Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齊藤, 夕貴, Saito, Yuki メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00055877

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

【総説】

第17回　高安賞優秀論文賞受賞

論文　「Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons」
Journal of Neuroscience 第38巻 第28号 6366頁～ 6378頁
2018年7月掲載

「視床下部覚醒ニューロン群に直接シナプス接続する視索前野のGABA作動性ニューロンはモノアミンにより抑制される」

齊藤　夕貴（さいとう　ゆき）

背　　景

睡眠は脳と全身の機能の保全に必須であり，哺乳類全般・さらには鳥類に共通する生理機能であるが，その制御機構には未知の部分が多く残されている．近年では光遺伝学や化学遺伝学などの技術発展によって睡眠と覚醒の制御には様々な脳部位が関わることが明らかになり，その神経回路が徐々に解明されつつある．例えば，睡眠の促進に関わる重要な部位として視床下部腹外側視索前野 (VLPO) が挙げらる．VLPOにはGABA作動性ニューロンが多く存在し，そのうちの一部は睡眠時に発火し覚醒系のニューロン群を抑制することが示されている[1]．一方，覚醒については脳幹に存在する結節乳頭核 (TMN) のヒスタミン作動性ニューロンを含むモノアミンニューロン群の働きが重要だと考えられている．モノアミンニューロン群は覚醒時に発火し，大脳皮質や辺縁系などへ直接作用し興奮させることで，覚醒を誘導する役割を担っていると考えられている．また，視床下部外側野にはこれらのモノアミンニューロン群と密接な関係があるオレキシン産生ニューロン (オレキシンニューロン) が存在しており[2]，行動を遂行するために覚醒を適切に維持するにはオレキシンニューロンが不可欠であることがわかっている．このオレキシンニューロンは脳内に広く投射しているが，特にTMNのヒスタミン作動性ニューロンのオレキシン2受容体 (OX2R) を介して興奮性に作用することで覚醒状態を維持しているとされている[3]．覚醒に重要なモノアミンニューロン群のうち，セロトニン作動性ニューロン・ノルアドレナリン作動性ニューロンの上流ニューロンについては既に報告があるため，本研究ではまずヒスタミン作動性ニューロンに着目し，改変型の狂犬病ウイルスベクターを用いた逆行性トランスシナプス標識法[4]によってヒスタミン作動性ニューロンに接続する神経細胞を網羅的に明らかにすることを目的とした．

方法・結果

逆行性トランスシナプス標識法

今回用いる改変型の狂犬病ウイルスベクター (SAD株) は野生型に比べて2つの改変点を持つ．1点目の改変点として，野生型の狂犬病ウイルスは5つの構造タンパク質により構成されるが，その中の糖タンパク質をコードする「G遺伝子」をGFPに置き換えて欠損させることでウイルスが他のニューロンに伝播できないようになっている．また，2点目の改変点として，ウイルスのエンベロープをトリ白血病肉腫ウイルスのエンベロープ (EnvA) で置き換えるシュードタイピングを行っている．シュードタイプされた狂犬病ウイルスベクター (SADΔG) は通常の細胞には感染することができない．本研究ではSADΔGを標的のニューロンのみに感染させるべく，各種Creマウスを用いてCre発現ニューロン特異的にEnvAの受容体であるTVAと，伝播に必要なG遺伝子産物 (RG) をCre依存性の構築をもつアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) にて発現させた．EnvAでシュードタイプしたSADΔG (EnvA) はTVAが発現しているニューロンにのみ感染し，同じ細胞内にRGを過剰発現させることでG遺伝子産物が補完され，一次上流の神経細胞にウイルスが逆行性に二次感染することが可能となる．しかし，感染した一次上流ニューロンにはRGが発現していないため，さらに上流へは感染することはできない．従って，このトレーシング手法では標的細胞と，それに単シナプス結合をする一次上流のニューロンのみを描出することが可能となる．

