

## 論文の内容の要旨

# A time window for granule cell fate decision in the mouse olfactory bulb linked with feeding and postprandial rest/sleep behaviors

(摂食・休眠行動に関連したマウス嗅球顆粒細胞の生死決定時間枠の存在)

横山 健

嗅覚系の1次中枢である嗅球では、抑制性神経細胞である顆粒細胞（以下GC）が成体においても側脳室周囲（SVZ）で生まれ、回路に組み込まれていく。これら新生GCの生死は、嗅上皮からの末梢嗅覚入力に依存して決定されており、生後1ヶ月の間に約半数は嗅球神経回路に組み込まれるが、残りの半数は細胞死によって除去されていく。しかし、新生GCの回路への組み込みや除去が、動物のどのような行動や時間枠に対応して起きるのかは不明であった。私は本研究において、特に嗅覚系の機能と関係が深い摂食行動に注目し、新生GCの細胞死が、動物の覚醒時の嗅覚経験に依存して、食後の睡眠・休憩時に起きることを明らかにした。

私はまず、摂食行動を一定の時間帯に起こさせるため、餌を毎日決められた時間のみ与えた（11:00-15:00）。この摂食制限を始めてから10日後に、食餌開始前と2時間後に固定し、嗅球全体での活性化caspase-3陽性細胞数を計測すると、食餌直前（11:00）に比べて、食餌開始から2時間後（13:00）では、細胞死の数は約2.4倍に増加していた。一方で、摂食時間以外では細胞死の顕著な増加は見られなかった。摂食時間帯を11:00-15:00ではなく、21:00-1:00にした場合でも、食餌開始2時間後に細胞死の数が有意に増加した（図1）。新生GCをBrdUで標識して、食後に起こる細胞死のどの程度の割合が新生GCかを調べると、生まれてから14-28日の生死決定の臨界期に対応する新生GCの細胞死が、GC全体の細胞死の約半数の割合を占めていた。一方、顆粒細胞層を移動中の生後7-13日の新生GCの細胞死は食餌開始後2時間でも増えていなかった（図2）。

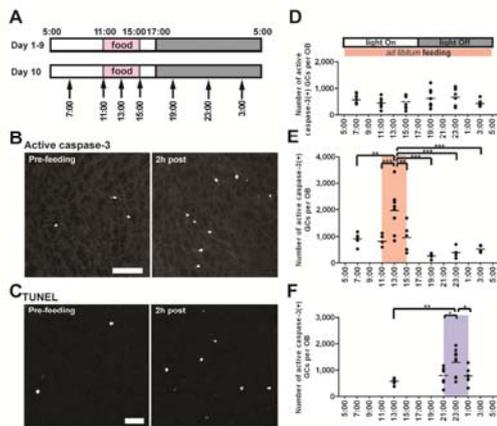
食餌開始後 2 時間の間に、マウスの行動は熱心な摂食行動から、徐々に毛づくろいや休憩・睡眠へと移っていく。そこで、食後 2 時間での新生 GC の細胞死の増加には、餌を食べることと食餌後の休憩・睡眠のどちらが重要であるかを調べた。摂食時間に何も餌を与えない、あるいは餌の匂いだけ与えた場合でも GC の細胞死は増加しなかった。また、餌は食べさせるが食後の休憩・睡眠を阻害すると、GC の細胞死は増加しなかった (図 3)。

さらに、大脳皮質の EEG 記録と首筋から EMG 記録を行い、摂食開始 2 時間後の GC の細胞死の数と睡眠の長さとの相関を見ると、Non-REM 睡眠時間の長さ、GC の細胞死の数の間に強い正の相関があった (図 4)。これらの結果は、餌を食べることと食後の休憩や睡眠が、GC の細胞死を引き起こす重要な要因であることを示唆する。

