

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03122

研究課題名(和文) ストレスや不安が過覚醒をうむ神経科学的機構の解明

研究課題名(英文) Neuronal mechanisms that regulate hyper-arousal in response to stress and anxiety

研究代表者

桜井 武 (Sakurai, Takeshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60251055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスや不安にかかわる大脳辺縁系と覚醒系の相互関係を神経科学的に解明するために研究を行なった。ノンレム睡眠のマウスに分界条床核のGABA作動性ニューロンを光遺伝学的に刺激すると直ちに覚醒に移行した。この作用はオレキシン拮抗薬によって阻害されなかった。一方、化学遺伝学的にこれらのニューロンを興奮させると覚醒時間が延びたが、この作用はオレキシン受容体拮抗薬によって阻害された。一方、オレキシンの下流における青斑核のノルアドレナリンニューロンが扁桃体外側部を介して恐怖行動を増強し、汎化に関与することを見出した

研究成果の概要(英文)：We found that acute optogenetic excitation of GABA neurons in the BNST during non-rapid eye movement (NREM) sleep in mice resulted in immediate transition to a wakefulness state without the function of orexins. Prolonged excitation of GABA neurons by a chemogenetic method evoked a longer-lasting, sustained wakefulness state, which was abolished by pre-administration of a dual orexin receptor antagonist. We also found that when the orexin NA amygdala circuit was artificially activated, fear-related behavior increased in a similar but distinct from the training context. Increased activation of these circuits enhanced the fear response in otherwise neutral situation. Conditions that naturally activate orexin neurons, such as fasting, could result in an orexin-dependent shift to a 'vigilance' state and alter the selection of a behavioral response to avoid and handle environmental threats.

研究分野：神経生理学

キーワード：覚醒 情動 大脳辺縁系 オレキシン

1. 研究開始当初の背景

睡眠は脳および全身の恒常性の維持に必須の生理的過程であり、睡眠の質を改善することが、人々の健康の維持増進という観点から重要である。不安やストレスは不眠の原因になる。また、うつ病では睡眠障害は必発といってよい。これらは大脳辺縁系のかかわる情動や不安と覚醒制御系との強い関係を示唆している。オレキシンは、覚醒を維持するために不可欠の分子である。オレキシン欠損動物は、睡眠・覚醒状態が分断化し、レム睡眠が不適切なタイミングで現れるなど、ヒトの睡眠障害ナルコレプシーに酷似した、きわめて異常な睡眠・覚醒パターンを示す。ヒトでも、ナルコレプシーはオレキシン欠損症であることが明らかになっている。逆にオレキシン系の過剰な活動は不眠に結びつくことも示されている。実際に、現在、オレキシン拮抗薬 Suvorexant が不眠症治療薬として上市されている。つまり、オレキシン系が不眠症の病態において過覚醒のメカニズムにも関与している可能性が高い。オレキシンニューロンは高いモチベーションを必要とする行動をとっているときや、情動ストレスがかかっているときに興奮していることが示されており、大脳辺縁系や報酬系との深い関連が示唆されていることから情動との関連が示唆される。不安やストレスが不眠症を生むことは、大脳辺縁系と覚醒制御システムの関連が過覚醒の背景にあることを示している。病態を完全に理解し、不眠の根治治療を開発するためには大脳辺縁系が覚醒システムを駆動するメカニズムを神経回路や介在する分子のレベルで完全かつ正確に理解する必要がある。しかし、大脳辺縁系がどのようなメカニズムで覚醒を促し、逆に覚醒にかかわる系が大脳辺縁系機能におよぼす影響やそのメカニズムは十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、大脳辺縁系を操作したさいにおこる睡眠覚醒状態への影響を明らかにする。また、逆に、覚醒系が大脳辺縁系に与える影響にもアプローチする。

まず、大脳辺縁系と覚醒系との関係を明らかにするために、大脳辺縁系や報酬系からオレキシンニューロンやヒスタミンニューロンなど覚醒系への神経接続を解明するために、これらのニューロンにシナプス接続をするニューロン群を1細胞レベルで可視化し、介在する神経伝達物質を同定する。さらにオレキシン産生ニューロンなどの覚醒系に入力するニューロン群を光遺伝学的などで操作し覚醒系に与える影響を明らかにする。

