

睡眠の質および断片化を改善する漢方方剤の検討

申請代表者 佐藤亜希子 ワシントン大学医学部発生生物学部門 Staff Scientist
所内共同研究者 東田 千尋 神経機能学分野 准教授

【報告セミナー要旨】

【要旨】

睡眠の質は、老化またはアルツハイマー病の神経変性疾患の初期段階で低下する。従って、睡眠の質を指標とする創薬研究は、老化関連疾患特にアルツハイマー病の早期治療に繋がることが期待される。脳電図により脳波を解析することは、脳の活動状態を知るための客観的指標として有用であり、睡眠の解析にも古くから用いられている。睡眠の質は、ノンレム睡眠時の相対的なデルタ波の検出頻度より定量的に評価される。しかしながら、睡眠の質が老化とともに低下する分子作用機序および神経回路については、完全には明らかにされていない。本研究は、老化に伴うノンレム睡眠時のデルタ波の検出頻度の低下が、視床下部、特に腹内側核(Dorsomedial hypothalamus, DMH)による睡眠恒常性維持機能が低下することに起因していることを見出した。さらに我々は、その制御に関与しているDMHに特異的な分子シグナルおよびその上流因子も同定しつつある。これらの研究成果は、DMH特異的分子シグナルを維持することが、老化に伴う睡眠の質低下に拮抗する手段として有効である可能性を示唆している。今後は、生薬や漢方方剤の中から老化関連疾患や睡眠異常を標的とした創薬スクリーニング実現に向けた細胞アッセイ法の確立を目指したい。

■背景・目的

日本における高齢者の総人口に占める割合は、2013年では25%、2055年には33.4%にまで増加することが予測されている。このような高齢者人口が著しく増加している社会的背景から、健康寿命を延ばし、健やかな老後をより長く維持していくことが重要である。これにより高額な老人医療費の負担が削減されることも期待される。また、老化関連疾患として知られるアルツハイマー病の患者数も年々増加傾向を示し、2015年現在のアルツハイマー病患者数は262万人、2035年には337万人までに増加することが予測されている。アルツハイマー病は、記憶や思考能力が次第に障害されていく進行性の脳疾患である。その病巣においてアミロイド β の過剰な蓄積が引き金となり不可逆的な神経細胞の死滅がおこることから、根本的な治療が非常に難しい疾患である。アルツハイマー研究は、これまでの根本的治療を目指した研究の他に、近年では、発症までにアミロイド β の蓄積が数十年という長期的にかけて蓄積される点に着目し、その早期発見・早期治療を目指した研究も盛んに行なわれている。例えば、アルツハイマー病が発症する徴候として、入眠障害や睡眠時間の減少などによる睡眠の質の低下が認められる。さらに、このような睡眠の質の低下がアルツハイマー病を進展させる要因の一つとなっていることが報告されている。そのため、睡眠の質を発症の初期段階で改善させることができれば、アルツハイマー病の発症・進展を抑えることができるのではないかと考えられている。

申請者はこれまでに、哺乳類の老化・寿命制御機構の解明を目指し研究を行ってきた。近年の研究成果により、脳の視床下部DMH(dorsomedial hypothalamus)が、哺乳類の老化・寿命を制御する上で中枢的役割をもつことを明らかにした。脳特異的にSirt1を高発現させたトランスジェニックマウス(BRASTOマウス)では、寿命の有意な延長が認められる。特にSirt1/Nkx2-1シグナルが、視床下部DMHに特異的に発現しているPR domain containing protein 13 (Prdm13)を標的遺伝子として睡眠の質の低下や睡眠の断片化を制御していることを見出した。視床下部におけるPrdm13の発現量は、老化過程で低下するが、カロリー制限時に増加する。これらの研究結果は、加齢とともに低下するSirt1/Nkx2-1/Prdm13シグナルを維持することが老化を抑制的に制御するために重要な役割を担っていることを示している。本研究は、DMHに直接作用して睡眠の質の低下や睡眠断片化を抑制する漢方方剤を探索するためのスクリーニングシステムの確立を目指し、DMHに特異的なSirt1/Nkx2-1/Prdm13シグナルの生理学的重要性をさらに明らかにすることを目的として遂行された。

■結果・考察

はじめに、視床下部のSirt1/Nkx2-1シグナルの下流遺伝子であるPrdm13をDMHで特異的にPrdm13をノックダウンしたマウスモデル(DMH-Prdm13-KD)を作製した。DMH-Prdm13-KDマウスおよびその対照群(DMH-fLuc-KD)は、Prdm13-shRNAまたはfirefly Luciferase-shRNAを導入したレンチウイルスを4ヶ月齢マウスのDMHに直接注入することにより作製された。これらのマウスのDMHにおけるPrdm13のノックダウン効率は、それぞれのマウスのDMHをレーザーマイクロダイセクションにより採取し精製したRNAサンプルからqRT-PCRによりPrdm13発現量を定量した。その結果、80-90%であることが明らかになった。これにより、我々が作製したDMH-Prdm13-KDマウスがLoss-of-functionモデルとしてPrdm13の機能解析をする上で十分であると判断し、以下の解析に移行した。

