

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390067

研究課題名（和文） オレキシン産生神経とその制御システムの生理的役割

研究課題名（英文） Physiological roles of the regulatory system of orexin-producing neurons

研究代表者

櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60251055

研究成果の概要（和文）：オレキシン産生ニューロンの制御システムとその生理的重要性について解析した。GABA-B 受容体をオレキシンニューロン特異的に欠失させたマウスは睡覚醒・睡眠状態の高度な分断化を来し、GABA-B 受容体によるオレキシンニューロンの制御は生理的な覚醒・睡眠状態の維持に不可欠であることを明らかにした。また、オレキシンニューロンにオーファン受容体 BRS-3 が発現していることが明らかになり、オレキシンニューロンの制御システムにおけるオーファン受容体 BRS-3 の関与の可能性を示した。さらに、オレキシン過剰発現マウスでは睡眠の分断化がおこることを明らかにし、オレキシン産生ニューロンの制御システムの重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We studied the physiological roles of the regulatory system of orexin-producing neurons. We examined the involvement of GABA<sub>B</sub> receptors in the regulation of orexin neurons, by utilizing mice with a conditional deletion of the GABA<sub>B1</sub> subunit in these neurons. The frequency of spontaneous fast IPSCs mediated by GABA<sub>A</sub> receptors was markedly increased to compensate for an increase in orexin receptor-1 mediated excitation of local GABAergic interneurons. Sleep state analysis of the conditional GABA<sub>B1</sub> knockout mice revealed that these mice displayed a robust fragmentation of the sleep/waking states. These observations suggest that pre- and postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors in orexin neurons are essential for the normal regulation of orexin neuronal activity, and regulation of sleep/wakefulness states in vivo. We also revealed the involvement of BRS-3 in the regulation of orexin neuron. We also found that orexin-overexpressing mice exhibit fragmentation of NREM sleep, suggesting the importance of inhibitory mechanisms of orexin neurons in maintenance of normal sleep.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：オレキシン、睡眠、覚醒、GABA、TRH

|

## 1. 研究開始当初の背景

オレキシンは摂食中枢として知られている視床下部外側野とその周辺の特定のニューロンに特異的に発現しており、摂食行動および睡眠・覚醒の制御という重要な2つの命題の中核性制御に関わっている。また、われわれのこれまでの研究成果により、摂食行動と睡眠・覚醒の制御に果たすオレキシンの役割は相互に深く関係していることが示唆されている。つまりエネルギーバランスが負に傾いた状態では、動物は覚醒レベルがあがることが知られているが、このシステムにオレキシン神経の活性化に関わっていることがわれわれの研究によりあきらかになった (Yamanaka et al. Neuron 2003)。さらにトランスジェニックマウスをつかった方法で、オレキシン神経への入力系を明らかにした結果、大脳辺縁系からオレキシン神経への強い入力があることがあきらかになり、情動による覚醒レベルの上昇にもオレキシン神経が関与していることが示唆された (Sakurai et al. Neuron 2005)。この系は、不眠症の病態を考える上でも重要であると考えられる。

本研究では、われわれがこれまでに得た、オレキシンの生理的役割に関する知見をさらに追求するとともに、摂食行動の制御機構、睡眠・覚醒の制御機構におけるオレキシン系の関与を詳細に明らかにし、オレキシンのシステムに影響を与えることによる治療法を開発していくことを目的とする。そのために、オレキシンニューロンの制御メカニズムとその生理的重要性を明らかにしようとして着目するに至った。

## 2. 研究の目的

申請者らは、以前にオレキシン神経特異的にGFPを発現するマウスを開発し、その脳のスライス標本をつかって、オレキシン神経の電気生理学的な性質を調べてきた (Muraki et al., J. Neurosci. 2004; Tsujino et al., J. Neurosci. 2005; Yamanaka et al., Neuron 2003; Sakurai et al. Neuron 2005)。その結果、オレキシン産生神経は、GABA、セロトニン、ノルアドレナリン、レプチンなどによって抑制され、アセチルコリン、バソプレッシン、オキシトシン、コレシストキニンなどによって活性化されることが明らかになってきた。さらに、申請者らはトランスジェニックマウスをもちいた逆行性トレーサー実験により、オレキシン産生神経には、扁桃体をはじめとする大脳辺縁系からの入力が豊富にあることをしめした (Sakurai et al., Neuron 2005)。本研究では、それらの入力系の個体レ

