

哺乳類における睡眠及び老化を制御する視床下部特異的シグナル伝達系の解明（28-47）

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

3年間全体について

睡眠は、哺乳動物の生理現象としてだけではなく、アルツハイマー型認知症や2型糖尿病などの老年性疾患の発症に関与していることが明らかにされている。老化に伴い睡眠の断片化や睡眠の質的低下が起こることが知られているが、その詳細な分子機序については未だ不明であり、老年性疾患との関連性も不明な点が多い。視床下部は睡眠制御を司る主要な脳領域の一つとして知られている。申請者はこれまでに、老化・寿命を制御する上で重要な役割を果たしている視床下部背内側核（DMH）において、哺乳類サーチュイン *Sirt1* またその分子パートナーである転写因子 *Nkx2-1* をノックダウンしたマウスで、睡眠の質が著しく低下することを見出した（Satoh *et al.*, *Cell Metab.* 2013）。更に、DMH 特異的遺伝子群の中から、*Sirt1/Nkx2-1* シグナル伝達系の下流で働く遺伝子として、睡眠を特異的に制御する PR domain-containing protein 13 (*Prdm13*) を同定した（Satoh *et al.*, *Aging Cell* 2015）。*Prdm13* 発現量は老化により低下し、一方、カロリー制限や長寿マウスでは増加する。このことから、DMH の *Prdm13* 発現量低下が老化に伴う睡眠障害を引き起こし、さらに全身の老化現象を引き起こす役割を持っているのではないかと考えている。そこで、視床下部による睡眠制御のメカニズムを解明し、さらに睡眠制御と老化制御との関係性を明らかにする為に、（1）DMH の *Prdm13* を含むシグナル伝達系による睡眠分子制御機序の解明、そして、（2）睡眠制限が視床下部、脳幹及び視床のシグナル伝達系を介して全身の老化現象に及ぼす影響を検討した。

平成31年度について

本年度は、*Prdm13* ノックアウトマウスを作製し、睡眠解析を行なった。その結果、*Prdm13* ノックアウトマウスが老齢マウスに認められる睡眠形態を示すことを明らかにした。例えば、*Prdm13* ノックアウトマウスでは、睡眠が断片化し、睡眠の質的低下が認められた。加えて、*Prdm13* の下流遺伝子を探索するため、RNA-sequencing を

実施し、結果を得た。

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）

研究期間 平成29年1月17日～平成31年3月31日

#### A. 研究目的

視床下部による睡眠制御メカニズムを解明し、さらに睡眠制御と老化制御との関係性を明らかにする為に、(1) DMH の *Prdm13* を含むシグナル伝達系による睡眠分子制御機序の解明、そして、(2) 睡眠制限が視床下部、脳幹及び視床のシグナル伝達系を介して全身の老化現象に及ぼす影響の検討を行う。

#### B. 研究方法

3年間全体について

(1) DMH の *Prdm13* を含むシグナル伝達系による睡眠分子制御機序の解明：DMH の *Prdm13* を含むシグナル伝達系による睡眠分子制御機序を解明するため、遺伝子改変モデルマウスを作製し、*electroencephalogram/ electromyogram* により睡眠解析を行った。また、睡眠恒常性機能を評価するため、睡眠制限への反応性を検討した。

(2) 睡眠制限が視床下部、脳幹及び視床のシグナル伝達系を介して全身の老化現象に及ぼす影響の検討：睡眠制限が視床下部、脳幹及び視床のシグナル伝達系を介して全身の老化現象へ及ぼす影響を *in vitro* で検討するために、E17 マウスから視床下部神経細胞を単離し、ケトン体を培養神経に添加し、神経活動量や遺伝子発現変化を検討した。加えて、*Prdm13* の下流遺伝子探索を通し、睡眠を制御する神経ネットワークへの関連性を探索した。

平成31年度について

DMH の *Prdm13* を含むシグナル伝達系による睡眠分子制御機序を解明するため、DMH 特異的 *Prdm13* ノックアウトマウスの睡眠解析を行なった。また、*Prdm13* を発現または欠損させた初代培養視床下部神経から RNA を単離し、RNA-sequencing 解析を実施し、*Prdm13* の下流候補遺伝子の探索を行なった。

