

長寿医療研究開発費 2023年度 総括研究報告

課題名 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 統合生理学研究部（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）

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。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 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。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.

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を進めることを目指している。1年目、視床下部特異的 *Prdm13* ノックアウトマウス(KO マウス)を高脂肪食下で解析した。その結果、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 KO 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 KO 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リングが得られたこと、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、KO 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。KO 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 KO 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。当初の計画通り、今年度は 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。1 年目までに、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。一方、老年学・社会科学研究所センター老化疫学研究部との共同研究から comorbidity と相関を示す候補分子が見つかった (IAGG 2023 発表)。現在論文を投稿中である。

D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

KO 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 (extracellular space) 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 背内側部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など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

※班のすべての健康危険情報について記載すること。このため、分担項目に係る情報であっても分担研究報告ではなく、こちらに記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 (責任著者)
- 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 (責任著者)
- 3) 辻将吾, 佐藤亜希子. 加齢に伴う睡眠変化に関与する視床下部神経細胞の同定. *実験医学*, 2023. DOI:10.18958/7323-00003-0000586-00 (責任著者)
- 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 (責任著者)
- 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)

※発表誌名、巻号・頁・発行年等も記載すること。

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

- 5) 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
- 6) 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

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

※予定を含めて記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。