このモデルマウスを用いて脳波解析による睡眠解析を行なった。DMH-Prdm13-KDマウスは対照群(DMH-fLuc-KDマウス)と比較して、NREM睡眠量に有意差は認められなかった。また、覚醒

およびREM睡眠量には12%程度の統計的に有意な差が認められたが、この量的変化が非常に小さいことから、DMH特異的にPrdm13を欠損させても、睡眠および覚醒量には大きな影響を与えないことが示された。一方、睡眠の質は睡眠の深度を指標として、計測される脳波に対する相対的なノンレム睡眠時のデルタ波の検出頻度（NREM delta power 値）により定量的に評価されている。DMH-Prdm13-KDマウスのNREM delta power 値は、対照群と比較して有意に低下していた。NREM delta power 値は加齢やアルツハイマー病の神経変性疾患の初期段階で低下することが知られている。また、Prdm13の発現量は加齢により低下することから、DMHのPrdm13が加齢過程で睡眠の質を維持する上で重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、先述した通り僅か（12%）ではあるが、覚醒量に差が認められることから、この差がその後の睡眠深度、つまりNREM delta power 値に影響を及ぼしているのか、この可能性についても将来的に検討する必要がある。さらに我々は、DMH-Prdm13-KDマウスに睡眠の断片化が認められることを明らかにした。特に、覚醒期とNREM睡眠期との間のトランジションの回数が対照群と比較してDMH-Prdm13-KDマウスで著しく増加していた。興味深いことに、同様の変化が4ヶ月齢マウスと比較したとき20ヶ月齢マウスでも認められた。加えて、先述した長寿BRASTOマウスでは、老化に伴う睡眠の断片化が認められなかった。BRASTOマウスのDMHではPrdm13の発現量が対照群と比較して有意に高く保たれていることを考えると、BRASTOマウスが老化過程においてPrdm13の機能を維持することにより睡眠の質を維持している可能性が示唆された。この可能性については、DMHでPrdm13を欠損させた老齢BRASTOマウスの解析を通して検証することが可能であると考えられる。

さらに、Prdm13の睡眠制御機構を明らかにするため、既知のメカニズムとして知られている概日周期制御と睡眠恒常性制御機序に着目した。睡眠覚醒周期は、大きく分けてこの2つの制御因子により調節されていることが知られている。DMH-Prdm13-KDマウスとDMH-fLuc-KDマウスの間に、Circadian periodの有為な差は認められなかった。これにより、DMHのPrdm13は概日周期制御には影響が無いことが示された。そこで次に、Sleep deprivationへの反応性を検討した。対照群では、睡眠を剥奪されるとそれを補充し恒常性を維持するために、より深度の高い睡眠が導入される。具体的には、対照群では定常状態と比較すると、Sleep deprivation後には著しくNREM delta power 値が上昇した。一方、DMH-Prdm13-KDマウスでは、Sleep deprivation後に定常状態と比較して著しいNREM delta power 値の上昇は認められなかった。これにより、DMH-Prdm13-KDマウスは、睡眠恒常性制御機構の機能低下によりNREM delta power 値の低下、つまり睡眠の質の低下がもたらされていることが明らかになった。

Prdm13の発現調節のメカニズムとして、転写制御に着目して検討を行った。既に我々は、Prdm13の転写領域の上流にNkx2-1の結合配列が存在し、Nkx2-1がPrdm13の転写活性を調節していることを明らかにしている。今後はさらに、1) Nkx2-1がPrdm13転写領域に直接結合しているのか、2) Prdm13転写活性はSirt1依存的に制御されているのか、などを明らかにすることによりこの3つの分子の相互作用を明らかにする予定である。

■結論

本研究により、DMH特異的に発現しているPrdm13は、睡眠の質を維持する上で重要な役割を果たしており、老化に伴うPrdm13発現量低下が睡眠の断片化を引き起こし、睡眠の質的低下に繋がることが示された。また、Prdm13は概日周期には影響を与えずに睡眠恒常性制御機序を介して睡眠の

質を調節していることが明らかになった。これらの結果は、Sirt1/Nkx2-1/Prdm13シグナルが、老化現象・疾患を対象とした創薬スクリーニングの標的として有用な可能性を示唆している。加えて、睡眠恒常性制御に特異的に作用する漢方方剤やその関連化合物の探索に役立つことが予想される。今後、Sirt1/Nkx2-1/Prdm13シグナルを指標とした培養細胞系スクリーニングシステムを確立することにより、漢方方剤の有効性をより確立していくことが期待される。