

研究種目：基盤研究(A)  
 研究期間：2006 ～ 2009  
 課題番号：18209008  
 研究課題名（和文）睡眠・覚醒の制御機構におけるオレキシンの役割とその作用機構の解明

研究課題名（英文） Roles of orexins in regulation of sleep/wake states

## 研究代表者

松崎 一葉 ( MATSUZAKI ICHIYO )  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
 研究者番号：10229453

研究成果の概要（和文）：バソプレッシン、ニューロテンシン、TRH によってオレキシン産生神経が活性化されることを明らかにした。また、オーファン受容体 BRS-3 によっても制御されている可能性を示した。それぞれの生理的意義に関しては、バソプレッシンによるオレキシン産生神経の活性化は絶水などにより、体内の水が不足したときに惹起される飲水行動や、水を探すための探索行動における覚醒を維持する役割を持っていることが明らかになった。一方、TRH によるオレキシン産生神経の活性化は、交感神経系の活性化を介する全身の基礎代謝の亢進に関わっており、体重の恒常性にも影響を与えることが明らかになった。

また、オレキシン産生神経特異的に GABAB1 受容体を欠損させたマウスは、睡眠・覚醒状態の顕著な分断化が起こっていた。このことから、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。

研究成果の概要（英文）：We have identified several factors that influence activity of orexin-producing neurons, including vasopressin, neurotensin, and thyrotropin-releasing hormone (TRH). We also revealed that orexin-producing neurons express an orphan receptor, BRS-3, which might be also involved in the regulation of orexin neurons. The activation of orexin neurons by vasopressin has an important role in the regulation of spontaneous locomotor activity in mice. This system appears to play a role in water deprivation-induced hyperlocomotor activity, a response to dehydration that increases the chance of locating water in nature. We also found that thyrotropin-releasing hormone modulates behavioral arousal and sympathetic outflow, in part, through the orexin system. We also analyze the in vivo and in vitro phenotype of mice lacking the *GABAB1* gene specifically in orexin neurons, and demonstrate that GABA<sub>B</sub> receptors on orexin neurons are essential in stabilizing and consolidating sleep/wake states.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	17,400,000	5,220,000	22,620,000
2007 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野：環境保健医学

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、バソプレッシン、TRH、アセチルコリン、GABA

### 1. 研究開始当初の背景

1998年に同定された新規神経ペプチド、オレキシンは摂食行動と睡眠・覚醒の制御系と深い関係をもっている。オレキシンを産生するニューロンは摂食中枢である視床下部外側野にのみ局在する。オレキシンを中枢に投与すると摂食量が上昇することなどから、摂食行動の制御因子としてまず報告された。その後、オレキシン産生ニューロンの変性がナルコレプシーの病因であることが明らかになり、この物質が覚醒の維持に重要な役割を担っていることが示された。さらに、オレキシン産生ニューロンの入出力系の解明により、大脳辺縁系、摂食行動の制御系、覚醒制御システムとの相互の関係が明らかになってきた。オレキシン系は単に睡眠・覚醒調節機構の一部であるだけでなく、情動やエネルギーバランスに応じ、睡眠・覚醒や報酬系そして摂食行動を適切に制御する統合的な機能を担っている。オレキシン受容体作動薬や拮抗薬は睡眠障害や不眠症のほか、摂食障害、薬物依存などにも有効な治療薬となる可能性がある。さらに、報酬系との関連にも注目されており、情動や体内時計、エネルギー恒常性を統合した情報をもとに、適切な睡眠・覚醒状態をサポートする機能を持っている。摂食行動をはじめとする動機にともなう行動を制御するには覚醒の維持や報酬系の関与が必要であり、オレキシンはさまざまな行動をサポートするための覚醒を維持する機能をもっていると考えられる。

### 2. 研究の目的

オレキシンによる睡眠・覚醒の制御機構を解明することを本研究の目的とした。そのために、オレキシン産生神経の活性に影響を与える因子とその機構の生理的意義を解析する。

### 3. 研究の方法

オレキシン産生神経に特異的にGFPを発現するマウスを使用し、その脳スライス標本を用いて蛍光顕微鏡下でオレキシン産生神経を同定し、電気生理学的にその活動を記録する。この系にさまざまな因子を作用させ、活動の変化を探ることにより、オレキシン産生神経に対する作用を調べる。作用があった因子に関しては、組織学的手法や遺伝子改変マウスをもちいた解析と表現系の解析によりその

生理的意義を検討した。

また、オレキシン産生神経特異的にCre組換え酵素を発現するマウスを作成した。このマウスをGABAB受容体 $flox$ マウスと交配させてオレキシン産生神経特異的にGABAB受容体遺伝子を欠損したマウスを作成し、その表現型を解析した。

