

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「光を用いた睡眠の機能と制御機構の統
合的解析」

研究終了報告書

研究期間 2016年 10月 ～ 2023年 3月

研究代表者：柳沢 正史
(筑波大学 国際統合睡眠医科学研究
機構 機構長・教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

柳沢 G は大規模スクリーニングで発見した徐波睡眠を誘導する新規因 SIK3 のイメージングを中心に、生物学的実態が未解明の「眠気」の可視化を目標としてきた。CREST オプトバイオ領域の松田チームと共同で開発した SIK3 可視化プローブ Eevee-SIK と HyBRET-SIK を使い、培養細胞、脳スライス、線虫、マウスで SIK3 活性を可視化した。また、培養細胞を用いた SIK3 活性物質スクリーニングで新規化合物を発見した。さらに、脳での SIK3 活性イメージングではニューロン特有のシグナル伝達が明らかになった。今後、脳内での眠気発生との関連を解明する予定である。

睡眠覚醒制御においては、古典的な神経伝達物質のみならずモノアミン、アセチルコリンやペプチドなど G タンパク質を介する神経伝達が重要な役割を果たしている。そこで櫻井 G は、Gq 経路を駆動する光遺伝学ツールを開発し、睡眠覚醒制御に関わる神経機能の解析に役立てることを目的として研究を行った。哺乳類(ラット)のフォトプシン(vLWO)による Gi 経路の活性化に基づく神経抑制を in vivo で確認し、これをベースにした Gs あるいは Gq 活性化のツール開発を目指したが、難航したため方針を転向しメラノプシンを改変して用いることにした。メラノプシンと CRY を共発現することにより Gq 経路を効率よく光操作できる可能性を見出した。また、メラノプシンの C 末端を改変し、極めて高感度で興奮性の操作ができる系を確立した。近年見出したマウスに冬眠様の低体温状態(QIH)を誘導する系を評価系として用いて、ChR2 の 1/1000 程度の光強度($5 \mu\text{W}/\text{mm}^2$)で脳温に影響することなく、長時間(24 時間)にわたる低体温誘導が可能であった。きわめて高感度なため、LED をもちいた経頭蓋照射によるファイバーレスの光操作も可能であった。vLWO による扁桃体ニューロンの操作をもちいて、レム睡眠開始機構における扁桃体とドーパミンの役割も明らかにした。

坂口 G は当初予定した睡眠を制御する代謝分子の研究が予定より早く完成し、そこから多くの関連研究・特許の成果を得ることができた。とくにレム睡眠中の海馬の神経活動が記憶固定化を制御するメカニズムが次々と明らかになり、国際誌に計 15 報、うち坂口が責任著者で Neuron 誌を含む 13 報が掲載された。関連する特許も二件出願し、両方とも企業と共同研究に発展した。うち一件は実施許諾契約下で製品化が決定している。また、光を用いた実験の自動化に関する要素技術の多くが完成した。本研究の成果は、睡眠中のシナプス可塑性という新しい学問領域へ挑戦する様々な知識と技術基盤を構築した。また睡眠中の記憶の固定化メカニズムを利用し、PTSD を対象とした睡眠中の音を用いた新規治療法へと展開しつつある。

ラザルス G は光操作技術を応用し、モチベーション行動に関連する脳領域・側坐核が有する睡眠誘発機能を発見した。また、in vivo 光薬理学手法の開発において、光照射により化学構造が変化し、活性薬物が遊離する新規化合物の合成に成功した。さらに、光活性化可能なアデノシン A2A 受容体アロステリック調節薬を用いて、自由行動下のマウスに光化学的に睡眠を誘導することに初めて成功した。

睡眠の恒常性制御のメカニズムは不明である。断眠によって眠気が蓄積すると、その後の睡眠時間は増大する。この時、皮質脳波における睡眠中の徐波も増大し、睡眠の持続に伴い減弱していくことから、睡眠徐波は眠気の蓄積と解消を反映すると考えられている。しかし、この重要性にも関わらず、「眠気」の表出としての睡眠徐波の発生メカニズムは未解明である。フォクト G では、光遺伝学的な刺激に対する大脳皮質の応答を睡眠状態と覚醒状態で比較した。驚くべきことに、ノンレム睡眠時における応答は覚醒時のものに比べて非常に大きいことが判明した。応答の速さから考えると、上の現象は睡眠と覚醒における神経修飾物質の差に依存していると推測された。この仮説を検証したところ、応答の変動はノンレム睡眠時のフィードフォワード阻害の低下であることが明らかになった。我々の得た、覚醒時よりもノンレム睡眠時に大脳皮質の応答性が高まるという結論は、ノンレム睡眠の間に大脳皮質が回復機能のために活発に活動し

