

## 38. 睡眠負債と体重負債の並行制御系の解明

東邦大学医学部 教授 船戸 弘正

### 概要

本研究の目的は、睡眠不足による「睡眠負債」と過剰な脂肪蓄積による「体重負債」を結ぶ脳内神経回路を解明することである。代表者らが発見したリン酸化酵素 SIK3 はその遺伝学的操作によって睡眠異常と体重異常の双方をきたすことから、SIK3 パスウェイを切り口として、睡眠制御と体重・エネルギー代謝制御の共通・独立神経基盤を同定することを目的とした。誘導要因の異なる睡眠様状態を比較する実験系を構築し、TRAP2: Ai9 マウスを用いた活動依存的全脳マッピング、DREADD 法による機能的検証、およびファイバーフォトメトリと GRAB センサーを組み合わせた神経修飾物質の動態計測を実施した。全脳マッピングにより、共通して活動する脳領域と条件特異的に活動する脳領域を同定した。DREADD 法による検証では、候補領域の再活性化によって睡眠様行動が誘導されることを確認した。またファイバーフォトメトリ解析から、行動・脳波上は類似した睡眠様状態であっても神経修飾物質の動態が条件間で質的に異なることを発見した。今後は視床下部における特定ニューロン集団の同定と機能的接続の解明を進め、睡眠と体重の制御が交差する分子・回路レベルの接点を明らかにすることが次の課題である。本研究の成果により新たな介入戦略の開発が期待される。

本研究助成により、多数の全脳切片の自動撮像に不可欠なオールインワン蛍光顕微鏡を整備することができた。これらの設備は本研究の遂行に不可欠であり、三菱財団のご支援が研究の推進に決定的な役割を果たした。ここに深く感謝申し上げる。

### 背景および目的

睡眠不足による「睡眠負債」と過剰な脂肪蓄積による「体重負債」は、いずれも心身に深刻な悪影響を及ぼす。両者の制御が密接に関連することは、うつ病などの気分障害において不眠・食思不振・体重減少が並存することからも示唆される。脳の視床下部は睡眠制御と摂食・エネルギー代謝制御の双方を担っており、両機能が重複する神経基盤の存在が予想される。しかし、視床下部には多数の神経核と多様なニューロンタイプが存在し、睡眠制御ニューロン群と体重制御ニューロン群が相互にどのように影響し合いながら両機能を統合的に制御しているかは明らかではなかった。

研究代表者らはマウスを用いた睡眠のフォワード・ジェネティクス研究を世界に先駆けて推進し、新たな睡眠制御分子としてリン酸化酵素 SIK3 を見出した。SIK3 の遺伝学的操作によりマウスが肥満やるい瘦を呈することが判明し、SIK3 パスウェイが睡眠と体重の双方の制御を担う共通の細胞内シグナル伝達系として機能することが示唆された。本研究では、SIK3 パスウェイに着目しながら、睡眠制御ニューロン群と体重制御ニューロン群を同定し、その活動をカルシウムイメージングと神経伝達物質の同時イメージングによって可視化するとともに、両ニューロン群の機能的接続を解明することを目的とした。

### 方法

#### 1. 実験モデルと条件設定

睡眠制御と摂食・エネルギー代謝制御に関わる神経回路の共通部位と非共通部位を切り分けるため、誘導要因の異なる3つの睡眠様状態を比較対象として設定した。自然睡眠（睡眠恒常性・概日リズムを反映）、消化管ペプチド投与による睡眠様状態（満腹・内臓感覚などの摂食関連シグナルを背景とする）、リボ多糖投与による睡眠様状態（炎症性の摂食抑制とエネルギー代謝変化を背景とする）の3条件である。行動レベルでは類似した休息・睡眠様状態を示しながら誘導メカニズムが異なることが、条件間比較の鍵となった。

## 2. TRAP2: Ai9 マウスを用いた活動依存的全脳マッピング

各条件における神経活動を全脳レベルで網羅的に捉えるため、神経活動依存的に Cre リコンビナーゼを誘導する TRAP2 系統と、Cre 陽性細胞で赤色蛍光タンパク質を発現する Ai9 系統を掛け合わせた TRAP2: Ai9 ダブルトランスジェニックマウスを用いた。4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）を投与することで特定の時間窓内に活動した神経細胞を蛍光標識し、3条件それぞれで活動した細胞群を全脳連続切片で比較解析した。大量の脳切片画像の取得と再構成には、本研究助成により導入したオールインワン蛍光顕微鏡（Keyence BZ-X810）の自動撮像・タイリング機能を活用した。

## 3. DREADD 法による候補領域の機能的検証

全脳マッピングで同定した候補領域について、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて DREADD（Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs）を発現させ、化学遺伝学的手法によって特定の神経細胞群を選択的に再活性化した。合成リガンド（CNO）投与後の行動変化および脳波変化を記録・評価することで、候補領域が睡眠様状態の誘導に果たす役割を検証した。また、二重標識法を用いて3条件間で活動細胞群の重なりと差異を細胞レベルで定量した。

## 4. ファイバーフォトメトリによる神経修飾物質の動態計測

RWD 社製3波長対応ファイバーフォトメトリシステムを用い、脳波・筋電図記録と同時に神経修飾物質の動態をリアルタイムで計測した。GRAB センサーを各ターゲット領域に AAV で発現させ、ドパミン・ノルアドレナリン・アデノシン・アセチルコリンの蛍光シグナルを条件間で比較した。これにより、睡眠段階の切り替わりと神経化学的変化の時間的対応関係を秒オーダーで評価した。