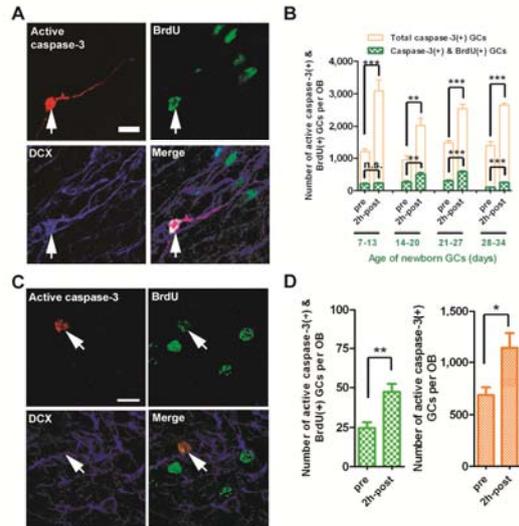
次に、末梢嗅覚入力が、食後休憩・睡眠時の新生 GC の細胞死増加に与える影響を調べた。片側の鼻腔を焼灼により閉塞し図 1 と同じ時間で動物を固定し、食餌前と食餌開始後 2 時間で GC の細胞死を観察すると、鼻腔閉塞をした側の嗅球では、摂食開始後 2 時間で細胞死の数が激増した (食餌前に比べて約 7 倍)。また、食餌時間以外では、鼻腔閉塞をした側の嗅球でも GC の細胞死は増加しなかった。BrdU 投与実験から、鼻腔閉塞した側の嗅球で食後 2 時間に細胞死を起こす GC の約半数は生後 14-20 日の新生 GC であることが示された。これらの結果から、食後休憩・睡眠時に起きる嗅球新生 GC の細胞死は、嗅上皮からの嗅覚入力に大きく影響をうけることが示された (図 5)。

最後に、食後休憩・睡眠時に起きる GC の細胞死の増加が、長期の摂食制限の方法に依らずに起きることを示した。9 日間自由摂食で飼っていたマウスで、実験日当日 4 時間程度絶食させ、その後餌を与えて睡眠を確認してから固定すると、GC の細胞死が食餌前に比べて有意に増加した。そして、この細胞死の増加は食後の休憩・睡眠を阻害することで観察されなくなった (図 6)。一方、絶食を全くさせずに自由摂食下で飼っていたマウスを観察し食後の休憩・睡眠を確認してから固定すると、餌は食べたが寝なかった群に比べて GC の細胞死の数が増えていた (図 7)。これらの結果は、餌を食べた後に GC の細胞死が増える現象は、長期摂食制限下だけでなく自由摂食下でも起きることを示す。

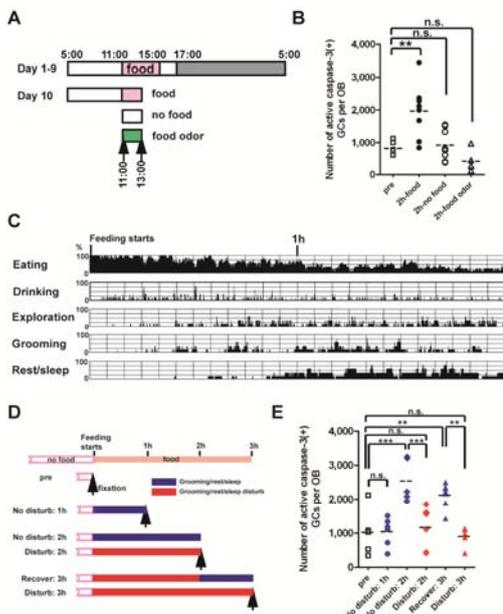
図 8 は、嗅球の GC 生死選別機構は覚醒摂食時と食後睡眠時の 2 段階で行われると考える私の仮説の模式図である。新生 GC の生死決定は、覚醒時の末梢嗅覚入力による細胞・シナプス単位での選別目印と、睡眠中の嗅皮質からの生死振り分けシグナルの協調により行われる可能性を示している (参考: Manabe et al., *J. Neurosci.*, 2011)。



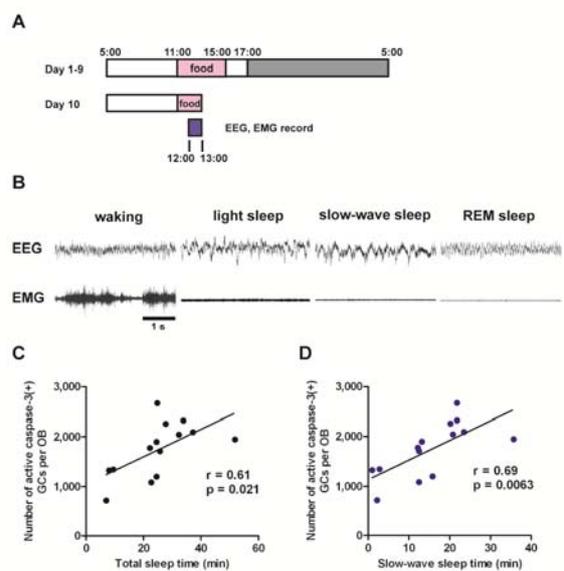
**図1** 摂食開始2時間後での嗅球顆粒細胞 (GC) の細胞死の増加 (D) 餌が自由に与えられている条件下では、GCの細胞死の平均値は一日を通して差がなかった。(A) しかし、餌を毎日決められた時間のみ与え摂食行動を揃えると、餌を食べ始めてから2時間後(13:00)ではGCの細胞死は摂食開始前(11:00)に比べ約2倍に増えていた(B, C, E)。餌を与える時間を昼間から夜に移しても、細胞死の数は餌を与える直前に比べて食べた後2時間後では有意に増えていた(F)。