ベルにおける生理的意義を明らかにしたい。このことを目的に、オレキシン産生神経に発現している受容体遺伝子をそれぞれ特異的に欠損させたマウスを作製し、それらの表現系を解析する。そのためにオレキシン神経に特異的にCre recombinaseを発現させたマウスとオレキシン産生神経に発現する各種受容体遺伝子のfloxマウスをを掛け合わせることで、さまざまな受容体のオレキシン神経特異的な欠損マウスを作成する。解析は、とくに睡眠・覚醒の異常に主眼をおくが、情動による自律神経系の反応や内分泌系の反応にも着目して解析を行う。また表現系の発現機序は電気生理学的方法をはじめとして様々な方法で行うことを目指した。

一方、電気生理をもちいて、オレキシンニューロンの制御に関わる物質をスクリーニングし、物質レベルでオレキシンニューロンの制御システムの解明を目指した。さらに、オレキシン過剰発現マウスを作成、その睡眠・覚醒状態を解析することによってオレキシンの制御システムの重要性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

Cre/loxPシステムを用いた組織特異的遺伝子欠損マウスの作成のためにオレキシン神経細胞特異的にCre recombinaseを発現させたトランスジェニックマウスを用いる必要がある。ヒトオレキシン遺伝子の5'上流域を転写制御領域をつかって、Cre recombinaseをオレキシン神経特異的に発現させるマウスを開発した。申請者らは、オレキシン神経が視索前野からGABA作動性の抑制性入力を受けていることも見いだしている。そこで、まず、GABAB1受容体遺伝子にfloxを導入したマウスと上記のorexin/Creマウスと交配させることによりオレキシン神経細胞でのみGABAB受容体を欠損したマウスを作成した。このマウスの睡眠・覚醒状態を検討し、オレキシン神経の電気生理学的な性質を調べた。また、オレキシン神経の電気生理学的な性質を調べた。

また、申請者らはセロトニンが5-HT1A受容体を介してオレキシン神経細胞を強く抑制することを見いだしているため、5-HT1A受容体遺伝子にfloxを導入し、上記のorexin/Creマウスと交配させることによりオレキシン神経細胞でのみ5-HT1A受容体を欠損したマウスを作成を行った。このマウスは完成し、現在脳波筋電図同時記録を用いた睡眠覚醒解析からセロトニン神経系からの抑制性入力の役割について調べている。

一方、オレキシン産生ニューロンの制御シ

システムの重要性を解明するために、オレキシンを常時過剰に発現するマウスを作成した。CAG プロモーターをもちいて、オレキシンの cDNA を常に発現するようにしたトランスジェニックマウスである。このマウスの睡眠・覚醒状態を検討することにより、オレキシン欠損マウスの表現系と含め、オレキシン産生ニューロンが適切に制御されることの重要性を検討することを試みた。

#### 4. 研究成果

ヒトオレキシンプロモーターを用い、Cre リコンビナーゼをオレキシン神経特異的に発現する Tg マウスを作製した。このマウスを GABA<sub>B1</sub> flox マウスと掛け合わせて得られる GABA<sub>B1</sub> flox/flox;orexin-Cre マウスの脳波筋電図解析を行い、睡眠制御機構に関する解析を行った。さらに、このマウスにオレキシン神経特異的 GFP 発現マウスを掛け合わせ交配して得られるマウスの脳スライスを用い、オレキシン神経の電気生理学的解析を行った。