ているという事実を示唆している。

睡眠の大きな謎である「分子メカニズム」と「生理的役割」について、林 G では線虫を用いてイメージングや光遺伝学的手法を活用して研究を進めた。まず、睡眠制御に関わる遺伝子が哺乳類と線虫とで共通していることを確認するために、線虫で睡眠制御に必須な役割を担う AP2 転写因子がマウスの睡眠制御にも関わることを確認した。さらに、線虫で genome-wide random mutagenesis によって新たな睡眠制御因子を同定するために、線虫の睡眠のハイスループットな解析を可能とするイメージングの系を開発した。スクリーニングの結果、睡眠制御に関わる遺伝子を複数同定することに成功した。また、睡眠の作用も大きな謎であるが、こちらについても線虫で genome-wide random mutagenesis によって解明を試みた。短眠のため死にやすい変異体に対してランダムな変異を挿入することで、寝ないにも関わらず野生型線虫と同程度生育する変異体を複数単離した。これらの変異体の解析により、睡眠の役割の理解が大きく進むと同時に、寝なくても健康を維持できる方法の開発が進むものと期待される。

以上の研究を各グループで協力して実施することにより、柳沢チームは新たな光遺伝学的手法の開発と同時に、研究手段としての光遺伝学の先進性および優位性を生かし、睡眠医学における古典的問題から分子神経科学的な理解まで広範にわたる成果をあげることができた。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

成果のタイトル: マウスのフォワードジェネティクスによる新規睡眠遺伝子 SIK3 の発見

概要: SIK3 の発見は、本来小型モデル生物で行うフォワードジェネティクスによる新規遺伝子の探索をマウスで行った野心的なアプローチの結果である。これにより「眠気」という曖昧な概念に生物学的な説明がつく可能性が高まっている。しかし、この新規因子の生理的役割は依然謎が多い。新規に開発したイメージング技術で SIK3 の生理的動態を解明し「眠気」の分子実態に迫った。

成果のタイトル: 睡眠中の記憶固定化における細胞可塑性の役割

概要: 睡眠中の脳内では積極的に情報処理が行われるがそのメカニズムの理解は進んでいなかった。坂口 G では代謝分子の網羅的解析、生体イメージング、光遺伝学、深層学習などの最先端の技術を組み合わせることで、睡眠中の記憶固定化プロセスを分子から行動まで一貫したシステムとして解析を行った。特にレム睡眠中のそれにおいて神経細胞自身が置き換わる細胞可塑性を基調とした機構の統合的な理解を深めることができた。

成果のタイトル: 線虫を用いた睡眠の分子機構の解析

概要: 睡眠の分子メカニズムは脳科学上の大きな謎である。本研究では、世界で初めて、分子生物学の有用なモデルである線虫を用いたフォワードジェネティクスによる睡眠制御遺伝子の探索を実施した。そのために、線虫の睡眠のハイスループットな解析を可能とするイメージングの系を開発した。その結果、線虫から哺乳類まで広く睡眠制御に関わる遺伝子の同定に成功した。

成果のタイトル: レム睡眠の開始機構に関するドーパミンと扁桃体の新たな役割の発見

概要: 睡眠は、レム睡眠とノンレム睡眠を交互に繰り返すという特徴的な周期を持つが、このような睡眠サイクルがどのようにつくられているかはよく分かっていなかった。本研究では、ドーパミンレベリング光計測と関与する神経回路の光操作をもちいて、扁桃体基底外側核における一過性のドーパミン濃度の上昇がレム睡眠の開始に不可欠であることを見出した。さらに、睡眠障害・ナルコレプシー症状の一つでありレム睡眠関連症状であるカタプレキシーにおいても、覚

醒中におけるドーパミン濃度の一過性上昇が引き金であることを明らかにした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