(倫理面への配慮)

本申請に関して、申請者の属する施設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した。さらに脳特定領域を標的としたモデルマウス、あるいは初代培養神経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、適切に実施した。

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」に従って遂行した。本研究はいくつかの組み換え DNA 実験と動物実験より構成されるので、我が国の感染症新法とカルタヘナ条約の批准による組み換え生物拡散防止に関する法の2つの法令に沿って計画・準備された。動物実験の実施にあたっては、事前に国立長寿医療研究センター倫理委員会から承認を得た動物実験プロトコールに準じた。

## C. 研究結果

3年間全体について

(1) DMH の *Prdm13* を含むシグナル伝達系による睡眠分子制御機序の解明：初年度に睡眠測定機器等の設備を整え、まず、若齢、及び老齢マウスの睡眠解析データを集積することで睡眠の加齢変化の基準を定めた。その後、遺伝子改変モデルマウスや睡眠制限モデルマウスの解析を行なった。モデルマウス作製が遅延していたが、最終年度には、これらマウスモデルを使った睡眠測定が完了した。

(2) 睡眠制限が視床下部、脳幹及び視床のシグナル伝達系を介して全身の老化現象に及ぼす影響の検討：睡眠制限時に血中で増加するケトン体を処置した初代培養視床下部神経細胞では、*Egr-1*、*cFos*、*FosB* の mRNA 発現量が有意に増加することが示された。また、*Prdm13* ノックダウン神経細胞では、ケトン体添加により増加する *Egr-1*、*cFos*、*FosB* の mRNA 発現量が、統計的に有意に減少した。また、マウスにケトン体を腹腔内投与すると、投与30-90分後に視床下部神経が活性化されることが示された。これらの結果から、睡眠制限による視床下部神経の反応性変化には、ケトン体を介するシグナルが関与しており、*Prdm13* 陽性細胞がその制御に関与していることが示唆された。加えて、*Prdm13* の下流遺伝子探索を目的とした RNA-sequencing 解析もまた、その結果を支持するものであった。

平成31年度について

DMH 特異的 *Prdm13* ノックアウトマウスでは、対照群と比較して、睡眠の断片化が有意に増加した。睡眠の断片化はヒトにおける老化形態としてよく知られており、また、我々の結果から、マウスにおいても老化に伴い睡眠が顕著に断片化することが示された。加え

て我々は、*Prdm13* ノックアウトマウスがその他の老化に伴う睡眠変化を示す知見も得ている。これらの結果から、DMH における *Prdm13* 欠損により睡眠形態の老化を促進することが明らかとなった。一方、*Prdm13* を発現もしくは欠損させた初代培養視床下部神経を用いた RNA-sequencing 解析の結果、いくつかの有力な下流候補遺伝子が選定された。

#### D. 考察と結論

まず、本研究課題採択に伴い、本センターにおけるマウスの睡眠測定を実施する機器及び環境を整備することができた。マウスの老化に伴う睡眠変化（睡眠の質的な低下、睡眠の断片化）はこれまでも報告されていたが、老化に伴う睡眠の断片化については、本センター動物実験施設で実施した測定・解析から、再現性が認められた。一方、定常状態だけではなく睡眠制限などの条件下で睡眠測定を行う際、測定時の種々の条件（食餌、床敷、タイミング、等）を十分に検討し、本施設で実施する睡眠測定の測定基準を確立した。これまでに睡眠制限の実験は数多く報告されているが、実験方法の詳細については、明記されることは稀である。従って、論文化する際には、本研究で明らかにした食餌条件や床敷等の基本的な実験条件を明記することは、学術的に非常に重要であると考えている。

