

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	脳神経科学領域麻酔疼痛制御医学教育研究分野 氏名 大石将文
(論文題目) Endogenous neuropeptide S tone influences sleep-wake rhythm in rats (内因性神経ペプチド S はラットにおける睡眠覚醒リズムに影響を与える)	
(内容の要旨) はじめに ニューロペプチド S (NPS) は、外因的に投与された場合に覚醒促進、鎮痛作用、および抗不安作用を発揮する内因性ペプチドである。しかし、内因性の NPS が睡眠覚醒サイクル、または自発行動の制御に関与しているかは決定されていない。内因性の物質の生理活性を検証する際に受容体の拮抗物質を投与して効果を判定する方法は確立された方法である。 本研究では、選択的 NPS 受容体拮抗薬である [D-Cys(tBu) ⁵]NPS の生理的睡眠及び常同行動に対する効果を調べた。 材料と方法 本研究は弘前大学動物実験委員会の承認を得て行われた。研究には 350～430g の合計 37 匹の雄の Sprague-Dawley ラットを用いた。すべてのラットは、12 時間の明暗周期、室温 24±0.5℃、湿度 40% の環境で 1 週間以上飼育した上で手術を行った。この間の食物および水は自由に与えた。[D-Cys(tBu) ⁵]NPS は公開されている方法に従い共著者の Guerrini 博士が合成したものをを使用した。 手術と脳波記録 すべての手術は、ケタミン・キシラジン (35mg/kg および 5mg/kg) 麻酔下で行った。行動記録群では脳室内投与用カニューレを移植し、10 日間を回復期間とし飼育した。睡眠記録群では、脳室内投与用カニューレ、脳波および筋電図導出用電極を装着した。手術後にラットを睡眠記録室へ移動させ、各電極と信号増幅器のケーブル接続を行い、記録環境に馴化させるため睡眠記録室内で室温 24±0.5 °C、12 時間明暗周期の条件で 10 日間飼育した。 EEG は 0.5Hz 以下および 40 Hz 以上でのフィルタリングを行い、128Hz でデジタル化しフーリエ解析を行った。データは 10 秒区切りで保存し、それぞれ覚醒、ノンレム睡眠 (NREMS)、レム睡眠 (REMS) の 3 状態に分類、判定した。判定は従来報告されている基準に従い行った。 実験プロトコル 睡眠の研究では、始めに生理的食塩水を脳室内投与しコントロール EEG の計測を行った。[D-Cys(tBu) ⁵]NPS の脳室内投与の量は 0 nmol 群、2.0 nmol 群、20.0 nmol 群の 3 群 (それぞれ n = 7) に分けた。コントロール計測とは別の日に脳室内投与を行い EEG の計測を行った。脳室内投与は暗期の開始時 (AM8:00) で行った。	

行動の研究では、生理食塩水群と [D-Cys(^tBu)⁵]NPS 20nmol 群の 2 群（それぞれ n = 8）に分けた。テスト 1 時間前にラットを実験室に移動させ環境に馴化させた後、脳室内投与を行った。脳室内投与 30 分後に正方形のプラスチックケージ（60 cm×60 cm）に入れ、ラットの行動を 5 分間記録した。中央ゾーンはケージの中央 30cm×30cm と定義し、ラットの移動総距離と中央ゾーンで過ごした時間を計測した。

値はすべて平均±SEM として表記。統計分析は睡眠には ANOVA 法と Bonferroni 法、行動には T 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的な有意水準とした。

結果

コントロールの睡眠記録ではラットの通常の日内変動を示した。0 nmol 群、2.0 nmol 群では、コントロールとの間に有意差を認めなかった。20nmol 群では覚醒時間の減少（control 782.5±25.5 分 vs treatment 751.7±28.2 分、 $p = 0.012$ ）を認め、NREMS 時間の増加（control 572.6±17.2 分 vs treatment 600.2±26.1 分、 $p = 0.028$ ）を認めた。REMS 時間には統計学的に有意な差を認めなかった。（control 84.9±26.2 分 vs treatment 88.1±28.3 分、 $p = 0.628$ ）。

行動の研究では、総移動距離と中央ゾーンで過ごした時間共に生理食塩水群と [D-Cys(^tBu)⁵]NPS 20nmol 群の間に有意差を認めなかった。

考察

本研究では、[D-Cys(^tBu)⁵]NPS は覚醒時間を減少させ NREMS 時間を増加させることが判明した。過去の研究で外因性 NPS が生理的睡眠と薬物による睡眠両方の睡眠時間を減少させると報告されており、NPS の覚醒促進作用を示唆している。今回の結果は、選択的 NPS 受容体アンタゴニストである [D-Cys(^tBu)⁵]NPS が、生理的睡眠覚醒調節における内因性 NPS の役割を阻害することにより、覚醒時間の減少と NREMS 時間の増加を示したと考えられる。

本研究では、[D-Cys(^tBu)⁵] NPS の NREMS に対する効果は REMS より優位性を示した。哺乳類の生理的な睡眠では、最初に覚醒から NREMS へ状態が移行し、その後 REMS が発生する。睡眠中は NREMS と REMS の周期が繰り返される。種によって周期の長さに違いはあるが、生理的な睡眠では REMS の成立には先行して NREMS が成立する必要がある、NREMS は REMS より介入の影響を受けやすいといえる。したがって、[D-Cys(^tBu)⁵] NPS の NREMS に対する効果が REMS より優位性を示したことは、内因性の NPS は生理的な睡眠構造を生成するメカニズムに関与していることを示している。

本研究では、[D-Cys(^tBu)⁵] NPS 自体はラットの常同行動に影響を及ぼさなかった。別の種類の NPS 受容体アンタゴニストである [^tBu-D-Gly⁵] NPS や SHA 68 でも同様の結果が報告されている。また別の研究では、NPS 受容体ノックアウトマウスと野生型マウスとの間の常同行動に差がなかったと報告されている。これらの結果は、内因性 NPS / NPS 受容体経路が常同行動の制御に影響を及ぼさないことを示唆している。

本研究で用いた [D-Cys(^tBu)⁵] NPS は、いくつかの研究グループにより NPS の作用を調査するため使用されているが、これまで NPS 受容体以外への効果は報告されていない。したがって、本研究では [D-Cys(^tBu)⁵] NPS の NPS 受容体遮断によって覚醒の減少が誘発された直接的な証拠はないが、我々はオフターゲット効果による可能性は極めて低いと考えている。

結語

今回の結果から NPS / NPS 受容体経路は、生理的な睡眠構造に関与しているが、運動活性の増強には関与していないと示唆された。NPS / NPS 受容体経路は異常な行動を誘発することなく、睡眠調節に応用できる可能性を秘めていると考えられた。