prdm13 陽性神経の役割. 第46回日本分子生物学会, シンポジウム. 2023年12月6日. 神戸
- 3) 漆畑拓弥, 後藤三緒, 壁谷慶子, 清塚麻衣, 丸山栞穂, 辻将吾, 多田敬典, 佐藤亜希子. マウス全脳網羅的解析による睡眠制限への神経活動応答の評価. 第46回日本分子生物学会, 一般演題. 2023年12月8日. 神戸
- 4) 佐藤亜希子. 睡眠調節を介した中枢性老化寿命制御機構. 第3回日本オートファジーコンソーシアム, 講演. 2023年11月22日. 横浜
- 5) 佐藤亜希子. 脳は老化寿命制御の中心なのだろうかー哺乳類の中枢性老化寿命制御機構の紹介ー. 第63回 生命科学夏の学校 生化学若い研究者の会, シンポジウム. 2023年8月27日. 新潟
- 6) 佐藤亜希子. 視床下部による哺乳類の老化寿命制御機構. DUAL Seminar in Tokai. 2023年6月28日. ハイブリッド
- 7) Wei-Min Chu, Mio Goto, Keiko Kabetani, Yukiko Nishita, Hiroshi Shimokata, Akiko Satoh, Rei Otsuka. Circulating miR-323a-3p as a novel potential plasma biomarker for multimorbidity burden in middle aged and older adults: results from NILS-LSA in Japan. IAGG, 一般演題. 2023年6月12-14日. 横浜

2024年度

- 1) 佐藤亜希子. 加齢に伴う睡眠変化と老化メカニズムとの関連性解明に向けて: 哺乳類の視床下部ニューロンからの知見. 第47回日本分子生物学会シンポジウム. 2024年11月28日. 福岡. シンポジウム企画
- 2) 佐藤亜希子. 背内側部 Prdm13 陽性神経による老化に伴う睡眠変化制御機構. 第66回日本老年医学会シンポジウム. 2024年6月15日. 名古屋. シンポジウム企画
- 3) 佐藤亜希子. 哺乳類における中枢性老化寿命制御メカニズムの紹介. IDAC 交流セミナー. 2024年3月7日. 仙台
- 4) Takuya Urushihata, Akiko Satoh. Evaluation of age-related neurofunctional changes in mice. 161st IDAC Biannual Meeting. February 2, 2024, Sendai

- 5) Akiko Satoh. Unraveling the Link Between Sleep Changes with Age and Aging Mechanisms: Insights from Hypothalamic Neurons in Mammals. Seminar at Brown University, September 19, 2024. Providence, USA
- 6) Akiko Satoh. Unraveling the Link Between Sleep Changes with Age and Aging Mechanisms: Insights from Hypothalamic Neurons in Mammals. Seminar at Washington University in St. Louis School of Medicine, September 30, 2024. St. Louis, USA
- 7) 細山徹, 漆畑拓弥, 高石美菜子, 佐藤亜希子, 渡邊剛, 竹村真里枝, 重水大智, 関根圭輔, 佐竹昭介. 加齢変動性マイオカインの α アミラーゼは疾患バイオマーカーになり得る. 第11回日本サルコペニア・フレイル学会大会. 2024年11月3日. 東京
- 8) Takuya Urushihata and Akiko Satoh. A resting-state functional magnetic resonance imaging (rs-fMRI) study to investigate functional connectivity networks in age and dietary restricted mice. The 19th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. October 10-11, 2024, Sendai

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