### 4. 研究成果

ラットやマウスのオレキシン産生神経の活動は、覚醒時にon、睡眠時にoffとなることが示されている。このような制御にはどのような神経回路や神経伝達物質が介在しているのだろうか。われわれは、これまでに、セロトニン、ノルアドレナリンはオレキシン産生神経を強力に抑制し、アセチルコリンは約三分の二のオレキシン産生神経を活性化することを見いだしてきた。また、コレシストキニン、グレリン、CRFといった神経ペプチドによっても活性化されることを解明してきた。また、動物の全身のエネルギーバランスの指標となる物質によっても制御される。たとえば、レプチンによって抑制され、細胞外グルコース濃度が高くなったときにも抑制される。

本研究では、これらに加え、バソプレッシン、ニューロテンシン、TRHによってオレキシン産生神経が活性化されることを明らかにした。また、オーファン受容体BRS-3を刺激することによってもオレキシン産生神経は活性化した。

それぞれの生理的意義に関しては、バソプレッシンによるオレキシン産生神経の活性化は絶水などにより、体内の水が不足したときに惹起される飲水行動や、水を探するための探索行動における覚醒を維持する役割を持っていることが明らかになった。

一方、TRHによるオレキシン産生神経の活性化は、交感神経系の活性化を介する全身の基礎代謝の亢進に関わっており、体重の恒常性にも影響を与えることが明らかになった。

また、オレキシン産生神経特異的にGABAB1受容体を欠損させたマウスは、睡眠・覚醒状態の顕著な分断化が起こっていた。このことから、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、5HT1A受容体遺伝子をオレキシン神経において選択的に欠損させたマウスを作成し、その表現型を解析中である。

一方、近年の研究によりオレキシン産生神経に入力する上流の神経細胞群が同定されている。われわれはオレキシン産生神経が、扁桃核、分界条床核などの大脳辺縁系や視索前野 (POA) の GABA 作動性神経、縫線核のセロトニン作動性神経からの入力をうけていることを明らかにしている。こうした入力系により、オレキシン産生神経覚醒が必要なときに活性化され、脳幹のモノアミン神経やコリン作動性神経の適切な活性を制御していると思われる。特に、扁桃核や分界条床核は、情動の制御にかかわる部分であり、脳幹や視床下部などに出力し、情動にともなう運動系の制御、交感神経系の活性化、HPA軸の活性化に関与している。情動が発動しているときには注意力が上がり、覚醒レベルも上昇するが、この現象に大脳辺縁系からオレキシン神経への入力がかかわっている可能性が示唆された。実際に、オレキシン欠損マウスでは扁桃核や分界条床核を直接刺激したことによって引き起こされる自律神経反応も非常に弱いことが明らかになった。このことから、情動に伴う自律神経系の反応にはオレキシンの機能が不可欠であることが示された。このように大脳辺縁系からの入力は、情動に伴う覚醒レベルの上昇や自律神経系の制御に関わっていると考えられる。

本研究により、オレキシン産生ニューロンへの入力系とその生理学的意義が明らかになってきた (図)。

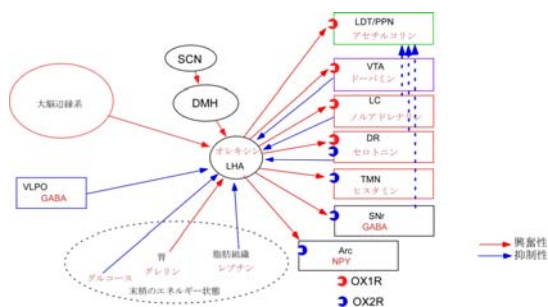


図  
こうした入力系は、睡眠・覚醒や報酬系、そして摂食行動の制御に重要な神経系の一部を構築している。

## 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 67 件)

1. 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. in press *J Mol Neurosci*. 2010