本研究ではまず、睡眠覚醒制御系においてきわめて重要な役割を果たしているオレキシンニューロンや、ヒスタミンニューロンを起点としてこれらのニューロンへの直接の入力系をマウス脳において網羅的に同定し、それらを特異的に光遺伝学的あるいは薬理

遺伝学的な操作をくわえることにより、オレキシンニューロンやヒスタミンニューロンがどのように制御されているかを明らかにする。さらには同定したニューロン群と睡眠の開始・維持に関わる視索前野の GABA 作動性ニューロンや大脳辺縁系・側坐核などとの関連を細胞レベルで明らかにし、睡眠覚醒の制御に関わる神経回路を詳細に解明する。これらによって大脳辺縁系の活動がどのような神経経路を介し覚醒制御システムに影響を与えるかを検討する。

一方、オレキシンニューロンやその下流のモノアミン作動性ニューロンを操作して、大脳辺縁系に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

オレキシン産生ニューロンとヒスタミンニューロンの上流ニューロンを組み換え型レイビースウィルスベクターをトレーサーとして用いて、マウス脳において網羅的に同定した。それらの一次上流ニューロンがもつ神経伝達物質や電気生理学的性質を組織学および電気生理学的実験によって明らかにした。特異性を確実にするため、オレキシンニューロン特異的に Cre を発現する orexin-Cre マウスおよび Hdc-Cre マウスと組み換え型レイビースウィルスベクターを用いた。

SAD G-EGFP(EnvA)を用いて蛍光蛋白質により直接オレキシンニューロンとヒスタミンニューロンにシナプス性結合をする第1次の上流ニューロンのみをラベルした。TVA および RG は FLEX スイッチシステムをもちいた AAV ベクター2種により Cre 発現細胞にのみ特異的に一過性発現させた。これらの AAV を上記 Cre マウスの視床下部外側野に感染後、同部位に SAD G-EGFP(EnvA)を感染させ脳を固定、組織を観察した。

ここでラベルされた上流のニューロンの神経伝達物質が何であるかを明らかにするため、in situ hybridization や免疫組織化学をもちいたほか、Gad67-GFP マウスを orexin-Cre や Hdc-Cre と掛け合わせ SAD G-mCherry(EnvA)を用いて上流ニューロンの持つ化学的性質(神経伝達物質)を明らかにした。

容量伝達の伝達方式をとるモノアミンシステムに関してはレイビースウィルスでラベルできない可能性があるため、モノアミン系に関しては順行性トレーサーによる検討もおこなった。特にうつや不安に関係の深いセロトニンによるオレキシン系とコリン作動性ニューロンへの影響についての検討をおこなった。セロトニンニューロンに特異的に Cre を発現する Sert-Cre マウスや ePet-Cre マウスを用いて、背側縫線核に AAV-FLEX システムを用いたベクターにより、セロトニンニューロン特異的に ChR2-YFP を発現させ、順行性トレーサーとして用いたほか、オレキシンニューロンからのパッチクラ

ンプ記録と合わせ、光刺激実験を行った。

また、大脳辺縁系が覚醒に及ぼす影響とメカニズムを検討した。恐怖や不安に關与する分界条床核は、脳内の複数の領域に投射して情動を制御している。分界条床核に局在する GABA 作動性ニューロンに着目し、その覚醒制御における役割を解析した。

一方、オレキシニューロンからの出力系に關しても検討を行った。オレキシニューロンが投射する青斑核に局在するノルアドレナリンニューロン(LCNA ニューロン)には OX1R が豊富に発現している。また LCLA ニューロンは扁桃体に投射していることが知られている。われわれは、cTRIO 法により扁桃体外側部(LA)に投射する LCNA ニューロンにオレキシニューロンが単シナプス性に接続していることを証明し、この経路を光遺伝学や薬理遺伝学をもちいて操作しその機能を調べた。

4. 研究成果

SAD G ベクターによる一次上流ニューロンの同定の結果、ヒスタミンニューロンとオレキシニューロンは似た神経性入力を受けていることが明らかになった。ヒスタミンニューロン、オレキシニューロンとも、視床下部の外側では、一次上流ニューロンは脳内の広範な領域に見出されたが、そのパターンは似通っていた。また、オレキシニューロンや MCH ニューロンからヒスタミンニューロンへの単シナプス性接続が観察されたほか、室傍核 AVP ニューロンや、CRH ニューロンからオレキシニューロンへの単シナプス性接続も確認された。

