

【要約】

修士課程優秀論文

オレキシンニューロンの機能を担う下流ニューロンの探索

Search for neurons mediating functions of orexin

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)

長谷川 恵 美

はじめに

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) リガンドとして報告された¹⁾。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。オレキシンの受容体には、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。一般に、どちらの受容体を介する作用もオレキシンは神経細胞に対して強力な興奮性作用を及ぼす。オレキシン産生ニューロン (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。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²⁾。オレキシニングナリングの欠損により、ナルコレプシーが生じる³⁾。ナルコレプシーとは、日中の耐え難い強烈な眠気、喜びや驚きなどの強い感情が働いたときに誘発される脱力発作 (カタプレキシー)、睡眠麻痺、入眠時幻覚を主要症状とする睡眠障害である。ナルコレプシーの症状は覚醒・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に本質があり、覚醒・睡眠の断片化 (覚醒相と睡眠相の間の相転移が頻繁に起こる)、覚醒相から直接レム睡眠に移行する睡眠開始レム睡眠 (sleep-onset REM sleep: SOREM) 現象の出現や非常に短い睡眠潜時が特徴的である。従って、オレキシンニューロンは覚醒の維持に重要な役割を果たすと考えられる。事実OX1R, OX2Rの発現も特に睡眠・覚醒調節に関わる神経核 (青斑核, 背側縫線核, 結節乳頭体核, 等) で発現レベルが高い。オレキシンをラットに脳室内投与すると、自発運動量・覚醒が亢進する⁴⁾。また脳スライスにおいてもオレキシンは、覚醒を亢進すると考えられている様々なニューロンに興奮性の作用をもつ。しかしながら薬理的に外因性のオレキシンにより興奮する事が必ずしも、内因性のオレキシンによって制御され生理的な条件下の睡眠・覚醒を制御する事を意味していない。

本研究は、組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて、OX1R; OX2Rダブルノックアウト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、ナルコレプシーの症状が改善するかどうかを検証することで、生理的条件下で、オレキシンニューロンの直接の下流として睡眠・覚醒調節に重要な役割を果たす神経回路を同定することを目的とした。

結 果

組換えAAVを投与するマウスは、OX1R; OX2Rダブルノックアウト (OX1R; OX2R DKO) マウスを用いた。こ

のマウスは、オレキシンニューロンは正常だが、OX1R, OX2Rが共に欠損している。そのため、ナルコレプシー症状を呈する。

組換えAAVの投与領域は、オレキシン受容体の発現レベルが高く、また睡眠・覚醒調節に関与すると考えられている特定の脳領域で特にオレキシン陽性線維が多く観察される部位を対象に行った。

背側縫線核

最初のステップとして、ユビキタスなプロモーター (EF1a) の制御下でOX2Rを発現する組換えAAV (AAV-EF1a-OX2R-EYFP) を用いてオレキシン受容体発現の回復を試みた (図1)。

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²⁾ので、オレキシンA,B両方に高親和性を示すOX2RのみをOX1R; OX2Rダブルノックアウトマウスの背側縫線核に回復させた。セロトニン作動性ニューロンの分子マーカー (Tryptophan Hydroxylase antibody: TPH) と抗GFP抗体 (OX2R-EYFP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62.2±2.8%にOX2R-EYFPが発現していた。

正常マウスにおける覚醒から睡眠への移行は通常、まずノンレム睡眠に移行し、レム睡眠は一分以上のノンレム睡眠を経過した後でないとい現れない。一方、ナルコレプシーモデルマウスでは覚醒からレム睡眠へ直接移行する現象 (SOREM) が頻繁に観察され、これは行動レベルではカタプレキシーに対応すると考えられている。縫線核に組換えAAVを注入したがOX2R-EYFPが発現しなかったマウスやEGFPのみを発現させたマウスでは、

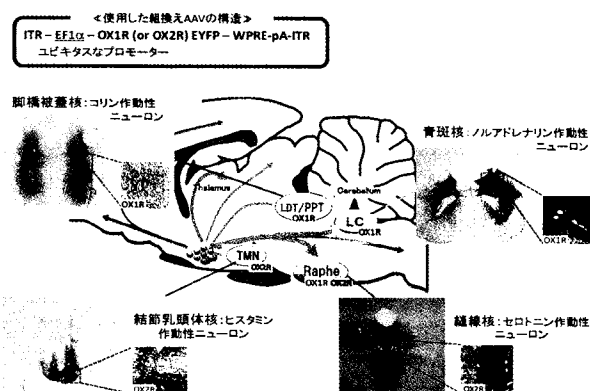


図1. 組換えAAVを用いて様々な脳領域で局所的にオレキシン受容体発現をレスキュー。

SOREMがしばしば観察された。一方、縫線核にOX2Rの発現を回復させるとSOREMの発生はほぼ完全に抑制された。対照的にナルコレプシーのもう一つの主症状、覚醒の分断化に関しては、覚醒の平均持続時間に有意な変化は見られず、覚醒の分断化は抑制されなかった。

前項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ない細胞にも異所性のオレキシン受容体発現が生じた。また、本来オレキシン受容体を発現しているニューロンに関して、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ので、オレキシン作動性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様症状が改善されたか、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 (EF1a) からニューロンタイプ特異的なプロモーターに置き換えた。

