

【要約】

修士課程優秀論文

光遺伝学のおよび薬理遺伝学的手法による  
視索前野GABA作動性神経の操作

Optogenetic and pharmacogenetic manipulations of preoptic area GABAergic neurons

金沢大学大学院医学系研究科分子神経科学・統合生理学  
(生理学第二)

齊 藤 夕 貴

1. はじめに

オレキシンは1998年に同定された神経ペプチドであり、オレキシン産生ニューロン(オレキシンニューロン)は摂食中枢である視床下部外側野(LHA)に局限して存在している<sup>1)</sup>。オレキシンニューロンは小脳を除き、中枢神経系全域に投射している(図1)。オレキシンニューロンの脱落が睡眠障害のひとつであるナルコレプシーの原因であることが示され、オレキシンは覚醒系の重要な制御因子であると考えられている<sup>2)</sup>。また、オレキシンニューロンは摂食行動およびエネルギー恒常性に関する視床下部の核や、大脳辺縁系の報酬系などさまざまなシステムからの情報を受け、睡眠覚醒状態を維持する役割を持っていることが明らかとなってきた。

視床下部視索前野(preoptic area; POA)の特に腹側外側視索前野(ventrolateral preoptic area; VLPO)は1996年にノンレム睡眠の開始および維持に主要な役割をすることが報告された<sup>3)</sup>。この部位の電気刺激により覚醒が抑制されてノンレム睡眠が誘発されるが、逆に破壊することで不眠となることが報告されている<sup>4)</sup>。このVLPOの神経はGABA作動性であり、ヒスタミンニューロンの起始核である結節乳頭核(Tuberomammillary nucleus; TMN)、ノルアドレナリンニューロンを含む青斑核(Locus Coeruleus; LC)、セロトニンニューロンを含む縫線核(Raphe)など脳幹の覚醒ニューロンを抑制することで睡眠の発現および維持に関与していると考えられている。

本研究ではin vivoでの睡眠の制御およびオレキシンニューロンの制御における視索前野のニューロンの役割を解明するために、光遺伝学的(optogenetics)および薬理

遺伝学的手法(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug; DREADD)<sup>5)</sup>を用いてGAD1-Creノックインマウスの視索前野のGABA作動性ニューロンを特異的に操作し、オレキシンニューロン活動と睡眠覚醒状態に対する影響を検討した。

2. 結果

薬理遺伝学的刺激によるマウスの脳波の変化

今回使用したGAD1-Creノックインマウスは、GABA作動性神経特異的にCreリコンビナーゼが発現している。このマウスの視索前野(POA)にFLEXスイッチシステムを組み込んだAAVベクターを投与することでPOAのGABA作動性ニューロンにhM3DqやChR2を発現させることが出来る<sup>6)</sup>。

POAのGABA作動性神経の刺激により実際にマウスの睡眠にどのような影響が出ているかを検討するべく、Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD)という薬理遺伝学的手法を用いて刺激を行った。

まず、hM3Dqを組み込んだAAVをPOAに投与し、その発現を確認した。ムスカリン受容体の人工変異体であるhM3Dqは内在性のアセチルコリンには反応せず、Clozapine N-oxide (CNO)という人工的な薬剤にのみ反応してGq共役型のシグナル伝達を引き起こす。その結果として脱分極が惹起される。

CNO投与によりPOAのGABA作動性神経が興奮作用を受けているかを確認するべく、神経興奮のマーカーとして利用される*c-fos* (Fos)の発現量を検討した。POAは腹側外側視索前野(VLPO)と内側視索前野(MPA)の2つに分けて観察したところ、hM3Dqを発現させた個体では、CNO投与2時間後のFosの発現量がVLPO (Saline: 8.4 ± 3.4個, CNO: 15.0 ± 5.9個)とMPA (Saline: 53.5 ± 8.1個, CNO: 147.9 ± 28.3個)で共に増加していた。

次に、CNO投与後のマウスの脳波を記録し、周波数により覚醒(WAKE)・ノンレム睡眠(NREM)・レム睡眠(REM)の3段階に分類した。hM3Dqを発現させたマウスにCNOを投与すると、暗期に投与した場合は投与後3時間における覚醒時間が有意に減少し、ノンレム睡眠時間については有意な増加が見られた。レム睡眠に関しては有意な差は見られなかった。