両者とも視床下部内、とくに視索前野や前視床下部に多くのインプットニューロンが観察された。とくに睡眠制御に關わるとされる腹外側視索前野 (VLPO) に局在する GABA 作動性ニューロンから、オレキシニューロンとヒスタミンニューロンの両方に単シナプス性の接続があり、また、これらの VLPO ニューロンはセロトニンやノルアドレナリンで抑制されることを電気生理学的に証明した。これらの性質はいわゆる sleep-active neurons にみられるものであり、オレキシニューロンとヒスタミンニューロンには、sleep-active neurons からの単シナプス性の接続があることが明らかになった。

また、光遺伝学を用いて分界条床核に存在する GABA 作動性ニューロンを特異的に興奮させたところ、約 2 秒の潜時ですぐにノンレム睡眠から覚醒に移行することが明らかになった。しかし、レム睡眠時に同様の刺激を与えても何も効果がみられなかった。ノンレム睡眠から覚醒に直ちに移行する作用は、オレキシ受容体拮抗薬により影響を受けなかった。一方、分界条床核 GABA 作動性ニューロンを薬理遺伝学的により持続的に興奮させたところ、覚醒時間の延長とノンレム睡眠・レム睡眠両方の減少が認

められた。この作用は、オレキシ受容体拮抗薬により強く阻害された。これらの結果から、ノンレム睡眠時に分界条床核の GABA 作動性ニューロンが興奮することで覚醒が惹起されるが、ここにはオレキシンの作用は介在しないこと、分界条床核の GABA 作動性ニューロンが持続的に興奮するとオレキシ系が動員され、その作用によって覚醒が維持されることが明らかになった。本研究により、不安などの情動に大きく關与する分界条床核における GABA 作動性ニューロンが覚醒を誘導するメカニズムの一端が明らかになった(図 1)。

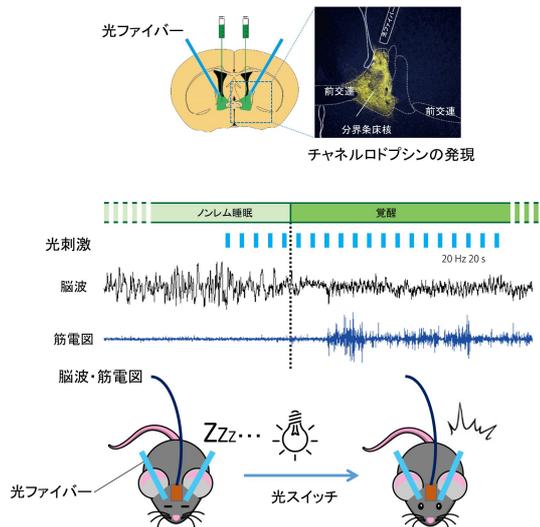


図 1 覚醒制御における BNST GABA ニューロンの働き

また覚醒制御にかかわる神経ペプチド、オレキシが青斑核の NA ニューロンを介して覚醒レベルとともに恐怖レベルを調節していることを明らかにした。

オレキシから青斑核への信号や、NA ニューロンから扁桃体への信号を抑制すると、本来なら恐怖を感じるべき状況でも恐怖を表現しなくなることを見出した。逆にこれらの経路を人工的に興奮させると汎化が起こり、恐怖を感じる必要がない状況であっても、その環境に恐怖を感じたときと似た要素があれば、強い恐怖反応を示すようになった。ただし、環境に恐怖を示唆する要素が何もなければ同じ経路を興奮させてもすみ行動は観察されなかった。以上より、オレキシはこれらの経路を適切なレベルに調節して、恐怖応答の強弱を制御していることが明らかになった。さらにオレキシは、オレキシ 1 型受容体 (OX1R) に結合することで、NA ニューロンを興奮させることが明らかになった。

オレキシにより、興奮した NA ニューロンは、扁桃体外側部に作用し、あらかじめ成立していた恐怖記憶を汎化させ、恐怖の応答を強めることが明らかになった(図 2)。これらの研究により、視床下部、脳幹、大脳辺縁系を含む覚醒制御系の一部が明らか

になり、ストレスや情動が睡眠覚醒状態に影響を与えるメカニズムの解明の一助となる成果が得られた。



図2 恐怖記憶の汎化におけるオレキシンとノルアドレナリンニューロンの働き

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16件)

