

## 【総説】

## 第13回 高安賞最優秀論文賞受賞

論文 「Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways」  
 The Journal of Clinical Investigation  
 第124巻第2号 604~616ページ 平成26年2月掲載

## オレキシンニューロンは2つの異なる神経経路でナルコレプシーを抑制する

長谷川恵美 (はせがわ えみ)

## 1. はじめに

私たちは、睡眠をとることで心身の健康を維持し、また記憶の強化を行っている。人生の約3分の1を眠って過ごしており、睡眠は必要不可欠であることが知られているが、重要な面接中や危険な作業中など起きているべき時に突然眠り込んでしまうと困る。脳には睡眠システムと覚醒システムが存在し、適切なタイミングで両者が切り替わる。この制御に重要な役割を担っているのが、神経ペプチド・オレキシンである。オレキシンニューロンが変性する(オレキシンシグナリングが欠損する)と、睡眠障害・ナルコレプシーが発症する。これは、不適切なタイミングで睡眠と覚醒が切り替わってしまう病気である。特徴的な症状に、日中の非常に強い眠気(ひどいと突然気絶するように眠ってしまう睡眠発作が起こる)と情動脱力発作(気持ちが高ぶった時に全身が脱力し倒れ込む)がある。症状の本質は、覚醒・睡眠の各相(覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠)が適切に維持できないことである。睡眠にはノンレム睡眠とレム睡眠の二種類があり、入眠の際にはまずノンレム睡眠が出現し、一定時間経過してからレム睡眠に移行する。夢を見るのは主にレム睡眠中であるが、夢の内容が実際に行動に移されないようにレム睡眠中は殆どの筋が脱力している。睡眠発作は覚醒を維持できずノンレム睡眠が病的に出現したもの、情動脱力発作は覚醒中にレム睡眠の特徴である脱力が起きたものと考えられる。したがって、オレキシンは覚醒の維持に重要と考えられる。

オレキシンは1998年にオーファンG蛋白質共役型受容体(GPCR)のリガンドとして報告された<sup>1)</sup>。オレキシン-A、-Bは共通の前駆体(プレプロオレキシン)から生成される。受容体は、オレキシン1受容体(OX1R)、オレキシン2受容体(OX2R)の2つのサブタイプが存在する。どちらもG<sub>q/11</sub>ファミリーのGタンパク質に共役し、ニューロンに対して強力な興奮性作用を及ぼす。オレキシンニューロンの細胞体は視床下部・脳弓周囲野のみに限局するが、小脳を除く中枢神経系の全域に投射している。特に、睡眠・覚醒調節に重要な役割を果たすモノアミン作動性ニューロンの起始核である青斑核、背側縫線

核、結節乳頭体核、コリン作動性ニューロンの起始核である外背側被蓋核や脚橋被蓋核等に密な投射がみられる。これに対応してOX1R、OX2Rは中枢神経系の広範な領域に発現するが、両者の発現パターンは異なる<sup>2)</sup>。例えば、青斑核ではOX1R、結節乳頭体核ではOX2Rのみであるが、縫線核ではOX1RとOX2Rの両方に発現している。ラットやマウスで、覚醒調節に関わるモノアミン作動性、コリン作動性神経核にオレキシンを投与すると、自発運動量・覚醒が亢進する<sup>3)</sup>。脳スライスにおいてもオレキシンは、これらのニューロンに興奮性の作用をもつ<sup>3)</sup>。しかし、オレキシン投与により興奮し覚醒が亢進したとしても、そのニューロンが内因性のオレキシンによって刺激され生理的条件下において睡眠・覚醒調節に重要な役割を果たすということを意味していない。