ヒスタミン作動性ニューロンの逆行性トレーシング

ヒスタミン作動性ニューロン特異的にCreを発現するマウス (HDC-Cre) のTMNにFLEX構築をもつCre依存的なAAVを用いてTVAとRGを発現させ，2週間後に同部位にGFPを発現するSADΔG (EnvA) を投与した．SADΔG (EnvA) の感染から1週間後に脳を摘出し，脳切片を作製した．脳切片を免疫染色し，TVAとGFPが発現している細胞を標的細胞，GFPのみを発現している細胞をインプットニューロンとし，その分布を確認した (図1)．冠状断切片において，GFP陽性細胞は視索前野 (Preoptic area; POA)，視床下部外側野 (Lateral hypothalamic area; LH)，DMH(Dorsomedial hypothalamus) をはじめとする視床下部内の広い範囲に存在しており，ヒスタミン作動性ニューロンはこれらの領域から直接インプットを受けていることが明らかとなった．さらに視床下部以外にも，中隔や側坐核などの前方やDorsal tegmental area (DTg) などが存在する脳幹など，ヒスタミン作動性ニューロンは非常に広い範囲から入力を受けていることが分かっ

た．特に，LHに着目してみると，インプットニューロンの約10%はanti-orexin抗体陽性であることを蛍光免疫染色にて確認した．これまでにオレキシンニューロンはオレキシン2受容体を介してヒスタミン作動性ニューロンを興奮させることが報告されており[3]，今回の逆行性トレーシングによる結果と整合性のとれた結果であった．

オレキシン作動性ニューロンの逆行性トレーシング

ヒスタミン作動性ニューロンの上流にオレキシンニューロンが存在することを確認できたので，次にオレキシン作動性ニューロンを標的として同様の逆行性トレーシングを行った．ヒスタミン作動性ニューロンの結果と同様に視床下部周辺には多数のGFP陽性細胞が存在し，さらに中隔や分界条床核などからも入力を受け

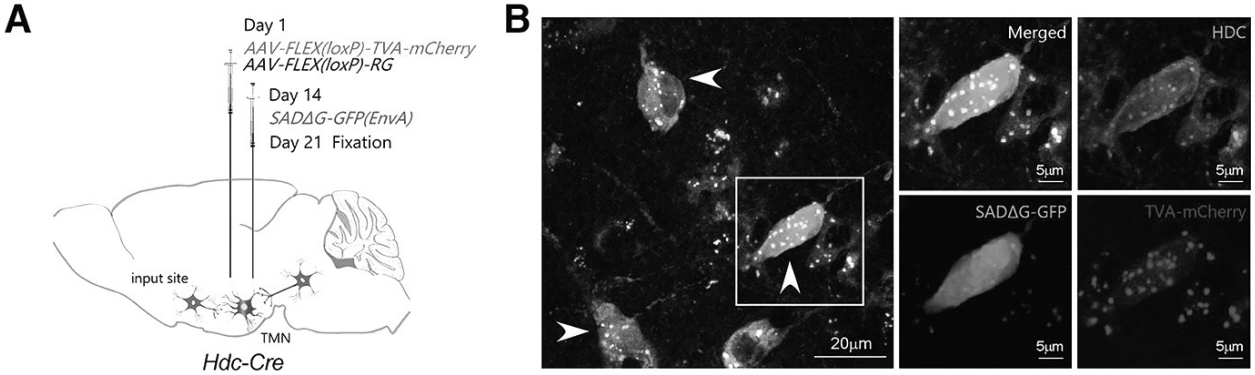


図 1．逆行性トランスシナプス標識法を用いたヒスタミン作動性ニューロンの逆行性トレーシング．(A) ウイルス投与の概要図．
(B) GFP および mCherry を発現するスターターニューロンの観察．
Journal of Neuroscience 11 July 2018, 38 (28) 6366-6378; より転載