1. Soya, S, Takahashi, MT, McHugh, T, Maejima, T, Herlitz, S, Abe, M, Sakimura, K, Sakurai, T. Orexin modulates Behavioral Fear Expression through the Locus Coeruleus, *Nat Commun.* 2017 Nov 20;8(1):1606. doi: 10.1038/s41467-017-01782-z.
2. Thompson MD, Sakurai T, Rainero I, Maj MC, Kukkonen JP. Orexin Receptor Multimerization versus Functional Interactions: Neuropharmacological Implications for Opioid and Cannabinoid Signalling and Pharmacogenetics. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2017 Oct 8;10(4). pii: E79. doi: 10.3390/ph10040079.
3. Kodani S, Soya S, Sakurai T. Excitation of GABAergic neurons in the bed nucleus of the stria terminalis triggers immediate transition from non-rapid eye movement sleep to wakefulness in mice. *Journal of Neuroscience* 26 July 2017, 37 (30) 7164-7176; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0245-17.2017
4. Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Tominaga H, Ishikawa Y, Hosokawa N, Ambai S, Kawabe Y, Uchida S, Nakajima R, Saitoh T, Kanda T, Vogt K, Sakurai T, Nagase H, Yanagisawa M. Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 May 30;114(22):5731-5736. doi: 10.1073/pnas.1700499114. Epub 2017 May 15.
5. Mieda M, Hasegawa E, Kessaris N, Sakurai T. Fine-Tuning Circadian Rhythms: The Importance of Bmal1 Expression in the Ventral Forebrain. *Front Neurosci.* 2017 Feb 9;11:55. doi: 10.3389/fnins.2017.00055. eCollection 2017.
6. Hasegawa, E., Maejima, T., Yoshida, T., Maseck O.A., Herlitz, S., Yoshioka, M., Sakurai, T., Mieda, M. Serotonin neurons of the dorsal raphe mediate the anti-cataplectic action of orexin neurons by reducing the amygdala activity. April 25, 2017 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(17):E3526-E3535. DOI: 10.1073/pnas.1614552114
7. Tashiro S, Yamaguchi R, Ishikawa S, Sakurai T, Kajiya K, Kanmura Y, Kuwaki T, Kashiwadani H. Odour-induced analgesia mediated by hypothalamic orexin neurons in mice. *Sci Rep.* 2016 Nov 15;6:37129. doi: 10.1038/srep37129.
8. Okamoto K, Yamasaki M, Takao K, Soya S, Iwasaki M, Sasaki K, Magoori K, Sakakibara I, Miyakawa T, Mieda M, Watanabe M, Sakai J, Yanagisawa M, Sakurai T. QRFP-Deficient Mice Are

- Hypophagic, Lean, Hypoactive and Exhibit Increased Anxiety-Like Behavior. *PLoS One*. 2016 Nov 11;11(11):e0164716. doi: 10.1371/journal.pone.0164716.
9. Tsuneki H, Kon K, Ito H, Yamazaki M, Takahara S, Toyooka N, Ishii Y, Sasahara M, Wada T, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Timed Inhibition of Orexin System by Suvorexant Improved Sleep and Glucose Metabolism in Type 2 Diabetic db/db Mice. *Endocrinology*. 2016 Nov;157(11):4146-4157.
 10. Tsuneki H, Sasaoka T, Sakurai T. Sleep Control, GPCRs, and Glucose Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Sep;27(9):633-642. doi: 10.1016/j.tem.2016.06.011. Epub 2016 Jul 22.
 11. Mieda M, Okamoto H, Sakurai T. Manipulating the Cellular Circadian Period of Arginine Vasopressin Neurons Alters the Behavioral Circadian Period. *Curr Biol*. Sep 26;26(18):2535-42.2016 doi: 10.1016/j.cub.2016.07.022.
 12. Motoike T, Long JM, Tanaka H, Sinton CM, Skach A, Williams SC, Hammer RE, Sakurai T, Yanagisawa M. Mesolimbic neuropeptide W coordinates stress responses under novel environments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(21):6023-8.2016 doi: 10.1073/pnas.1518658113.
 13. Abbas MG, Shoji H, Soya S, Hondo M, Miyakawa T, Sakurai T. Comprehensive Behavioral Analysis of Male Ox1r (-/-) Mice Showed Implication of OrexinReceptor-1 in Mood, Anxiety, and Social Behavior. *Front Behav Neurosci*. 2015 Dec 10;9:324. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00324.
 14. Tsuneki H, Nagata T, Fujita M, Kon K, Wu N, Takatsuki M, Yamaguchi K, Wada T, Nishijo H, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Nighttime Administration of Nicotine Improves Hepatic Glucose Metabolism via the Hypothalamic Orexin System in Mice. *Endocrinology*. 2016 Jan;157(1):195-206. doi: 10.1210/en.2015-1488.
 22. Tanaka S, Toyoda H, Honda Y, Seki Y, Sakurai T, Honda K, Kodama T. Hypocretin/orexin prevents recovery from sickness. *Biomed Rep*. 2015 Sep;3(5):648-650. Epub 2015 Jul 17.
 15. Kitajima S, Iwata Y, Furuichi K, Sagara A, Shinozaki Y, Toyama T, Sakai N, Shimizu M, Sakurai T, Kaneko S, Wada T. Messenger RNA expression profile of sleep-related genes in peripheral blood cells in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2015 Apr;20(2):218-25. doi: 10.1007/s10157-015-1150-y. Epub 2015 Sep 20.
 16. Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Ujike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Yamada M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Itokawa M, Ohi K, Hashimoto R, Tanisawa K, Arai T, Mori S, Sawabe M, Naka-Mieno M, Yamada Y, Yamada M, Sato N, Muramatsu M, Tanaka M, Irukayama-Tomobe Y, Saito YC,