オレキシン神経は GABAA、GABAB 受容体両方のアゴニストにより、活動電位の減弱を伴う過分極反応（抑制作用）を示すことが明らかになった。特に GABAB 受容体を介した入力、GIRK チャネル活性化により起こることを明らかにした。次に、オレキシン神経特異的 GABA<sub>B1</sub> flox/flox;orexin-Cre マウスの睡眠調節機構を検討したところ、コントロールに比べ睡眠ステージの非常に顕著な分断化が起こっていることが観察された。また、このマウスの脳スライスを用いた電気生理学的解析から、オレキシン神経に対する GABAA 受容体を介した入力系が亢進していることを見いだした。さらに、コントロールでは、オレキシン投与によりオレキシン神経への自発的抑制性入力が増進すること、逆に、GABA<sub>B1</sub> flox/flox;orexin-Cre マウスでは、オレキシン受容体アンタゴニストによりコントロールと同程度まで抑制性入力が増加することから、オレキシンは GABA 作動性の介在神経を活性化することにより、オレキシンニューロン自体を抑制しており、GABA<sub>B1</sub> flox/flox;orexin-Cre マウスではこの系路の機能が亢進することにより代償的にオレキシンニューロンの活性を抑制していることが明らかになった。そのために、オレキシン神経特異的 GABAB1 欠損マウスではコントロールに比べオレキシン神経に対する GABAA 受容体を介した IPSC が増加しており、膜抵抗が低下しているため、興奮性および抑制性入力のシャントが起こっていた。そのために、オレキシン産生神経の制御が不安定になり、

結果として睡眠・覚醒状態の顕著な分断化が起こっていた。

この結果から睡眠・覚醒の制御におけるオレキシン産生神経上の GABAB 受容体の重要性が示唆された。また、一つの重要な受容体が欠損した場合、オレキシン産生ニューロンの活動性は、代償性メカニズムによって野生型と同程度になるが、そのために、種々の機能的異常が引き起こされていた。GABA は主要な神経抑制物質であるが、そのシグナル入力のうち、GABA<sub>B</sub> 受容体を介する入力は、オレキシン神経活動をシナプス前、シナプス後で調節しており、この調節は睡眠および覚醒の安定化に重要な働きをしていると考えられる。

また、オレキシンニューロンに対して作用する物質のスクリーニングを行い、BRS3 に対する人口リガンドがオレキシンニューロンを直接活性化するとともに GABA 介在神経を介して抑制する事を見いだした。このことから、未同定の BRS3 リガンドがオレキシンニューロンの活性調節に関わっている可能性が示唆された。

一方、オレキシン過剰発現マウスは明期においてノンレム睡眠の分断化、レム睡眠中の異常な筋緊張など、睡眠の異常を呈することが明らかになり、オレキシン系は適切に抑制されないと正常な睡眠が維持できないとすることが明らかになった。これは、オレキシン産生ニューロンの制御システムの重要性を示唆する知見である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Zhang W, Sunanaga J, Takahashi Y, Mori T, Sakurai T, Kanmura Y, Kuwaki T. Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice. *J Physiol.* 2010, Oct;588(Pt 21):4117-29
- ② Sakurai T, Mieda M, Tsujino N. The orexin system: roles in sleep/wake regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jul;1200:149-61.
- ③ Willie JT, Takahira H, Shibahara M, Hara J, Nomiyama M, Yanagisawa M, Sakurai T. Ectopic Overexpression of Orexin Alters Sleep/Wakefulness States and Muscle Tone Regulation