成果のタイトル: 新規 Gq 経路を活性化するオプトジェネティックツールの開発

概要: マウス視床下部前腹側脳室周囲核(AVPe)に局在する、能動的低代謝に関与する神経細胞群(Q ニューロン)を新たに見出し、これらの興奮性操作によって、理論上の体温セットポイント低下を伴う数日間にわたる極端な体温低下状態および無動状態を惹起できることを見出した。この状態は冬眠動物における冬眠と似通っていた。これらの神経細胞群の SSFO や ChR2 をもちいた光操作により、Q ニューロンは視床下部背内側核に投射しその作用を惹起することを明らかにした。長期に持続する低代謝状態を維持するためには Gq を介した系が必要と考えられ Gq 経路を活性化するオプトジェネティックツールの開発のリードアウトの系として用いることが可能になった。C 末端を削除した hOPN4 を Q ニューロンに発現させることにより ChR2 の 1/1000 程度の光強度(5 μ W/mm²)で脳温に影響することなく、長時間(24 時間)にわたる低体温誘導が可能であった。

成果のタイトル: 次世代型超小型脳内視鏡の開発

概要: 自由行動条件下での生体脳内神経活動をイメージングが可能な、超小形蛍光顕微鏡が注目されている。今回、任意の入力光を利用できる新しい超小形蛍光顕微鏡の開発に成功した。本顕微鏡は観察と同時に任意波長での光遺伝学操作を可能にし、某企業と現在製品化が決定している。さらに現在 AI による神経細胞集団自動解析技術の実装を進め、新世代装置の開発も進めている。

成果のタイトル: アデノシン A_{2A} 受容体シグナリングの強化による新規不眠症治療法の開発

概要: アデノシン A_{2A} 受容体の正のアロステリック調節薬 (A_{2A}AR PAM-1)の同定に成功し、A_{2A} 受容体シグナルの強化が徐波睡眠(自然な睡眠の大部分を占める睡眠状態)を誘発すること、またそれが心血管系に影響を与えないことを見出した。このことから、内因性 A_{2A} 受容体シグナリングの強化が夜間の睡眠障害や精神障害に対する新しい治療戦略となる可能性が示された。さらに、広島大学の阿部学博士と共同で、可視光(420nm)で光活性化可能な「ケージド」A_{2A}AR PAM-1 を開発した。これを用いることにより自由行動下のマウスに光化学的に睡眠を誘導することに成功した。ここで我々が採用したアプローチは、ほぼすべての創薬標的に対して可視光で光活性化できる化合物を創出することに応用できると考えている。

< 代表的な論文 >

論文のタイトル: Kinase signalling in excitatory neurons regulates sleep quantity and depth. (Kim et al. Nature 612: 512-518, 2022)

A signaling pathway for transcriptional regulation of sleep amount in mice. (Zhou et al. Nature 612: 519-527, 2022)

概要: 睡眠は誰にでも必要ですが、なぜ眠らなければならないのかは現在でも謎です。本研究チームは、この謎を解く鍵となる酵素(SIK3)に注目していました。この酵素は睡眠に関わる脳内の反応の連鎖を調節し、睡眠の質と量を調整する分子のシグナルを形成します。しかし、SIK3 がどのような分子と連鎖を作ることで睡眠を制御しているのか、どの細胞を介して睡眠の量や質を決めているのかは分かっていませんでした。本研究では、その連鎖(分子シグナル)の詳細と、この分子シグナルが調節する遺伝子群を、世界で初めて明らかにしました。また、睡眠の質は大脳皮質の興奮性ニューロンが制御し、量は視床下部の興奮性ニューロンが制御することを見いだしました。ウイルスベクターを用いて、後天的に睡眠の量と質を変化させることで、この分子シグナルをさらに検証することにも成功しています。

論文のタイトル: Rapid eye movement sleep is initiated by basolateral amygdala dopamine

signaling in mice. (Hasegawa et al., Science 375: 994-1000, 2022)

概要: REM睡眠の開始には、扁桃体基底外側核における一過的なドーパミンシグナルが重要であることを見出した。

論文のタイトル: A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. (Takahashi et al., Nature 583:109-114, 2020)

概要: マウスの脳(視床下部)の一部に存在する神経細胞群を光遺伝学および化学遺伝学的に興奮させると、マウスの体温・代謝が数日間にわたって著しく低下することを発見した。この神経細胞群を Q ニューロンと名付け、この Q 神経を刺激することにより生じる低代謝を QIH と名付けた。体温セットポイント低下を伴う数日間にわたる極端な体温低下状態および無動状態は冬眠動物における冬眠と似通っている。