本研究課題の成果として、我々は、第一に、DMH 特異的に *Prdm13* をノックアウトしたマウスが老齢マウスと類似した睡眠形態を示すことを明らかにした。先行研究は、*Prdm13* が睡眠の質を制御していることを示している (Sato et al., *Aging Cell* 2015)。具体的には、shRNA レンチウイルスを視床下部に直接注入することで *Prdm13* をノックダウンしたマウスでは、対照群と比較して、睡眠の質（もしくは深度）の指標となるノンレム睡眠時の相対的なデルタ波の割合が低下する (Sato et al., *Aging Cell* 2015)。本研究では、DMH の中でも老化・寿命制御への関与が示唆されている神経細胞群特異的に *Prdm13* をノックアウトしたマウスを作製し睡眠解析を行なっている。従って、これらの解析結果は、*Prdm13* 陽性神経細胞による睡眠制御機序が老化・寿命制御機序においてどれだけの重要性を持つのか、という疑問に答えを見出すことに繋がるかもしれない。DMH 特異的 *Prdm13* ノックアウトマウスにおいて、代謝機能や免疫応答など、その他の老化に伴う表現型が後発的に現れるのか、大変興味深い。現在、その可能性を検証している。

本課題期間には終了することはできなかったが、老化に伴う睡眠現象を模倣した睡眠制限が、睡眠覚醒制御を司ることで知られる視床下部-脳幹-視床制御系においてどのようなシグナル応答を伝達するのか、また老人に認められる全身性の生理学的機能変化への影響を検討中である。老齢マウスでは、若齢マウスと比較して明期特異的 [Zeitgeber time (ZT) 0-2] に覚醒時間が有為に増加する。そこで、老化に伴う睡眠障害モデルマウスを時間特異的に睡眠制限することで作製し、老化関連睡眠障害が起こる作用機序及び末梢組織/臓器への影響などを解明しようとしている。これにより、本研究課題で明らかになった、DMH の睡眠制御機能に加え、それを介した老化制御機序を司る神経ネットワークの解明に繋がること

が期待される。これらの研究は、今後の大きな課題である。

また、本研究課題では、睡眠障害という脳の機能低下と末梢臓器の機能低下を繋ぐ因子として、少なくとも、ケトン体が関与している可能性も見出した。ケトン体は睡眠・覚醒を制御する上で重要な代謝産物であることから、末梢組織シグナルとしてケトン体が血流を介して脳内に伝達され、その結果、視床下部神経細胞の加齢変化をもたらす可能性が考えられている。本研究から、少なくとも、視床下部 Prdm13 陽性細胞はケトン体へ反応することが示された。この作用がどのような生理学的条件下 (e.g. 睡眠制限時または睡眠制限後の回復睡眠時) で発揮されるのか、更なる検討が必要である。一方、定常状態の血中ケトン体量に加齢変化が認められる、という知見も報告されている。従って、睡眠制限に促進されるケトン体産生能自体に加齢変化があるのか、という点も考慮する必要がある。

DMH の Prdm13 陽性神経細胞が睡眠を制御する詳細な機序はまだ不明であるが、我々は、本研究により Prdm13 の生理機能を担う下流候補遺伝子を選定した。現在、下流候補遺伝子の生理機能の解明、Prdm13 による下流候補遺伝子発現の制御機序解明を進めている。

上述の結果を総括すると、本研究により、DMH が Prdm13 を含むシグナル伝達系を介して老化と睡眠を制御する可能性が示唆された。今後、本研究成果を基に老化現象及び老化に伴う睡眠障害を制御する DMH 神経細胞の機能を調節している分子などが同定されれば、将来的には老化及び老化に伴う睡眠障害を標的とした薬理的アプローチに進展し、最終的には老年性疾患の予防、ひいては健康長寿社会の構築に繋がるのではないかと、多いに期待される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

平成28年度

なし

平成29年度

##### 1) Satoh A, Imai S, Guarente LP.

The brain, ageing, and sirtuins.

Nat. Rev. Neurosci. 18:362-374, 2017.

##### 2) Satoh A\*, and Iijima MK.\*

Roles of tau pathology in the locus coeruleus (LC) in age-associated pathophysiology and Alzheimer's disease pathogenesis: Potential strategies to protect the LC against aging.

Brain Research, pii: S0006-8993(17)30562-0, 2017. (\*Co-corresponding authors).

3) 佐藤 亜希子

視床下部における睡眠および体温調節のメカニズムと哺乳類の老化・寿命制御の関係.

実験医学増刊号. 35:3351-3356, 2017.

平成30年度

1) Snyder-Warwick AK, Satoh A, Santosa KB, Imai SI, Jablonka-Shariff A.