## 5. 視床下部特定ニューロン集団への遺伝学的介入

各種 Cre ドライバーマウスに AAV を脳内局所投与し、腹内側核および室傍核の特定ニューロン集団において SIK3 機能を亢進または抑制した際の睡眠量・体重変化を指標に、制御領域の絞り込みを行っている。また、室傍核のマイクロダイセクション検体を用いた Chromium（10X Genomics）による1細胞 RNA-seq 解析も進めており、絶食・レプチン投与条件下での各細胞クラスターの遺伝子発現変化の同定を予定している。

# 結果および考察

## 1. 全脳マッピングによる候補領域の同定

TRAP2: Ai9 マウスを用いた全脳マッピングにより、3条件に共通して活動する脳部位と、各条件に特異的に活動する部位を抽出することに成功した。共通して活動する領域は睡眠促進に普遍的な神経基盤を担う候補として、条件特異的な領域は摂食・炎症・概日性シグナルを睡眠調節に統合する回路の一部として位置づけられる。

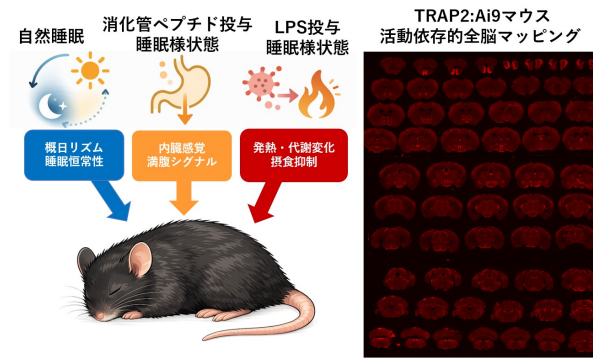


図 1. 睡眠制御の多層性

睡眠導入条件によって関与する神経集団が異なることを示す。

## 2. DREADD 法による機能的役割の確認

LPS 投与時に活動した細胞群を DREADD 法で再活性化したところ、複数の脳領域で睡眠様の行動変化を誘導できることを確認した。この結果は、マッピングで同定した候補領域が実際に睡眠制御に機能的に関与することを示す直接的な証拠となる。二重標識による解析からは、3 条件間で活動細胞群の重なりに明確なパターンがあることが示されており、睡眠制御回路の共通要素と状態特異的要素の分離が細胞レベルで進みつつある。

## 3. 睡眠様状態間の神経化学的差異

ファイバーフォトメトリ解析から、行動および脳波上は類似した睡眠様状態であっても、GRAB センサーによって可視化された神経修飾物質の動態が条件によって一様でないことが明らかとなった。この知見は、睡眠様状態が均一な脳状態ではなく、異なる神経化学的バックグラウンドの上に成立していることを示しており、睡眠と摂食・代謝シグナルの統合メカニズムを考える上で重要な示唆を与える。

## 4. 視床下部ニューロン集団と機能的接続

SIK3 が視床下部ニューロンを介して睡眠量やエネルギー代謝を制御することを示唆する結果が得られており、視床下部各神経核間の機能的接続の検証、および 1 細胞 RNA-seq による細胞タイプ特異的な遺伝子発現プロファイルの取得は現在進行中であり、睡眠制御と体重制御の分子・回路レベルの交点を明らかにしていく予定である。

以上の成果を総合すると、睡眠制御と摂食・エネルギー代謝制御は部分的に共通する神経基盤を持ちながらも、状態依存的に異なる神経回路と神経化学的メカニズムによって支えられる並行的な制御系として成立していることが示唆される。本研究で構築した多角的解析基盤をもとに、今後は睡眠恒常性とエネルギー恒常性を結ぶ神経回路の全貌解明を進め、不眠・肥満に関連する疾患への新たな介入戦略の開発に資する知見の蓄積を目指す。

(完)

## 発表論文

- 1) Natsuki Tagawa, Yousuke Tsuneoka, Hiromasa Funato  
Nest-Building Behavior in Laboratory Mice: Multifunctional Roles and Neural Mechanisms  
Neuroscience and Biobehavioral Reviews 178, 106377, 2025  
doi: 10.1016/j.neubiorev.2025.106377

- 2) Shinya Nakata, Tomoyuki Fujiyama, Fuyuki Asano, Haruna Komiya, Noriko Hotta-Hirashima, Motoki Juichi, Daiki Komine, Miyo Kakizaki, Aya Ikkyu, Seiya Mizuno, Satoru Takahashi, Chika Miyoshi, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa  
Partial activation of SIK3 delays the onset of wakefulness and alleviates hypersomnia due to the lack of protein kinase A-phosphorylation site  
SLEEP 48(2) zsae279, 1-14, 2025  
doi: 10.1093/sleep/zsae279
- 3) Deependra Kumar, Masashi Yanagisawa, Hiromasa Funato  
Sleep-dependent memory consolidation in young and aged brains  
Aging Brain 6:100124, 2024  
doi: 10.1016/j.nbas.2024.100124
- 4) Natsuki Tagawa, Keita Mori, Michinori Koebis, Atsu Aiba, Yuichi Iino, Yousuke Tsuneoka, Hiromasa Funato  
Activation of lateral preoptic neurons is associated with nest-building in male mice  
Scientific Reports 14, 8346, 2024  
doi: 10.1038/s41598-024-59061-z
- 5) Yousuke Tsuneoka, Hiromasa Funato  
Whole brain mapping of orexin receptor mRNA expression visualized by branched in situ hybridization chain reaction  
eNeuro ENEURO.0474-23.2024 , 1-42  
doi: 10.1523/ENEURO.0474-23.2024