査読有り

2. 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.* **10**, 466-480, 2009 査読有り
3. 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* **1262**, 25-37 (2009). 査読有り
4. Hara, J. Gerashchenko, D, Wisor, J.P., Sakurai, T., Xie, X., & Kilduff, T.S. Thyrotropin-Releasing Hormone Increases Behavioral Arousal through Modulation of Hypocretin/Orexin Neurons. *J. Neurosci.* **29**, 3705-3714, 2009. 査読有り
5. Irukayama-Tomobe, Y., Tanaka, H., Yokomizo, T., Hashidate-Yoshida, T., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor GPR109B. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **106**, 3930-3934, 2009. 査読有り
6. 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**, 4459-64, 2009. 査読有り
7. Honda, M., Eriksson, K.S., Zhang, S., Tanaka, S., Lin, L., Salehi, A., Hesla, P.E., Maehlen, J., Gaus, S.E., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Taheri, S., Tsuchiya, K., Honda, Y. & Mignot, E. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS ONE.* **4**, e4254, 2009. 査読有り
8. 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.* **9**, 64-76, 2009. 査読有り
9. Hondo, M., Ishii, M., & Sakurai, T. The NPB/NPW neuropeptide system and its role in regulating energy homeostasis, pain, and emotion. *Results Probl Cell Differ* **46**, 239-256 (2008). 査読有り
10. Aikawa, S., Ishii, M., Yanagisawa, M., Sakakibara, Y. & Sakurai, T. Effect of neuropeptide B on feeding behavior is influenced by endogenous corticotropin-releasing factor activities. *Regul Pept.* **151**, 147-152, 2008. 査読有り
11. Gerashchenko, D., Wisor, J.P., Burns, D., Reh, R.K., Shiromani, P.J., Sakurai, T., de la Iglesia, H.O., & Kilduff, T.S. Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **105**, 10227-10232, 2008. 査読有り
12. Xie, X, Wisor, JP, Hara, J, Crowder, TL, Lewinter,

R, Khroyan, T.V., Yamanaka, A., Diano, S., Horvath, T.L., Sakurai, T., Toll, L. & Kilduff, T.S. Hypocretin/orexin & nociceptin/orphanin FQ coordinately regulate analgesia in a mouse model of stress-induced analgesia. *J Clin Invest.* 118, 2471-81, 2008. 査読有り

13. Tsunematsu, T, Fu, L.Y., Yamanaka, A., Ichiki, K., Tanoue, A., Sakurai, T., & van den Pol A.N. Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in orexin/hypocretin neurons: implications for water homeostasis. *J Neurosci.* 28, 228-238, 2008. 査読有り

14. Ohno, K., Hondo, M., & Sakurai, T. Cholinergic Regulation of Orexin/Hypocretin Neurons through M3 Muscarinic Receptor in mice, *J. Pharmacol. Sci.* 106, 485-91, 2008. 査読有り

15. Takayasu S, Sakurai T. Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasawa YI, Ikeda Y, Sakakibara I, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 7438-43, 2006. 査読有り

16. Xie X, Crowder TL, Yamanaka A, Morairty SR, Lewinter RD, Sakurai T. Kilduff TS. GABAB receptor-mediated modulation of hypocretin/orexin neurons in mouse hypothalamus. *J Physiol.* 574, 399-414, 2006. 査読有り

17. Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol.* 96, 284-98. 2006. 査読有り

18. Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T. Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci.* 26, 398-405, 2006. 査読有り

19. Yanagita M, Okuda T, Endo S, Tanaka M, Takahashi K, Sugiyama F, Kunita S, Takahashi S, Fukatsu A, Yanagisawa M, Kita T, Sakurai T. Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), a novel BMP antagonist expressed in the kidney, accelerates tubular injury. *J Clin. Invest.* 116, 70-79, 2006. 査読有り

[学会発表] (計 67 件)

1. Sakurai, T. Genetic variation of NPBWR1 alters amygdala function. Neuroendocrine Function of GPCRs (GPCR2010). Official Satellite Symposium of the 14<sup>th</sup> International Congress on Endocrinology, Kyoto, March 30-31, 2010.
2. Sakurai, T. Roles of orexins in regulation

of energy homeostasis. Symposium of the 14<sup>th</sup> International Congress on Endocrinology, Kyoto, March 27-30, 2010.

3. 桜井 武 新規神経ペプチドとその生理機能の探求 第1回 Advans 研究会 名古屋 2009年12月26日
4. 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」札幌 2009年12月8日,
5. 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 金沢
6. 桜井 武 新規神経ペプチドと精神機能「社会性認識」学際脳科学シンポジウム 2009年11月6日、金沢
7. 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, Yakushima, Kagoshima, Oct 02-03, 2009.
8. Sakurai, T A decade of research on orexin. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, July 29, 2009.
9. 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 福井
10. 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日日本実験動物学会総会 シンポジウム3 大宮
11. 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
12. 桜井 武 新規神経ペプチドの探索とその機能解析 フォーラム富山第27回研究会 富山 2009年2月10日
13. Sakurai, T Speaker in the 3<sup>rd</sup> annual symposium of Japanese-French Frontiers of Science, Kanagawa, Japan, Jan 24-26, 2009.
14. Sakurai, T Acute and Chronic Regulation of Sleep-Wakefulness States by Orexin/Hypocretin Neurons. SfN meeting, Washington D.C., USA, November 12-16, 2008
15. 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, Japan.
16. Sakurai, T Roles of orexin/hypocretin system in the regulation of sleep-waking cycle. Acta Physiologica International Symposium. August 13-14, 2008 Oulu,