- during REM Sleep in Mice. *J Mol Neurosci.* 43(2):155–61, 2010
- ④ Furutani N, Hondo M, Tsujino N, Sakurai T. Activation of Bombesin Receptor Subtype-3 Influences Activity of Orexin Neurons by Both Direct and Indirect Pathways. *J Mol Neurosci.* 42(1):106–11, 2010 May 14. [Epub ahead of print]
- ⑤ Shiuchi, T., Haque, M. S., Okamoto, S., Inoue, T., Kageyama, H., Lee, S, Toda, C., Suzuki, A., Bachman, E. S., Kim, Y-B., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Shioda, S., Imoto, K., Minokoshi, Y. Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab* Dec;10(6):466–80. 2009
- ⑥ Toyama S, Sakurai T, Tatsumi K, Kuwaki T. Attenuated phrenic long-term facilitation in orexin neuron-ablated mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 168(3):295–302, 2009.
- ⑦ Zhang W, Zhang N, Sakurai T, Kuwaki T. Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* 25:1262:25–37, 2009
- ⑧ Hara, J. Gerashchenko, D, Wisor, J.P., Sakurai, T., Xie, X., and Kilduff, T.S. Thyrotropin-Releasing Hormone Increases Behavioral Arousal through Modulation of Hypocretin/Orexin Neurons. *J. Neurosci.* 29(12), 3705–3714, 2009
- ⑨ Mieda M, Sakurai T. Integrative physiology of orexins and orexin receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009 Aug;8(4):281–95
- ⑩ Matsuki, T., Nomiya, M, Takahira, H., Hirashima, N., Kilduff, T.S., Kunita, S., Takahashi, S., Yagami, K., Bettler, B., Yanagisawa, M., Sakurai, T. Selective loss of GABA<sub>B</sub> receptors in orexin/hypocretin-producing neurons results in disrupted sleep/wakefulness architecture. *Proc. Natl. Acad., Sci., USA.*, 106(11), 4459–64, 2009
- ⑪ Honda M, Eriksson KS, Zhang S, Tanaka S, Lin L, Salehi A, Hesla PE, Maehlen J, Gaus SE, Yanagisawa M, Sakurai T, Taheri S, Tsuchiya K, Honda Y, Mignot E. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS ONE.* 4(1):e4254, 2009.]¥
- ⑫ Funato, H., Tsai, A., Willie, J.T., Kisanuki, Y., Williams, S.C., Sakurai, T. & Yanagisawa, M. Enhanced Orexin Signaling Prevents Diet-Induced Obesity and Improves Leptin Sensitivity. *Cell Metab.* 7;9(1):64–76, 2009
- ⑬ Tsujino N, Sakurai T. Orexin/Hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev.* 2009 Jun;61(2):162–76.
- ⑭ Liu M, Thankachan S, Kaur S, Begum S, Blanco-Centurion C, Sakurai T, Yanagisawa M, Neve R, Shiromani PJ. Orexin (hypocretin) gene transfer diminishes narcoleptic sleep behavior in mice. *Eur J Neurosci.* 28(7):1382–93, 2008.
- ⑮ Mishima K, Fujiki N, Yoshida Y, Sakurai T, Honda M, Mignot E, Nishino S. Hypocretin receptor expression in canine and murine narcolepsy models and in hypocretin-ligand deficient human narcolepsy. *Sleep.* 31(8):1119–26, 2008
- ⑯ Gerashchenko, D., Wisor, J.P., Burns, D., Reh, R.K., Shiromani, P.J., Sakurai, T., de la Iglesia, H.O., and Kilduff, T.S. Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proc. Natl. Acad., Sci., USA.*, 105, 10227–10232, 2008.
- ⑰ Xie X, Wisor JP, Hara J, Crowder TL, Lewinter R, Khroyan TV, Yamanaka A, Diano S, Horvath TL, Sakurai T, Toll L, Kilduff TS. Hypocretin/orexin and nociceptin/orphanin FQ coordinately regulate analgesia in a mouse model of stress-induced analgesia. *J Clin Invest.* 118(7):2471–81, 2008
- ⑱ Kaur S, Thankachan S, Begum S, Blanco-Centurion C, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiromani PJ.

Entrainment of temperature and activity rhythms to restricted feeding in orexin knock out mice. *Brain Res.* 1205:47-54, 2008.

- ①⑨ Murashima-Suginami, A., Takahashi, K., Sakata, T., Tsukamoto, H., Sugai, M., Yanagita, M., Shimizu, A., Sakurai, T., Slavkin, H.C., Bessho, K. Enhanced BMP signaling results in supernumerary tooth formation in USAG-1 deficient mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 369(4), 1012-1016, 2008,
- ②⑩ Tsuneki H, Murata S, Anzawa Y, Soeda Y, Tokai E, Wada T, Kimura I, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *Diabetologia.* 51(4):657-67, 2008.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Sakurai, T. Orexin neurons at interface of energy homeostasis, emotion, and sleep/wakefulness states. 5th International Peptide Symposium in conjunction with 47th Japanese Peptide Symposium, 5th International Peptide Symposium in conjunction with 47th Japanese Peptide Symposium. Dec 4-9, 2010, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan .
- ② 桜井 武 オレキシンによる睡眠覚醒の制御機構 金沢大学薬学シンポジウム 2010～ 生物時計の謎に挑む ～日時:2010年12月2日 金沢大学、石川
- ③ 桜井 武 オレキシンニューロンのコネクトミクス:各種モデルマウスによる解析. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会 シンポジウム7 2010年9月16日 仙台国際センター、宮城
- ④ 桜井 武 睡眠・覚醒状態の制御機構におけるオレキシンによる睡眠・覚醒の制御機構およびエネルギー恒常性への関与特別講演 第8回メタボリックシンドロームカンファレンス 2010年7月17日 芝蘭会館、京都
- ⑤ 桜井 武 睡眠・覚醒状態の制御機構におけるオレキシン産生ニューロンの役割 第35回日本睡眠学会定期学術集会 2010年7月1日-2日 名古屋国際会議場、愛知