Hypothalamic Sirt1 protects terminal Schwann cells and neuromuscular junctions from age-related morphological changes.

Aging Cell, 2018 May 30:e12776.

2) 佐藤 亜希子, 今井 眞一郎.

哺乳動物における脳サーチュインを介した老化・寿命制御機序.

日本臨床 76 増刊号, 5:142-147 2018.

3) 佐藤 亜希子

哺乳類における老化・寿命を制御する視床下部神経細胞およびその分子機序.

実験医学増刊号, 336: 2081-2086, 2018.

2. 学会発表

平成28年度

1) Satoh A.

Sirtuins and mTOR signaling in the hypothalamus: A key regulator of sleep, aging and longevity.

Asian Society of Aging Research Symposium 2017 -Molecular Basis for Regulation of Aging and Disease-. March 3, 2017, Sapporo.

2) 佐藤 亜希子

視床下部ニューロンを介した老化と睡眠の中枢性制御機序

第122回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017年3月28日, 長崎.

平成29年度

1) Satoh A.

The role of hypothalamic sirtuin in sleep and aging.

International Aging Symposium Session II “Mechanism of Cellular Senescence and Aging”, The 40<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society for Biomedical Gerontology. June 15-16, 2017, Nagoya.

2) Satoh A.

Role of the dorsomedial hypothalamus in mammalian aging and sleep.

16th Surugadai International Symposium&Joint Usage/Research Program of Medical

Research Institute International Symposium, October 11, 2017, Tokyo.

- 3) 佐藤 亜希子  
哺乳類サーチュインを介した視床下部の全身性老化制御機構-老齢マウスに認められる睡眠変化の分子メカニズムと全身性の老化形質-。  
第 18 回 アロマ・サイエンス・フォーラム, 2017 年 10 月 27 日, 東京.
- 4) 佐藤 亜希子  
哺乳類における視床下部神経を介した睡眠・老化・個体寿命の制御機構。  
日本農芸化学会 2018 年度大会シンポジウム『寿命・老化の理解に迫る実験系と方法論』, 2018 年 3 月 18 日, 名古屋.
- 5) Satoh A.  
Hypothalamic regulation of sleep and aging through mammalian sirtuins.  
CDB Symposium, March 27-29, 2018, Kobe.
- 6) Satoh A.  
Hypothalamic Sirtuins and mTOR Signaling Pathway: A Key Regulator of Sleep, Aging and Longevity.  
Gordon Research Conference on Biology of Aging, July 9-14, 2017, Les Diablerets, Switzerland.
- 7) Satoh A.  
Hypothalamic Regulation of Aging and Longevity through Mammalian Sirtuins.  
Special seminar at the Center for Plant Aging Research, Institute for Basic Science (IBS), November 8, 2017, Daegu, Korea.

平成 30 年度

- 1) 佐藤 亜希子  
視床下部背内側核による老化・寿命制御機序。  
第 60 回 歯科基礎医学会学術大会(福岡) アップデートシンポジウム 10 基礎老化研究から歯科医学研究への展開を考える～国立長寿医療研究センターからの提言～, 2018 年 9 月 7 日, 福岡.
- 2) 佐藤 亜希子  
視床下部背内側核 PRDM13 による老化・寿命制御機序。  
第 91 回 日本生化学会大会(京都) シンポジウム 代謝が紡ぐ分化・老化と生活習慣病, 2018 年 9 月 24 日, 京都.
- 3) Satoh A.  
The interaction between sleep and aging mediated by DMH neurons.  
The 7<sup>th</sup> IIS Symposium-Solving the mystery of sleep-, December 21, 2018, Tokyo.
- 4) Satoh A.  
The role of DMH neurons in sleep homeostasis during the aging process.

The Third Emei Mountain International Anti-Aging Healthcare Industry Development Forum,  
September 14-15, 2018, Chengdu, China.

5) 佐藤 亜希子

視床下部背内側核神経による睡眠及び老化制御メカニズムについて.

NCGG-TMIG 合同セミナー, 2018 年 10 月 26 日, 東京.

6) 佐藤 亜希子

哺乳類における脳内サーチュインの老化・寿命制御機構.

第 51 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー, 2019 年 1 月 16 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