## 2. オレキシンニューロンの直接の下流でナルコレプシーを抑制する脳領域の探索

オレキシンノックアウトマウスやOX1R;OX2Rダブルノックアウトマウス(OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>)、オレキシンニューロンを変性させたOrexin/ataxin-3マウスは、ヒトのナルコレプシーと酷似した病態を示す<sup>3)</sup>。脳波・筋電図上、覚醒からレム睡眠へ直接移行する現象が頻繁に観察され、これは行動レベルでは情動脱力発作に対応する。また覚醒持続時間が大幅に短縮しており(覚醒の断片化)、強い眠気や睡眠発作を反映する指標となる。そこで本研究では、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて、OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>マウスの様々な脳領域で局所的にオレキシン受容体発現をレスキューし、情動脱力発作、覚醒の断片化が改善するかを検討した。もし症状が改善すれば、当該領域はオレキシンニューロンの直接の下流でナルコレプシーを抑制すると考えられる。標的とした脳領域は、オレキシン投与により興奮し、また覚醒の亢進に関与すると考えられている以下の4部位を対象にした: 青斑核(ノルアドレナリン作動性)、背側縫線核(セロトニン作動性)、結節乳頭体核(ヒスタミン作動性)、脚橋被蓋核(コリン作動性)。後二者では効果が見られなかった。

2-1. 背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンは情動脱力発作を抑制

*OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>*マウスの背側縫線核に組換え AAV (AAV-EF1 $\alpha$ -OX2R-EGFP) を局所感染させて、ユビキタスなプロモーター (EF1 $\alpha$ ) 制御下で OX2R 発現のレスキューを試みた。野生型マウスの背側縫線核には OX1R, OX2R の両受容体が発現している<sup>2)</sup>ので、オレキシン A, B 両方に高親和性を示す OX2R のみを回復させた。抗 TPH 抗体 (セロトニン作動性ニューロンの分子マーカー: Tryptophan Hydroxylase antibody) と抗 GFP 抗体 (OX2R-EGFP を検出) を用いて蛍光二重染色を行った結果、セロトニン作動性ニューロンの 72.0 $\pm$ 3.2% に

