

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21057

研究課題名(和文) 覚醒と睡眠の制御におけるセロトニン5HT1A受容体の生理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological role of the 5HT1AR in the regulation of sleep/wakefulness states

研究代表者

齊藤 夕貴 (SAITO, Yuki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・技術職員

研究者番号：70732436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では5HT1A受容体をオレキシンニューロン特異的に欠損させたox5HT1ARK0マウスを作成し、セロトニンによるオレキシンニューロン制御機構の生理的役割について検討した。5HT1A受容体が欠損しているオレキシンニューロンはセロトニンの抑制を受けず活動レベルを調節することが困難となるため、平常時にはNREM睡眠量が増加することを見出した。また、拘束ストレス負荷後にはオレキシンニューロンの5HT1A受容体の欠損によりREM睡眠量が増加することが分かった。これらの結果からオレキシンニューロンに発現する5HT1A受容体が平常時および拘束ストレス負荷後の睡眠量の調節に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the functional relationship between orexin neuropeptide and serotonin (5-HT) in the regulation of sleep/wakefulness states. We found that DR 5-HT neurons send abundant axonal projections to orexin neurons. We next generated mice in which 5HT1AR was deleted exclusively in orexin neurons (ox5HT1ARK0). We found that ox5HT1ARK0 mice exhibited decrease in amount of wakefulness and increase REM sleep in the dark period. Mild restraint stress induced statistically significant changes in wakefulness and NREM sleep amounts only in ox5HT1AK0 mice, although control group showed similar tendency with much smaller extent. Also, after applying 90min of acute physical stress, these mice showed increase the amount of REM sleep. These results suggested that orexin neurons stabilize the activity of 5HT neurons via 5HT1AR to regulate REM sleep.

研究分野：神経科学

キーワード：オレキシン 5HT1A セロトニン 睡眠 ストレス

1. 研究開始当初の背景

睡眠不足は注意力の低下を招き、人々の作業効率の低下や事故の増加に結びつくなど社会に想像以上の損失を与えている。これらの現代社会における不眠の原因の一つとして身体的・精神的なストレスが挙げられる。

ストレスによる過覚醒やREM睡眠の変化にはセロトニンの機能低下が関係していると言われていたがその詳細なメカニズムは未だ解明されていない。また睡眠不足が慢性化することでうつ病やメタボリックシンドロームなどの心身の様々な失調に結びつくことも複数の疫学的研究により指摘されている。

これらのことは睡眠が脳および全身の恒常性の維持にも必須の生理的過程であることを示唆するとともに、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きわめて社会的に重要であることを示している。

睡眠に關与するセロトニンやオレキシンはすでに薬物による介入が可能なシステムであり、これらの機能的な相互作用を解明することは不眠症状の治療法を考える上でも価値が高いと考え、本研究ではオレキシンニューロンに存在する5HT1A受容体の睡眠および覚醒制御機構における役割の解明を試みた。

オレキシンは背側縫線核のセロトニンニューロンに発現しているオレキシン1受容体・オレキシン2受容体を介してセロトニンニューロンを興奮させ、セロトニンは5HT1A受容体とGIRKチャンネルを介してオレキシンニューロンを抑制すると考えられている。このような負のフィードバックはオレキシンニューロンおよびセロトニンニューロンの活動レベルを適切に保つ役割を果たしている可能性があるが、この回路が果たす睡眠/覚醒制御機構での具体的な役割は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では覚醒状態の維持に必須であるオレキシンニューロンと、REM睡眠の制御に關与しているセロトニンに着目し、セロトニン(5HT)によるオレキシンニューロン制御機構の生理的役割を明らかにし、ストレスによって生じるセロトニン系異常がもたらす不眠の神経メカニズムの一端を解明することを目的とした。

具体的にはオレキシンニューロン特異的に5HT1A受容体を欠損させたマウス(ox5HT1ARKOマウス)を用いて生理的条件下での脳波の確認、各ニューロンの活動変化を組織学的に評価、ストレス負荷後の脳波変化の確認をすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではセロトニンによるオレキシンニューロン制御機構の生理的役割を解明し、