Sakurai T, Hayashida M, Sugimura H, Ikeda K. Associations between the orexin (hypocretin) receptor 2 gene polymorphism Val308Ile and nicotine dependence in genome-wide and subsequent association studies. *Mol Brain*. 2015 Aug 20;8(1):50. doi: 10.1186/s13041-015-0142-x.

〔学会発表〕(計7件)

1. 高橋 徹, 征矢晋吾, 阿部 学, 崎村 建司, 櫻井 武 新規 Cre 系統マウスを用いた視床下部 QRFP ニューロンの順行性軸索投射の同定 Identification of anterograde axonal projections of hypothalamic QRFP neurons by using a novel strain of Qrfp-iCre mice. 第95回日本生理学会大会 香川 2018年3月28-30日
2. Takeshi Sakurai Roles of Orexin Neurons at the Interface of Systems that regulate Emotion and Arousal/Vigilance. The 8th International Society of Radiation Neurobiology Conference ISRN-2018 2/9/2018 International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA, Tsukuba, Ibaraki
3. Takeshi Sakurai Neural circuits of orexin neurons: interface of systems of emotion and arousal/vigilance. The 6th Annual IIIS Symposium Afternoon Seminar, 12/14/2017, Tokyo Conference Center Shinagawa, Tokyo.
4. Takeshi Sakurai The Mechanism of Narcolepsy: what it tells on clinical perspective. 2nd International Taiwanese Congress of Neurology 19th-21th May, 2017, Taipei

International Congress Center. Taipei, Taiwan

5. Takeshi Sakurai Neural Circuits of Orexin Neurons: Interface of Systems of Emotion, Energy Homeostasis and Arousal. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology Satellite Symposium July 4th, 2016, COEX Convention Center, Korea
6. 齊藤夕貴、前島隆司、辻野なつ子、阿部学、崎村建司、櫻井 武 セロトニンによるオレキシンニューロンの制御が睡眠・覚醒状態に与える影響 日本睡眠学会第41回定期学術集会 2016年7月7日-8日 京王プラザホテル、新宿、東京
7. 征矢晋吾、前島隆司、Thomas McHugh、櫻井 武 オレキシンは扁桃体へのノルアドレナリン入力調節を介して恐怖行動の発現制御に関わる 第13回GPCR研究会 お台場未来館ホール 2016/5/13-2016/5/14

〔図書〕(計2件)

1. 櫻井 武 睡眠の科学-なぜ眠るのか なぜ目覚めるのか 改訂新版 講談社ブルーバックス出版社: (2017/8/17)
2. 櫻井武 「必ず眠れるとっておきの秘訣! 最新の睡眠科学が証明する~今までの睡眠本では眠れない人へ」出版社: 山と溪谷社 (2017/5/20)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sakurai-lab.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 武(SAKURAI, Takeshi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 60251055