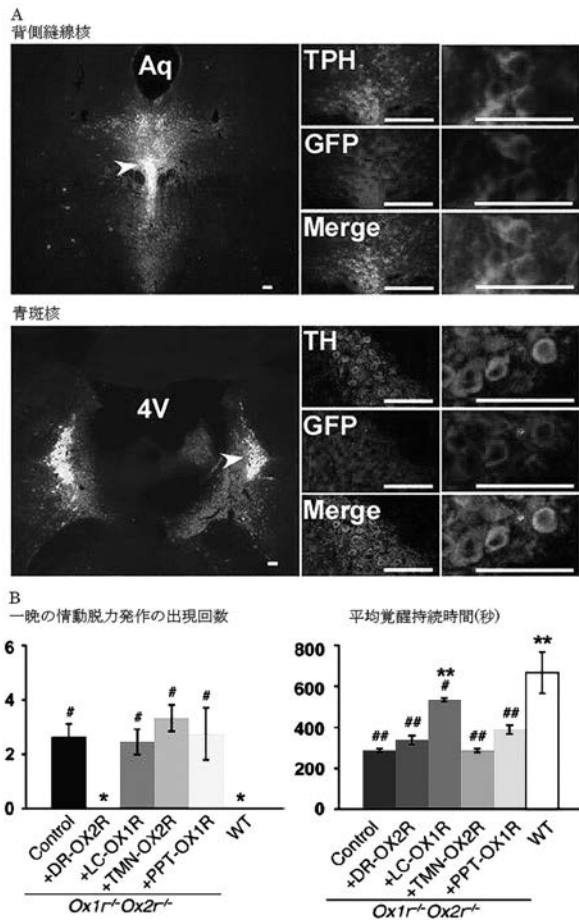


図 1. オレキシン受容体発現のレスキューを背側縫線核と青斑核で行うと、それぞれ情動脱力発作と覚醒の分断化が抑制された。

A) EF1 $\alpha$  プロモーター制御下で OX1R/OX2R:EGFP を発現させた。抗 TPH (セロトニン作動性ニューロンのマーカー) / TH (ノルアドレナリン作動性ニューロンのマーカー) 抗体 (緑) と抗 GFP 抗体 (赤) による二重染色。  
 B) *OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>* マウス (Control) と比較し、背側縫線核で OX2R:EGFP を発現させた *OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>* マウス (+DR-OX2R) は情動脱力発作が抑制され、青斑核に OX1R:EGFP を発現させたマウス (+LC-OX1R) は平均覚醒持続時間が増加した。TMN: 結節乳頭体核, PPT: 脚橋被蓋核, WT: 野生型マウス \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. Control, ##P < 0.01 vs. WT

OX2R-EGFP が発現していた (図 1A)。

野生型マウスにおける覚醒から睡眠への移行は、始めにノンレム睡眠に移行し、1分以上のノンレム睡眠が経過した後にレム睡眠が出現する。一方、*OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>* マウスでは覚醒からレム睡眠へ直接移行する現象が頻繁に観察され、これは行動レベルでは情動脱力発作に対応する。背側縫線核に組換え AAV を注入したが OX2R 発現をレスキューできなかったマウスや EGFP のみを発現させたマウス (Control) では、情動脱力発作が観察された。一方、背側縫線核に OX2R 発現をレスキューしたマウス (+DR-OX2R) は、情動脱力発作がほぼ完全に抑制された。覚醒の平均持続時間には有意な増加はみられず、ナルコレプシーのもう 1 つの特徴的な症状である覚醒の分断化は抑制されなかった (図 1B)。前述の実験ではオレキシン受容体を発現させるためにユビキタスなプロモーターを用いたため、感染領域内で本来オレキシン受容体を発現していない細胞にもオレキシン受容体発現が生じた。また感染領域内には複数タイプのニューロンが混在しているため、オレキシンニューロンが背側縫線核のどのニューロンタイプを活性化することで情動脱力発作を抑制することができるのか明らかでない。この問題を解決するために、ユビキタスなプロモーター (EF1 $\alpha$ ) からニューロンタイプ選択的なプロモーターに置き換え、同様の実験を行った。

背側縫線核では、転写因子 Pet1 遺伝子のプロモーターを用いて、セロトニン作動性ニューロン選択的に OX2R を発現する組換え AAV (AAV-Pet1-OX2R-EYFP) を作製した。OX2R-EYFP を発現したニューロンの 88.9 $\pm$ 2.5% がセロトニン作動性ニューロンで、選択性が改善した。

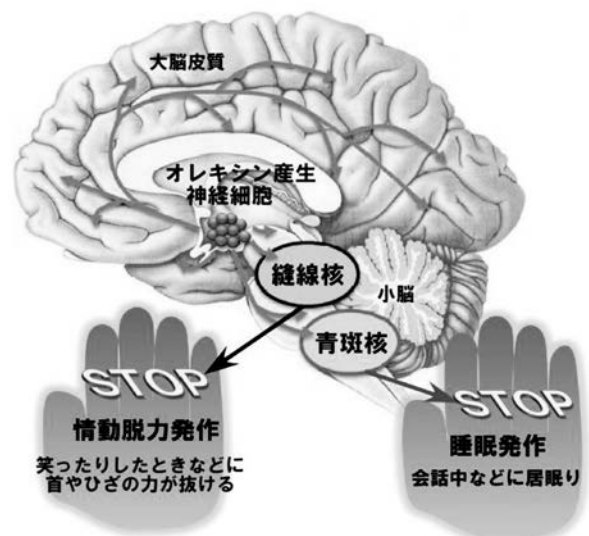


図 2. 本研究で明らかになったオレキシンニューロンの直接の下流で覚醒を安定化させる神経経路。背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンが情動脱力発作を、青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンが睡眠発作をそれぞれ異なる神経経路で抑制する。