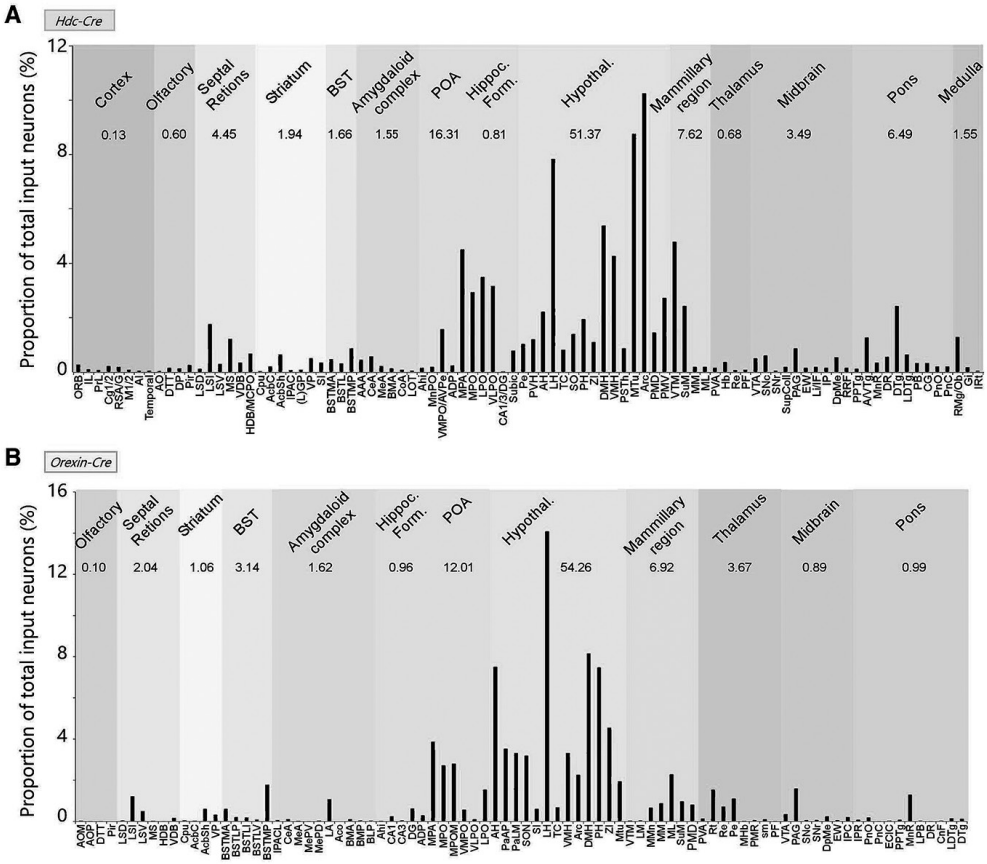


図 2．ヒスタミン作動性ニューロン (A) およびオレキシンニューロン (B) に直接入力するニューロン群の脳部位ごとの割合を比較したグラフ．
Journal of Neuroscience 11 July 2018, 38 (28) 6366-6378; より転載

ていることが明らかとなった (図2). 両群に類似した場所に一次上流ニューロンが存在することから，両群は似た上流システムによって並行に制御されている可能性が考えられる. 一方，オレキシンニューロンはヒスタミン作動性ニューロンに比べて大脳皮質などの上位中枢や脳幹などの後方部位からの入力をあまり持たないことが分かった. また，室傍核 (Paraventricular hypothalamic nucleus;PVH) に非常に密にGFP陽性細胞が存在しており，これらの一部はanti-CRH抗体やanti-AVP抗体陽性であった. これまでに電気生理学的実験でCRHやAVPによりオレキシンニューロンが活性化されることが報告されていたが(Winsky-Sommerer et al., 2004)，今回のトレーシングにおいてオレキシンニューロンがこれらのストレス応答に関連するニューロン群から直接入力を受けていることが初めて明らかとなった.