縫線核に対しては転写因子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特異的にOX2Rを発現する組換えAAV (AAV-Pet1-OX2R-EYFP) を作成した。AAV-Pet1-OX2R-EYFPは、背側縫線核での感染効率 (TPH; EYFP二重陽性細胞数/TPH陽性細胞数) はEF1aとほぼ同じであったが、セロトニン作動性ニューロンに対する特異性 (TPH; EYFP二重陽性細胞数/EYFP陽性細胞数) は $88.7 \pm 2.2\%$ で、ほぼセロトニン作動性ニューロン特異的な発現が見られた。AAV-Pet1-OX2R-EYFPを用いて背側縫線核でOX2Rを発現させても、AAV-EF1a-OX2R-EYFPと同様に、SOREMがほぼ消失した。

青斑核

青斑核には主にOX1Rの受容体が発現している²⁾ので、まず始めにユビキタスなプロモーターを用いたAAV-EF1a-OX1R-EYFPを注入しOX1Rの発現を回復させた (図1)。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-EYFP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 $69.0 \pm 2.7\%$ にOX1R-EYFPが発現していた。

青斑核に組換えAAVを注入したが発現しなかったマウスやEGFPのみを発現させたマウスの覚醒持続時間はそれぞれ 318.8 ± 15.9 秒、 304.1 ± 18.0 秒であったのに対し、青斑核にOX1Rの発現を回復させると覚醒の平均持続時間が 551.0 ± 27.4 秒に延長し、覚醒の分断化を有意に改善できた。しかしながら、SOREMの頻度は有意に変化しなかった。

次に、背側縫線核での実験同様、オレキシン作動性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様症状が改善されたか明らかにするために、青斑核ではノルアドレナリン作動性ニューロン特異的なプロモーター (合成dopamine β -hydroxylase遺伝子プロモーター) 制御下でOX1Rを発現する組換えAAV (AAV-NA-OX1R-EYFP) を用いて同様の検討を行った。青斑核での感染効率 (TH; EYFP二重陽性細胞数/TH陽性細胞数) はEF1aとほぼ同じであったが、ノルアドレナリン作動性ニューロンに対する特異性 (TH; EYFP二重陽性細胞数/EYFP陽性細胞数) は $90.0 \pm 2.8\%$ あり、ほぼノルアドレナリン作動性ニューロン特異的な発現が得られた。AAV-NA-OX1R-EYFPで青斑核にOX1Rを発現させても、AAV-EF1a-OX1R-EYFPの場合と同様、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。

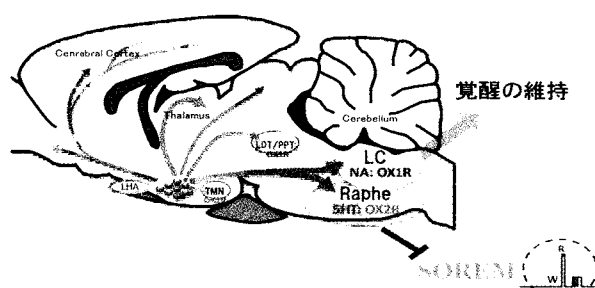


図2. 睡眠・覚醒制御においてオレキシン神経の直接の下流として重要な役割を果たす神経回路を同定。

考 察

OX1R, OX2Rどちらか一方の欠損マウスではSOREMはほとんど見られず、両者を欠損して初めて頻繁にSOREMが出現するようになる。背側縫線核のセロトニン作動性ニューロンにはOX1R, OX2R両方の発現が見られる。これらの知見は、背側縫線核がレム睡眠のゲーティングに重要との今回の結果とよく一致する。

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³⁾。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SOREMの頻度には殆ど影響を与えず、覚醒の持続時間が延長した。この事実は、薬理的なオレキシン投与実験の結果が必ずしも生理学的条件下での睡眠・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特異的にOX1Rを発現させても、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、覚醒の分断化を完全に解消するには、青斑核・ノルアドレナリン作動性ニューロンに加えて、他の神経回路がオレキシン作動性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 KOマウスでも覚醒の分断化は観察されるが、OX1R; OX2R DKO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いずれかの脳領域のオレキシンによる制御が、覚醒分断化の完全な解消に必要であると考えられる。

結 語

本研究により、背側縫線核のセロトニン作動性ニューロン、青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロンがオレキシンニューロンによって直接制御され、前者はSOREMの抑制、後者は覚醒の維持に重要な役割を果たすことが示された (図2)。

参 考 文 献

- 1) Sakurai T, et al: Cell (1998) 92: 573-585
- 2) Marcus JN, et al: J Comp Neurol (2001) 435: 6-25
- 3) Sakurai T, et al: Cell (2011) 32 (8) : 451-62
- 4) Hagan JJ, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96: 10911-10916
- 5) Bourgin P, et al: J Neurosci (2000) 20: 7760-7765

Profile

2010年3月 富山大学理学部化学科卒業

2012年3月 金沢大学大学院医学系研究科
修士課程修了

2012年4月~金沢大学大学院医薬保健学
総合研究科博士課程在籍中