AAV-Pet1-OX2R-EYFPを用いて背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンでOX2R発現をレスキューしたマウスでも、情動脱力発作をほぼ抑制され、覚醒の分断化は改善されなかった。

## 2-2. 青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンは覚醒の分断化を抑制

上述の実験同様、*OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>*マウスの青斑核に組換えAAV(AAV-EF1 $\alpha$ -OX1R-EGFP)を局所感染させて、ユビキタスなプロモーター(EF1 $\alpha$ )制御下でOX1R発現のレスキューを試みた。青斑核には主にOX1Rが発現している<sup>2)</sup>。ノルアドレナリン作動性ニューロンの分子マーカー(Tyrosine Hydroxylase: TH)に対する抗体と抗GFP抗体(OX1R-EGFPを検出)を用いて蛍光二重染色を行った結果、ノルアドレナリン作動性ニューロンの83.2 $\pm$ 3.7%にOX1R-EYFPが発現していた(図1A)。

活動期において、*OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>*マウスでは、野生型マウスに比べて短い覚醒相が多く出現する(覚醒の分断化)。*OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>*マウスの青斑核に組換えAAVを注入したがOX1R発現をレスキューできなかったマウスやEGFPのみを発現させたマウス(Control)では、覚醒の分断化が改善しなかった。一方、青斑核にOX1R発現をレスキューしたマウス(+LC-OX1R)は、Controlマウスに比べ覚醒持続時間が有意に増加し覚醒の分断化が改善したが、情動脱力発作の発生は抑制されなかった(図1B)。

次に、オレキシンニューロンがどのニューロンタイプを活性化することでナルコレプシーが改善されたか明らかにするために、ノルアドレナリン作動性ニューロン選択的プロモーター(PRSx8:合成ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素遺伝子プロモーター)制御下でOX1Rを発現する組換えAAV(AAV-PRsx8-OX1R-EYFP)を用いて同様の検討を行った。青斑核でのノルアドレナリン作動性ニューロンに対する選択性(TH;EYFP二重陽性細胞数/EYFP陽性細胞数)は88.6 $\pm$ 2.6%であった。AAV-PRsx8-OX1R-EYFPを用いて青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンでOX1R発現をレスキューしたマウスでも、Controlマウスと比較すると覚醒の平均持続時間が有意に延長し覚醒の分断化が改善した。しかしながら、青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンにOX1R発現をレスキューしたマウスでも、野生型マウスと比較すると覚醒持続時間が有意に短かった。覚醒を正常に保つためには、青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロン以外の別の脳領域がオレキシンニューロンにより活性化される必要があると考えられる。

## 2-3. 背側縫線核、青斑核の人為的活性化によりナルコレプシーを抑制

薬理遺伝学的手法を用いて、背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンや青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンを人為的に活性化することでナルコレプシーを改善することができるか検討した。DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug) は人工

的に改変したムスカリン受容体で、アセチルコリンに対する応答性を失う一方で、合成化合物clozapine-N-oxide (CNO) に応答する(CNO自体は生理活性を持たない)。Gq共役型のM3ムスカリン受容体由来のDREADD (hM3Dq) をCNOで活性化することで、人為的にニューロンを興奮させることができる<sup>4)</sup>。この実験では、ヒトのナルコレプシーの病態をより正確に反映した、オレキシンニューロンが生後特異的に変性するOrexin/ataxin-3マウスを用いた。組換えAAVベクター(AAV-Pet1-hM3Dq, AAV-PRsx8-hM3Dq)を用いてOrexin/ataxin-3マウスの背側縫線核・セロトニン作動性ニューロン、あるいは青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンにhM3Dqを発現させた。78.4 $\pm$ 1.5%の背側縫線核・セロトニン作動性ニューロン、83.1 $\pm$ 1.0%の青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンで選択的に、hM3Dqが発現した。暗期(活動期)の開始時にCNOを腹腔内投与すると、背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンの活性化では情動脱力発作が、ノルアドレナリン作動性ニューロンの活性化では覚醒の断片化が顕著に抑制された。