- ⑥ 桜井 武 睡眠覚醒状態の維持機構におけるオレキシンニューロンの役割 第87回日本生理学会大会 シンポジウム7 2010年5月19日～5月21日 盛岡市民文化ホール(マリオス)、いわて県民情報センター(アイーナ)、盛岡
- ⑦ 桜井 武 扁桃体におけるNPBWR1の役割 第7回GPCR研究会 2010年5月7日-8日、未来館ホール、東京
- ⑧ Sakurai, T. Orexin as a waking substance. Turkish-Japanese Sleep Forum 2010, Crown Plaza, Izmir, Turkey, May3-4, 2010.
- ⑨ Sakurai, T. Roles of orexins in regulation of energy homeostasis. Symposium of the 1<sup>4th</sup> International Congress on Endocrinology, Kyoto International Conference Center, Kyoto, March 27-30, 2010.
- ⑩ 桜井 武 睡眠・覚醒と情動における新規神経ペプチドの役割 第7回北海道大学脳科学研究教育センターシンポジウム「脳の個性を科学する:遺伝子と環境がつくる脳の力」2009年12月8日(金) 北海道大学、北海道
- ⑪ 桜井 武 新規神経ペプチドと睡眠・覚醒・情動 第56回中部日本生理学会 教育講演 2009年12月4日 石川県立音楽堂、石川
- ⑫ Sakurai, T. Orexin: a neuropeptide at the interface of emotion, metabolism and sleep/wake states. Satellite Symposium of the 9<sup>th</sup> International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptide, Iwasaki Hotel, Yakushima, Kagoshima, Oct 02-03, 2009.
- ⑬ Sakurai, T. A decade of research on orexin. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto International Conference Center, Kyoto, July 29, 2009.
- ⑭ 桜井 武 新規神経ペプチドと覚醒・情動 第27回内分泌代謝学サマーセミナー 2009年7月16-17日 三国観光ホテル、福井
- ⑮ 桜井 武 オレキシン産生神経による睡眠・覚醒の安定化機構 2009年5月15日 第56回日本実験動物学会総会 シンポジウム3 大宮ソニックシティ、大宮
- ⑯ 桜井 武 オレキシンによる睡眠・覚醒の安定化機構と行動制御 2009年4月18日 北陸実験動物研究会 金沢大学、石川

- ⑰ Sakurai, T. Acute and Chronic Regulation of Sleep-Wakefulness States by Orexin/Hypocretin Neurons. SfN meeting, Walter E. Washington Convention Center Washington D. C., USA, November 12-16, 2008
- ⑱ Sakurai, T. The Neural Circuit of Orexin: Mechanisms for Maintaining Sleep and Wakefulness. 2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP Sept 11-13, 2008 Toyama International Conference Center, Toyama, Japan.
- ⑲ Sakurai, T. Roles of orexin/hypocretin system in the regulation of sleep-waking cycle. Acta Physiologica International Symposium. August 13-14, 2008 Kastelli Research Centre. University of Oulu, Oulu, Finland
- ⑳ Sakurai, T. Acute and Chronic Regulation of Sleep-Wakefulness States by Orexin/Hypocretin Symposium S02 at Sleep2008 (22<sup>nd</sup> APSS annual meeting), Baltimore Convention Center, Baltimore, MD, USA, June7-12, 2008

[図書] (計1件)

- ① 櫻井 武 睡眠の科学-なぜ眠るのか なぜ目覚めるのか 講談社ブルーバックス  
ISBN-10: 4062577054 、 ISBN-13:  
978-4062577052 発売日: 2010/11/19  
全248ページ

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med05/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 60251055

(2) 研究分担者

山中 章弘 (YAMANAKA AKIHIRO)

大学共同利用法人・自然科学研究機構・生理学研究所・細胞生理研究部門・准教授

研究者番号: 60323292