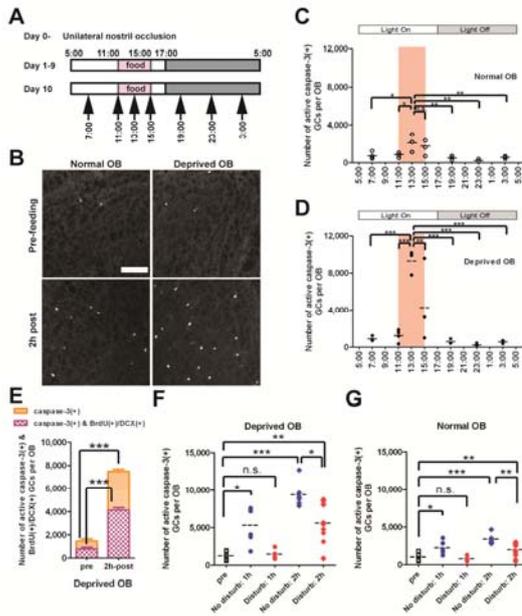
**図2** 摂食後2時間で死んでいくGCの半数以上は新生GCであった(A, B) 様々な age の新生 GC を BrdU で標識すると、生死決定の臨界期(誕生後 14-28 日)にある GC が最も多く死んでいた。しかし、より age の進んだ GC や (28-34 日)、新生児の時に生まれた既存の GC も割合は少ないが摂食後2時間で死ぬ数が増えていた(図C, D, P4, 5)。



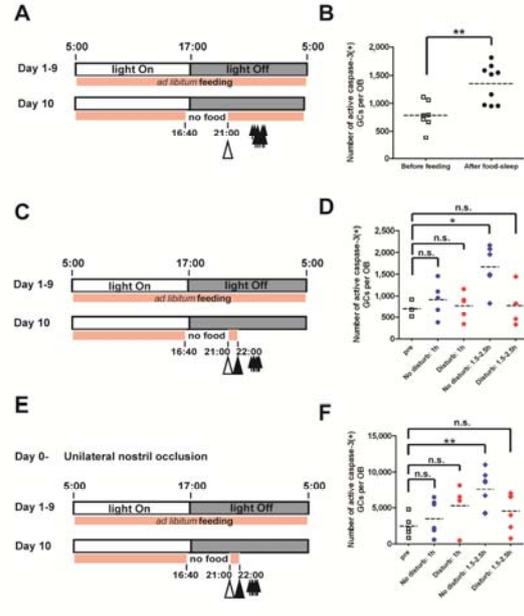
**図3** 餌を食べることと食後の休憩や睡眠が GC の細胞死には重要である (A, B) 餌時間に餌を与えなかったり、餌の匂いだけ与えても、2時間後に細胞死の増加は観察されなかった。(C) この摂食制限の方法下では、マウスは餌を食べ始めて1時間はほとんど餌だけ食べているが、その後の1時間は休憩や毛づくろい、睡眠の割合が増えてくる。(D, E) 食後の休憩や毛づくろいを阻害すると、自由にさせた場合に比べて細胞死はほとんど増えなくなる。睡眠阻害後の回復で、細胞死は再び増加する。