論文のタイトル: Sparse activity of hippocampal adult-born neurons during REM sleep is necessary for memory consolidation. (Kumar et al., Neuron 107:552-65, 2020)

概要: 成体脳では基本的にニューロンは新生しないが、海馬の一部ではヒトでも一生新しいニューロンが生まれ続ける。これらの新生ニューロンは記憶に重要な役割を果たすことが示されているが、その実態は明らかでなかった。今回自由行動条件下での生体脳内イメージングと光遺伝学技術を組み合わせることで、新生ニューロンがレム睡眠中に活動することが、記憶固定化に必要なことを明らかにした。

論文のタイトル: Slow-wave sleep is controlled by a subset of nucleus accumbens core neurons in mice. (Oishi et al., Nat Commun 8:734, 2017)

概要: 化学遺伝学的手法と光遺伝学的手法を用いた、アデノシン A_{2A} 受容体 (A_{2A}R) を発現する側坐核 (NAc) ニューロンの活動とそれが媒介する行動の遠隔操作により、側坐核ニューロンによる極めて強い徐波睡眠誘導能力を発見した。一方、動機付けの刺激はこれらの神経細胞の活動を抑制し睡眠量を減少させた。これらの結果から、NAc の睡眠誘導の役割が動機付け要因によって制御されていることが判明した。

§ 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「柳沢」グループ

研究代表者: 柳沢 正史 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構、機構長・教授)

研究項目

- ・睡眠制御因子の可視化

② 「櫻井」グループ

主たる共同研究者: 櫻井 武 (筑波大学医学医療系、教授)

研究項目

- ・代謝向性神経伝達を模倣する新規光遺伝学ツールおよび光で遺伝子発現を制御する新規技術の開発

③ 「坂口」グループ

主たる共同研究者: 坂口 昌徳 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構、准教授)

研究項目

- ・光遺伝学とメタボローム解析による眠気の化学的実態の同定

④ 「ラザルス」グループ

主たる共同研究者: ラザルス ミハエル (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構、准教授)

研究項目

- ・アデノシン受容体を利用した in vivo 光薬理学手法の開発と展開

⑤ 「フォクト」グループ

主たる共同研究者: フォクト キャスパー (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構、准教授)

研究項目

- ・睡眠徐波の制御機構の解明

⑥ 「林」グループ

主たる共同研究者: 林 悠 (京都大学大学院医学研究科、教授)

研究項目

- ・光遺伝学と線虫遺伝学を組み合わせた睡眠の生理的作用の解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

【坂口 G】

- 睡眠中の音刺激による PTSD の新規治療法開発について、臨床治験研究を開始した。
- 睡眠中のニューロンの活動観察については、東京大学狩野伸方教授との共同研究が複数の論文成果に結実した(Kumar ら, Neuron, 2021 など)。本研究にはエジンバラ大学、ネイサンクライン研究所(ニューヨーク)など多くの海外の研究者とのネットワークが形成された。
- シナプス可塑性について新たに領域内の柚崎通介教授との共同研究を開始した。

【ラザルス G】

- 広島大学の安倍学教授との連携により新規の光保護基 A400 を開発し、水溶性かつ紫色光による活性化のため細胞毒性を排除できる光ケージド化合物の合成に成功した。A400 は様々な薬物に応用可能なため、in vivo で特定の受容体活性を制御する新しい光学ツールとしての展開が期待される。
- ハーバード大学医学部 Radhika Basheer 教授と共同研究し、A400-ケージド YNT-378 (opto-YNT-378)の自由行動マウスでの睡眠誘発効果をオプト微小透析法による評価を進め

ている。

○中国温州医科大学 Jiang-Fan Chen 教授と共同研究し、パーキンソン病の新規 A_{2A}R 光治療法の開発に取り組んでいる。線条体におけるアデノシンドーパミン拮抗説に基づけば、A_{2A}R のブロックがパーキンソン病のドーパミン補充療法の効果を高めることが予想される。しかし、特定疾患の臨床応用に向けたアデノシン受容体リガンド開発は非常に困難であり、その原因はアデノシンが体全体に存在し様々な濃度で生理学的または病態生理学的な機能を持つことにある。この共同研究では、パーキンソン病やその他疾患のための光操作型 A_{2A}R 負のアロステリック調節薬の開発を目指す。