さらにストレスによって生じる不眠におけるこの神経経路の役割をあきらかにするために、オレキシンニューロン特異的にCreを発現するorexin-Creマウスと新たに作製した5HT1A-floxマウス(未発表)をかけ合わせ、オレキシンニューロン特異的に5HT1A受容体を欠損させたコンディショナルKOマウス(ox5HT1ARKOマウス)を作出し、研究に用いた。

(1) ox5HT1ARKOマウスの5HT1A受容体欠損を二重蛍光免疫染色法を用いて確認した。また、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に5HT1A受容体の機能の欠損の確認を行った。

(2) マウスの頭蓋・項筋に脳波および筋電図を同時測定するための電極を取り付け、術後1週間後からox5HT1ARKOマウスの脳波を3日間連続で測定し、平常時におけるox5HT1ARKOマウスの睡眠覚醒状態の検討を行った。マウスの脳波は周波数と筋電の有無によって『覚醒・NREM睡眠・REM睡眠』の3段階に分類することができる。それぞれのパラメーターの合計時間や持続時間、潜時や出現回数などの項目ごとに解析を行い、control群と比較して平常時での脳波に変化がないかを確認した。

(3) 神経活動のマーカーであるFosを指標とした免疫組織化学的手法を用いてox5HT1ARKOマウスの通常時におけるオレキシンニューロンの神経活動が組織学的に野生型と比較してどのように変化しているかを評価した。

(4) ストレスは身体的ストレスと精神的ストレスの二つに分類されるが、身体的ストレスの一種である拘束ストレス負荷試験を行い、ox5HT1ARKOマウスの睡眠覚醒リズムに対してどのような影響がみられるか検討を行った。さらに、神経活動のマーカーであるcfosを指標とした免疫組織化学的手法を用いて睡眠覚醒に關与するニューロンをそれぞれ観察し、ストレス条件下での5HT1A受容体の意義を組織学的かつ生理学的な側面から統合して検討した。

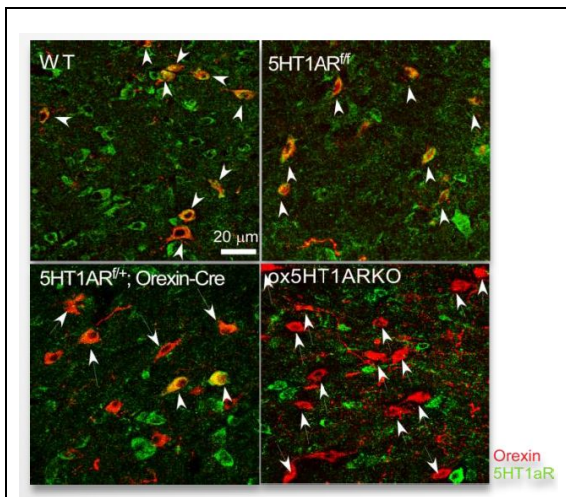
4. 研究成果

(1) AAV(アデノ随伴ウイルス)を用いてSert-Creマウスの背側縫線核セロトニンニューロン特異的にChR2を発現させたところ、オレキシンニューロンに豊富な投射がみられた。また、この神経終末に対して光刺激を行った際のオレキシンニューロンの電気生理学的活動を記録すると、オレキシンニューロンは過分極応答を示した。また、この作用は5HT1A受容体拮抗薬で完全に抑制された。

(2) 新たに作製した5HT1A-floxマウス(未発表)を用い、このマウスをオレキシンニ

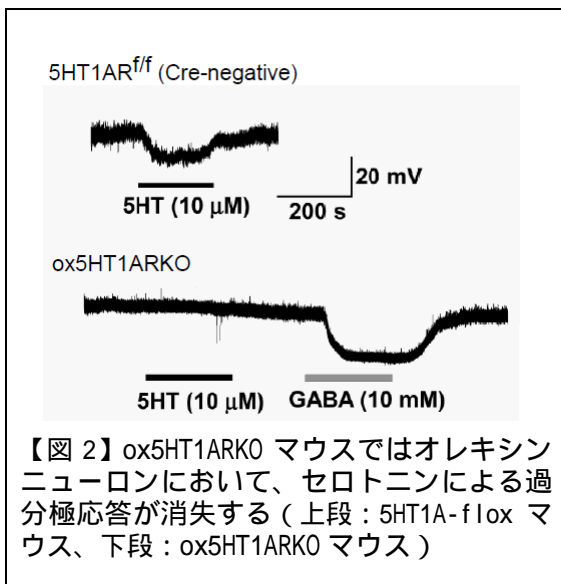
ニューロン特異的に Cre が発現している Orexin-Cre マウスにかけあわせ、オレキシンニューロン特異的に 5HT1A 受容体を欠損させたコンディショナル KO マウス (ox5HT1ARKO マウス) を作出した。