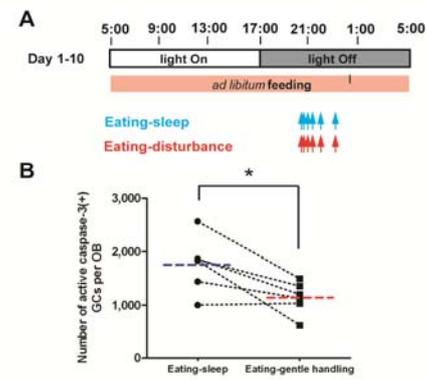
**図4** 食後の睡眠の長さが長いほど(特に NREM)、細胞死も多くなる (A) 食後の睡眠を、大脳皮質 (EEG) の脳波と首の筋電図 (EMG) から評価した。(B) 行動中のマウスから EEG と EMG を記録し、4つの覚醒状態に分けることが出来た。(C-E) 食後の睡眠時間が長いほど細胞死の増加も多くなり、特に Non-REM 睡眠の長さや細胞死の数の増加には正の相関があった (REM に関しては観察数が少ないため、現時点では結論は出せない)。このことと、図3の結果から、食後の睡眠が摂食後の GC の細胞死の増加には重要な要因であることが示された。



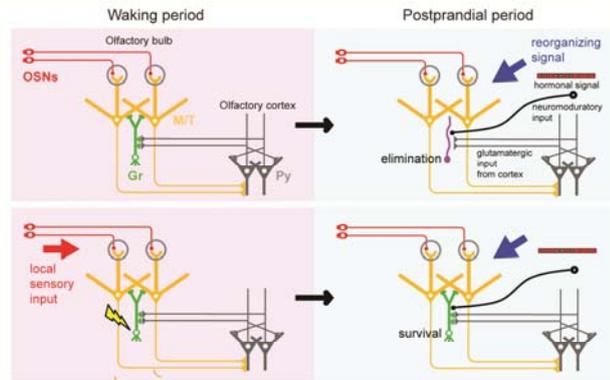
**図5** 嗅覚入力遮断が食後睡眠・休憩時に起る GC 細胞死に与える影響 (A) 摂食制限が始まる前に片側の鼻腔を焼灼により閉塞した (10日間)。(B-D) 末梢からの嗅覚入力がない嗅球では、いつも細胞死が増えるわけではなく、食餌時間に限定して細胞死の増加が観察された。さらに、その増加の程度は、鼻腔閉塞しない嗅球での増加に比べてさらに4倍程度増加していた。(F, G) 鼻腔閉塞した嗅球においても、摂食後の睡眠・休憩を阻害すると細胞死の増加は全てではないが部分的に阻害された。



**図6** 短期の摂食制限でも、餌を食べて休憩した後は細胞死が増える (A, B) 摂食制限を10日間行わず、通常の ad libitum feeding で飼っているマウスで、実験日当日の活動期に4時間だけ急に餌を抜き、その後餌を与え、寝るのを待ってから固定すると、摂食前に比べて GC 細胞死が増えていた。(C-D) さらにこの急性に餌を抜いた実験でも、摂食後の休憩・睡眠を阻害すると、細胞死の増加は観察されなかった。(E-F) 鼻腔閉塞した嗅球でも、摂食後に細胞死は増加しこの増加は食後の休憩・睡眠の阻害で抑制された。



**図7** 通常の ad libitum feeding 条件下でも、餌を食べた後の休憩・睡眠時には GC の細胞死が増えた。(A, B) ad libitum feeding のマウスにおいても、餌を食べて寝た後を見計らって固定すると、餌を食べても寝なかった・休憩を阻害した群に比べて細胞死は増加していた。このことは、摂食後の休憩・睡眠後に GC の細胞死が起きるのは、摂食制限という特別な条件下ではなくても起きることを示している。図で破線で繋がれた個体のデータは、同日の同時刻と一緒に固定されたペア。



**図8** 摂食睡眠後に嗅球において行われる GC 生死振り分け選別方法の作業仮説 (左上) 嗅球の GC は、EPL において投射ニューロンの mitral/tufted cell との reciprocal synapses だけではなく、特に proximal dendrite において嗅皮質から多くのグルタミン酸性興奮入力を受けている。(左下) 動物が覚醒中、餌を探したり食べ物の匂いを嗅ぐと、嗅上皮から odorant map に従ってある糸球体が活性化し、それにぶら下がっている GC もまた活性化される。この末梢からの入力は、GC の生存を亢進させるような分子カスケードを活性化し、それと並行してシナプス部においてその後の記憶の固定化の目印・基質となる "tag" をつける。(右、上下) マウスが食後睡眠・休憩に入ると嗅皮質から同期した強い入力が嗅球に入ってくる。この時、覚醒時に tag が付いていたかどうかで、その後生き残り回路に組み込まれるか除去されるかが決定される。