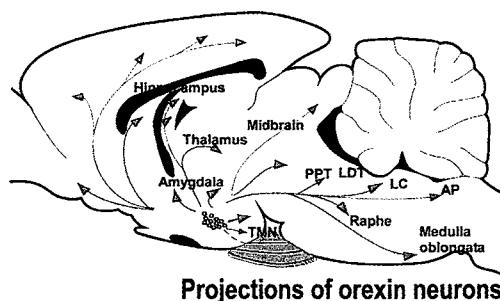


図1. オレキシンニューロンは小脳を除き、中枢神経系全域に投射している。

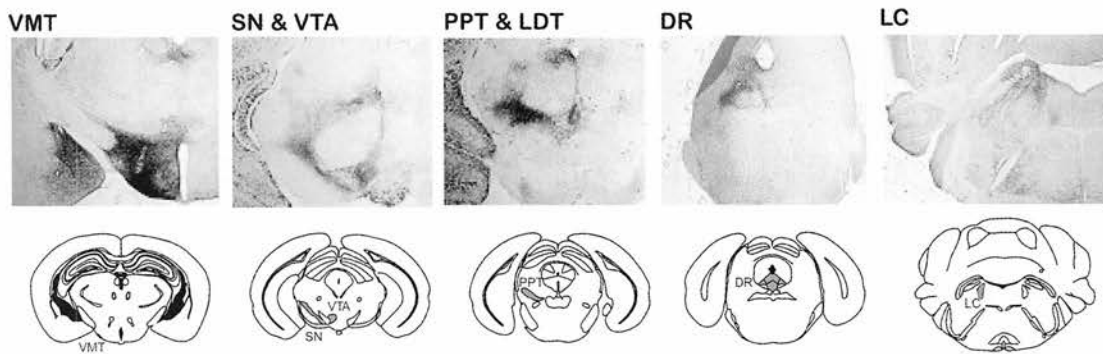


図2. 覚醒に重要とされるモノアミン作動性神経・コリン作動性神経などが存在する部位にも視索前野GABA作動性神経の投射が確認された。

また、CNOを明期に投与した場合にも、ノンレム睡眠にのみ有意な増加が見られた。

#### ChR2発現部位の観察

hM3Dqの場合と同様に、ChR2を組み込んだAAVをPOAに投与すると、POAにChR2の発現が見られるとともにオレキシンニューロンの存在するLHAにもChR2が発現する線維が見られた。さらに、LC・DR・TMN・LDTをはじめとした覚醒に重要とされるモノアミン作動性神経・コリン作動性神経が存在する部位にもChR2の発現が確認され、これらの部位に投射していることが確認された(図2)。

これらの部位において二重蛍光抗体染色を行ったところ、POAのGABA作動性神経はオレキシンニューロンや覚醒に重要な神経細胞にも投射していることが確認された。

#### in vitro光刺激によるオレキシンニューロンの活動の変化

POAのGABAニューロンにChR2を、LHAのオレキシンニューロンにtdTomatoを発現させたマウスのスライス標本を用いて、赤色蛍光を指標にホールセルパッチクランプを行い、同時に周辺のChR2陽性線維を470nmのLED光源を用いて光刺激した。電流固定法記録下で10Hzの光刺激により刺激前と比較して発火頻度が約28%減少した( $72.4 \pm 6.5\%$ ,  $98.0 \pm 5.2\%$ ;  $n=4$ )。この反応には再現性があり、2度目の光刺激においてもほぼ同様の反応が見られた。

また、GABA<sub>A</sub>受容体のアンタゴニストであるBicuculline ( $20 \mu\text{M}$ ) の投与により、光刺激の効果は消失した。 $(98.8 \pm 1.8\%$ ,  $102.2 \pm 4.7\%$ ;  $n=3$ )。

#### in vivo光刺激によるオレキシンニューロンのfos発現量の変化

GABA作動性神経を興奮させるとオレキシンニューロンの活動がどのような影響を受けるかを検討するべく、ChR2を発現させたマウスに光刺激を行い、オレキシン神経のFos発現量を計測した。ウイルス投与部位に473nmのレーザー光を15Hzで90分間照射した後、固定を行い脳サンプルを採取した。

明期(WT:  $23.35 \pm 3.43\%$ , Tg:  $12.98 \pm 2.15\%$ )、暗期(WT:  $23.52 \pm 4.71\%$ , Tg:  $4.64 \pm 1.93\%$ )のいずれの時間においてもオレキシンニューロンのFos発現量は有意に減少しており、オレキシンニューロンの活動が抑制されていることが明らかとなった。

#### 4. まとめ

これまで、VLPOへの電気刺激により覚醒が抑制されてノンレム睡眠が誘発されることや、逆に破壊することで不眠となることが報告されている。さらに、VLPOの神経がGABA作動性およびガラニン作動性の投射をしており、GABA作動性神経がノンレム睡眠の誘発に関与していることは推測されているが、その生理的な関連は現在もあまり解明されていない。

本研究において、ChR2を用いた光刺激により視索前野のGABA作動性神経を特異的に刺激することでオレキシンニューロンの活動が抑制されることがin vivo, in vitroのいずれの条件下においても確認された。また、DREADDを用いた視索前野GABA作動性神経の活性化は覚醒時間の減少と覚醒持続時間の短縮を引き起こすことにより、ノンレム睡眠時間を増加させた。以上のことから、視索前野GABA作動性神経は視床下部のオレキシンニューロンの活動を抑制するために重要な働きをもち、ノンレム睡眠を引き起こす一因となっていることが示唆された。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました分子神経科学・統合生理学講座の櫻井武教授、三枝理博准教授、辻野なつ子助教に心より御礼申し上げます。

また、本研究にご理解を頂きました同研究室の皆様と、日々の研究生生活を支え励ましてくれた友人や家族に深く感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) Sakurai T, et al. Orexins and Orexin Receptors: *Cell* 92, 573-585 (1998).
- 2) Chemelli, R. M. et al. *Cell* 98, 437-451 (1999).
- 3) Sherin, J. E., et al. *Science* 271, 216-219 (1996).
- 4) Lu, J. et al. *J Neurosci* 20, 3830-3842 (2000).
- 5) Atasoy, D. et al. *J Neurosci* 28, 7025-7030 (2008).
- 6) Armbruster BN, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5163-5168 (2007).



#### Profile

(所属) 金沢大学医薬保健研究域医学系  
技術職員  
2011年3月 金沢大学医学部保健学科検査  
技術科学専攻卒業  
2013年3月 金沢大学大学院医学系研究科  
修士課程修了