このマウスにおいて、オレキシンニューロン特異的に 5HT1A 受容体が欠損していることを二重蛍光免疫染色法にて確認した。(図 1) 一方、セロトニンニューロン等のその他の部位の 5HT1A 受容体の発現に関しては変化が見られなかった。



【図 1】ox5HT1ARKO マウスではオレキシンニューロン (赤色) に対し選択的に 5HT1A 受容体 (緑色) が欠損している

また、パッチクランプ法を用いて電気生理学的にオレキシンニューロンに発現する 5HT1A 受容体の機能を *in vitro* にて記録したところ、ox5HT1ARKO マウスではセロトニンを投与しても応答は見られず、5HT1A 受容体の機能が欠損していることを確認できた (図 2)。



【図 2】ox5HT1ARKO マウスではオレキシンニューロンにおいて、セロトニンによる過分極応答が消失する (上段: 5HT1A-flox マウス、下段: ox5HT1ARKO マウス)

(3) ox5HT1ARKO マウスの平常時の脳波および筋電図を測定し、それぞれを覚醒・NREM 睡眠・REM 睡眠の 3 つのステージに分類したところ、コントロール群と比較して ox5HT1ARKO マウス群ではマウスの活動期である暗期において NREM 睡眠の量が有意に増加していることが分かった。一方、REM 睡眠量に関して有意な変化は見られなかった。

(4) 神経活動のマーカーとして知られる Fos の発現量を指標としてオレキシンニューロンの神経活動を定量化したところ、平常時の ox5HT1ARKO マウスで NREM 睡眠の増加がみられた暗期においてオレキシンニューロンの Fos 発現量が減少していることが分かった。

(5) 過去に、げっ歯類において拘束ストレス負荷後に REM 睡眠の脳波が増加することが報告されているため (Rampin et al., 1991)、今回は身体的ストレスの一種である拘束ストレスを用いて負荷を行った。ox5HT1ARKO マウスに対してマイルドな拘束ストレスを 30 分間あるいは 90 分間ずつ負荷し、拘束ストレス解放後 24 時間におけるマウスの脳波および筋電図を測定した。その結果、ox5HT1ARKO マウスではコントロール群・30 分間負荷群と比較して 90 分間の拘束ストレスから解放した後の REM 睡眠の量が有意に増加していることが分かった。その際のオレキシンニューロンにおける Fos の発現量に変化は見られなかった。

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 1 件)

Saito, YC, Maejima, T, Nishitani, M, Hasegawa, E, Yanagawa, Y, Mieda, M, Sakurai, T. Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area that make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons. 査読有り
J. Neuroscience, in press, 2018

〔学会発表〕(計 4 件)

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
第 13 回 GPCR 研究会 2016 年 5 月 13 日 ~ 14 日 (東京都・日本科学未来館)

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
第 41 回日本睡眠学会定期学術集会 2016 年 7 月 7 日 ~ 8 日 (東京都・京王ブ

ラザホテル)

齊藤 夕貴, 前島 隆司, 櫻井 武
Mapping of neurons that send direct
input to lateral hypothalamic orexin
neurons

第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月
20 日 ~ 22 日(神奈川県・パシフィコ横浜)

齊藤 夕貴, 前島 隆司, 高橋 徹, 櫻
井 武

Architecture of hypothalamic neural
circuit that regulates sleep /
wakefulness states

第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月
20 日 ~ 23 日(千葉県・幕張メッセ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 夕貴 (SAITO, Yuki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・
技術職員

研究者番号: 70732436

(2) 研究協力者

桜井 武 (SAKURAI, Takeshi)

前島 隆司 (MAEJIMA, Takashi)

崎村 建司 (SAKIMURA, Kenji)

阿部 学 (ABE, Manabu)