視索前野のGABA作動性ニューロンの機能解析

両群の逆行性トレーシング結果に共通して，視床下部視索前野に多数のGFP陽性細胞の存在が確認された. 視索前野はVLPO，MPO，MPA，LPOの４つのサブエリアを持ち，特にVLPOは1996年にノンレム睡眠の開始および睡眠の維持に主要な役割をしていることが報告され(Sherin, et al., 1996)，このVLPOを含む部位の電気刺激により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明らかとなっている (Lu et al., 2000). また，VLPOのニューロンは主にGABA作動性であり，オレキシンニューロンやヒスタミン作動性ニューロンをはじめとする覚醒ニューロンを抑制することで睡眠の発現や維持に関与しているのではないかと推測されている. 今回のトレーシング結果で発見された視索前野に存在する一次上流ニューロンがGABA作動性ニューロンであることを確認するため，オレキシン・ヒスタミン作動性ニューロンの各CreマウスにGABA作動性ニューロンにGFPを発現するGAD-GFPマウスをかけあわせ，mCherryを発現するSADΔG (EnvA) を先ほどと同様に投与した. 視索前野の各サブエリアにおいて一次上流ニューロン数を計測した結果，オレキシンニューロン・ヒスタミン作動性ニューロンの両群ともに，VLPOでのmCherry^{+}/GFP^{+}の共発現率は他エリアよりも高く，VLPOに存在する一次上流ニューロンの約70%以上はGABA作動性ニューロンであることが分かった. また，電気生理学的手法を用いてVLPO内のmCherry^{+}/GFP^{+}のニューロンに対してノルアドレナリンとセロトニンへの反応を確認したところ，これらの物質はVLPO内のGABA作動性ニューロン群を抑制した. これまでに電気生理学的手法において覚醒物質であるノルアドレナリンとセロトニンは睡眠時のみ発火するSleep-Activeニューロンを抑制することが示されている (Gallopin et al., 2000). つまり今回の結果から，オレキシン・ヒスタミン作動性ニューロンに単シナプス結合しているVLPOのGABA作動性ニューロンはSleep-Activeニューロンの性質を有している可能性が示唆された.

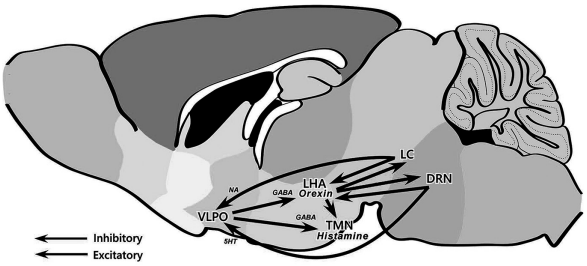


図3. 本研究により推察される VLPO の GABA 作動性ニューロンと覚醒をもたらすニューロン群との相互関係.
Journal of Neuroscience 11 July 2018, 38 (28) 6366-6378; より転載

結　　論

本研究において，改変型の狂犬病ウイルスベクターであるSADΔG (EnvA) を用いた逆行性トレーシングにより，オレキシンニューロンはヒスタミン作動性ニューロンの上流に位置することが明らかとなった. さらに，オレキシンニューロン・ヒスタミン作動性ニューロンの両群は似通った入力系をもち，並行してコントロールされている可能性が示唆された. 特にオレキシンニューロン・ヒスタミン作動性ニューロンともにVLPOのGABA作動性ニューロンから直接入力を受けていることが明らかとなり，これらのニューロンはSleep-Activeニューロンの性質をもつ可能性が示唆された.

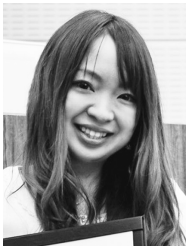
文　　献

1）Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE (2010) Sleep state switching. Neuron 68:1023–1042.

2）Sakurai,T et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 92, 573–585.

3）Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T (2011) Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. J Neurosci 31:6518–6526.

4）Osakada F, Callaway EM (2013) Design and generation of recombinant rabies virus vectors. Nat Protoc 8:1583–1601.



Profile

2012年4月　金沢大学医薬保健研究域医学系　技術職員
2016年4月　金沢大学大学院 (博士課程) 医学専攻 入学
2017年4月　筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 技術職員
2019年3月　金沢大学大学院 (博士課程) 医学専攻　修了
2019年4月　筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 研究員