氏名（本籍）	宮崎　峻弘
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第　9739 号
学位授与年月	令和　3　年　1　月　31　日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	睡眠覚醒と恒常性における局所皮質回路の摂動

主　査	筑波大学教授	医学博士	高橋　智
副　査	筑波大学教授	博士（医学）	桝　正幸
副　査	筑波大学教授	博士（医学）	武井　陽介
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	中馬越清隆

論文の内容の要旨

宮崎峻弘氏の博士学位論文は、運動学習において主要な役割を果たす部位である運動野の皮質ニューロンにおける、睡眠による神経活動および局所皮質回路の動態を調べたものである。その要旨は以下のとおりである。

目的：著者は、運動学習において主要な役割を果たす部位である運動野の皮質ニューロンにおける、睡眠による神経活動および局所皮質回路の動態を調べるため、遺伝子工学と二光子イメージングを用いて、皮質ニューロンのニューロンタイプを特定した上で、NREM、REM 睡眠および覚醒における大脳皮質運動野ニューロンの神経活動、局所回路の functional connectivity（FC）を観察して解析を行っている。

対象と方法：著者は、マウスの in vivo におけるニューロンタイプを特定するため、Vgat-ires-Cre マウスと Ai9 tdTomato reporter マウスを交配して Vgat-tdTomato マウスを作製し、一次運動野（M1）において 99%の抑制性ニューロンに tdTomato が発現していることを確認している。Vgat-tdTomato マウスの M1 の 2/3 層の皮質ニューロンにカルシウム濃度依存蛍光タンパク質 GCaMP6s を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入し、注入部の直上にガラスのイメージングウィンドウを取り付け、筋電図、脳波電極の埋めこみ、ヘッドプレートの取り付けを行っている。顕微鏡観察下で睡眠を取れるように頭部固定したまま、トラックボール型トレッドミルに馴化させた後、脳波筋電図を測定の下、二光子顕微鏡を用いて二光子カルシウムイメージングを行っている。著者は、得られた画像から、個々のニューロンの興奮および抑制性のニューロンタイプ、および蛍光強度を解析し、NREM、REM 睡眠および覚醒における個々のニューロン毎における神経活動の変化を調べている。局所回路の変化を調べるため、graphical Gaussian model を導入して、個々の神経活動の FC を解析するとともに、ニューロン間の距離と FC についての解析も行っている。さらに、回復睡眠下における神経活動および局所回路の変化についても解析を行っている。

結果：著者は、NREM、REM 睡眠および覚醒における神経活動は、ニューロンタイプによらず、NREM 睡眠で最も低下し、REM 睡眠で最も上昇することを明らかにしている。また、個々のニューロンの神経活動でも、半数は REM 睡眠で高い活動性を示したものの、約 30%は覚醒で最も高い神経活動を示した

ことを明らかにしている。また、FC の形成は REM 睡眠で増加、NREM 睡眠で減少し、その傾向は抑制性ニューロン同士でより強く認めたが、一方で FC の強度については分布の差はあるものの、平均としてはほとんど差を認めなかったことを明らかにしている。さらに、FC が形成されやすいニューロンペアは、睡眠覚醒で変化しない一方で、強度の強いペアは睡眠覚醒に伴い大きく変化したことを明にしている。著者は、断眠及び回復睡眠における神経活動について、断眠中は自発的な覚醒と比較して興奮性ニューロンで神経活動が低下し、回復睡眠では自発的な NREM 睡眠に対して差がないことを明らかにしている。一方で、FC は自発的な覚醒と比較して、断眠中に特に抑制性ニューロン同士で増加して大きく強化されたが、その後の回復睡眠では、自発的な NREM 睡眠と比較し FC の形成は減少し、弱化したことを明らかにしている。また、ニューロン同士の距離と FC は、300μm 以上離れたニューロン同士の大きな変化があること、抑制性ニューロン同士の FC において、NREM、REM 睡眠で増加したが、それらのニューロン同士の FC は、断眠および回復睡眠では減少し、強度も低下することを明らかにしている。

考察：著者は、ニューロンタイプによらず、多くのニューロンは REM 睡眠もしくは覚醒において最も神経活動が高いことを明らかにしており、これまでの電気生理学的な結果と概ね一致する結果を得ている。断眠や回復睡眠でも神経活動に大きな変化を認めなかったが、これらの神経活動の変化は、視床からの神経伝達等による膜電位の変化などが生じた結果と考えられると考察している。一方で、断眠では睡眠圧の上昇から脳波の徐波化を認めたが、徐波は個々のニューロンの神経活動だけの変化を反映しているわけではないことが示唆されたと考えている。著者は、運動学習には長期増強が必要であるが、学習後には飽和し長期増強の余地はほとんど残されておらず、NREM 睡眠中に脱飽和すると考えられているが、FC がシナプス可塑性を反映しているとすると、NREM 睡眠における FC の減少は低頻度のシナプスによる長期増強の弱化を示している可能性が示唆されると考えている。また、断眠で FC が増加、強化していき、回復睡眠で減少、弱化することは、多くの長期増強が飽和していき、睡眠により脱飽和する様子であると考察している。また REM 睡眠は新たな運動学習の維持を行うとされており、REM 睡眠の FC 増加は長期間での学習内容の維持の役割を示している可能性があると考えている。また、FC はニューロン間の距離による変化を認め、運動野における潜在的なクラスター構造を示唆する結果であり、このような曖昧なクラスター構造が新規の運動への適応や可塑性に関係している可能性があると考えている。

結論：著者は、睡眠覚醒における運動野の皮質ニューロンの神経活動およびニューロン間の FC についての解明を行っている。二光子カルシウムイメージングによって、睡眠覚醒によって変化する個々のニューロンにおける神経活動を観察し、変化を捉えている。また、それらの相互変化を解析することによって得られた FC からは、睡眠覚醒間でダイナミックに変化する様子を明らかにしている。これらの変化は、睡眠が持つ機能が局所皮質回路の動態の生理的変化として捉えられたものと考えられる。

審査の結果の要旨

（批評）

著者は、脳波筋電図を測定の下、二光子顕微鏡を用いて二光子カルシウムイメージング確立するとともに、局所回路の変化を調べるため、graphical Gaussian model を導入して、個々の神経活動の FC を解析する方法を確立している。本方法は、睡眠の生理学的な機能を解析することができるだけでなく、長期の神経活動変化を解析できる方法として、非常に応用範囲の広い手法と考えられ、高く評価できる。

令和 2 年 11 月 13 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。