## 3. おわりに

本研究では、オレキシンニューロンの直接の下流で覚醒を安定化させる神経経路を初めて明らかにした。背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンの活性化は情動脱力発作を抑制し、青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンの活性化は覚醒断片化を大幅に改善することができた。すなわち、ナルコレプシーに特徴的な2つの症状は、異なる2つのニューロンメカニズムにより抑制されることを見出した。今回の成果はナルコレプシーのみならず、不眠症などさまざまな睡眠障害の対処に応用できると考える。

OX1RノックアウトマウスやOX2Rノックアウトマウスでは情動脱力発作はほとんど見られず、両者を欠損して初めて頻繁に情動脱力発作が出現するようになる。背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンにはOX1R、OX2R両方が発現しており、またネコにおいて5-HT1A受容体アゴニストを局所投与し、背側縫線核・セロトニン作動性ニューロンを抑制すると情動脱力発作が誘発される<sup>5)</sup>という知見とも一致する。

また、ラットを用いて青斑核周囲にオレキシンAを局所投与すると主にレム睡眠が抑制され、覚醒が亢進する<sup>6)</sup>。しかし、今回の結果では、オレキシンニューロンによる青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンの活性化は情動脱力発作には殆ど影響を与えず、覚醒の分断化のみ抑制された。この事実は、薬理的なオレキシン投与と実験の結果が必ずしも生理的条件下での睡眠・覚醒調節機構を反映しないことを示している。一方で、青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロン選択的にOX1R発現をレスキューしても、野生型マウスに比べて覚醒持続時間は有意に短かった。従って、正常状態を維持するには、青斑核・ノルアドレナリン作動性ニュー



ロンに加えて、他の神経経路がオレキシンニューロンによって制御される必要があると考えられる。OX2Rノックアウトマウスでも覚醒の分断化は観察されるが、OX1R<sup>-/-</sup>;OX2R<sup>-/-</sup>マウスの方がより重度の分断化を示す。青斑核はOX1Rを内因性に発現するので、OX2Rを発現する青斑核以外の脳領域におけるオレキシンによる制御が、覚醒の分断化を完全に抑制するのに必要であると考えられる。

DREADDシステムを用いてナルコレプシー症状を抑制できたことは、次のような新たなコンセプトの遺伝子治療法にもつながるのではないかと考える。まず、有効性・安全性が保証された人工化合物-人工受容体のペアを開発する。その人工受容体の遺伝子を必要最小限のニューロンに導入して人工受容体をつくらせる。その後、人工化合物を服用して当該ニューロンを適切なタイミングで活性化することで症状を抑える。この方法により、莫大な費用と時間のかかる創薬プロセスを経ず、より多くの疾患に新しい治療方法として提供できることが期待される。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導とご助言を頂いた金沢大学大学院医薬保健研究域医学系分子ニューロン科学・統合生理学 櫻井武教授や三枝理博准教授、テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター（現 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構）柳沢正史教授に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Sakurai T, et al : Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585, 1998
- 2) Marcus JN, et al: Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, 435: 6-25, 2001
- 3) Sakurai T : The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*, 8(3): 171-181, 2007
- 4) Armbruster BN, et al : Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci*, 104(12): 5163-5168, 2007
- 5) Sakai K, et al. : Role of dorsal raphe neurons in paradoxical sleep generation in the cat: no evidence for a serotonergic mechanism. *Eur J Neurosci*, 13(1): 103-112, 2001
- 6) Bourgin P, et al : Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci*, 20(20): 7760-7765, 2000



## Profile

2015年3月 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科博士課程修了  
 同年4月～ 日本学術振興会特別研究員 (PD)  
 現在、オレキシンを中心とした睡眠・覚醒制御機構の解明にさまざまな実験手技を用いて取り組んでいる。