- Finland
17. 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, MD, USA, June7-12, 2008
  18. 桜井 武 エネルギー恒常性と睡眠・覚醒を結ぶオレキシン神経の役割. 日本薬学会関東支部会シンポジウム 2007年10月6日 東京
  19. 桜井 武 情動反応におけるNPB/NPWシステムの役割 シンポジウム 2A Neuro2007年9月10日 横浜
  20. 桜井 武 オレキシンによる睡眠・覚醒状態の安定化機構 KIGS/KIMS Japan National Conference, 2007 横浜 2007年9月8日
  21. 桜井 武 「新規神経ペプチドによる食行動と生活リズムの制御機構」特別講演 第17回体力・栄養・免疫学会 H19年8月31日(金) 大手町サンケイプラザ
  22. 桜井 武 オレキシンによる睡眠覚醒状態の制御機構 第143回日本獣医学会学術集会 2007年4月3日~5日 つくば国際会議場
  23. 桜井 武 オレキシン産生神経による睡眠覚醒状態の安定化機構 第10回お茶の水睡眠障害懇話会 2007年2月27日 東京医科歯科大学
  24. Sakurai, T. Neural circuit of orexin neurons: a mechanism that maintains proper sleep/wakefulness states according to inner and outer environments of animals. Plenary Symposium World Association of Sleep Medicine, 2<sup>nd</sup> World Congress, Bangkok, Thailand, February 4-8, 2007.
  25. 桜井 武 reverse pharmacology による新規神経ペプチドの研究 第13回秋田疼痛研究会 2007年1月13日 秋田県保健センター
  26. 桜井 武 オレキシンによる睡眠・覚醒状態の安定化機構 阪大蛋白研セミナー 2007年1月25日 蛋白質研究所講堂 大阪
  27. T. Sakurai, Neural Circuit of Orexin Neurons: A Mechanism that Maintains Proper Sleep/wakefulness States According to Inner and Outer Environments of Animals BSI Forums RIKEN Brain Science Institute, Wako 2006年12月27日
  28. 桜井 武 「睡眠と覚醒の制御機構における視床下部オレキシン産生神経の役割」第16回神経科学の基礎と臨床 大阪日本シェーリング株式会社 2006年12月16日
  29. 桜井 武 「オレキシン」第31回比較内分泌学会シンポジウム「比較内分泌学の世紀」早稲田大学国際会議場「伊深ホール」2006年12月7日
  30. T. Sakurai. Roles of Orexins in Regulation of Sleep/Wakefulness 第28回日本生物学的精神医学会、第36回日本神経精神薬理学会、第49回日本神経化学会大会 合同年会 名古屋 2006年9月14日~9月16日
  31. T. Sakurai. Homeostatic and emotional regulation of sleep/wakefulness by orexin neurons, Satellite Symposium of REGPEP'06 Half-Day Symposium on GPCRs Hakone Prince Hotel, September2, 2006
  32. 桜井 武 「オレキシン産生神経による覚醒と睡眠の安定化機構」第18回 21世紀COEセミナー「脳の新規ホルモンと記憶・情動・睡眠の制御: アクチビン・オレキシン・性ホルモン」東京大学駒場キャンパス アドバンスストラボラトリー 2006年7月29日
  33. T. Sakurai. Roles of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness states. SRI division seminar, Stanford Research Institute, Palo Alto, CA, 23 June, 2006.
  34. T. Sakurai. Molecular genetics and histological identification of input and output systems of the orexin neurons: Implication in sleep/wake regulation and energy homeostasis. International Congress of Neuroendocrinology (ICN 2006), Pittsburgh, Pennsylvania, USA, June 19 2006
- [図書] (計5件)
1. Sakurai, T. Input and Output of Orexin/Hypocretin Neurons: Link Between Arousal Pthways and Feeding Behavior. Bassetti, C.L., Billard, M., and Mignot, E. ed. Lung Biology in Health and Disease Vol.22: Narcolepsy and Hypersomnia 399-410 Informa Healthcare, USA, Inc., 2007.
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
松崎 一葉 (MATSUZAKI ICHIYO)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
研究者番号: 10229453  
H18. 9. 8~H22. 3. 31

後藤 勝年 (GOTO KATSUTOSHI )  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
研究者番号：30012660  
H18. 4. 1～H18. 9. 7

(2) 研究分担者

櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI )  
金沢大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60251055

入鹿山 容子 (IRUKAYAMA YOKO)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：90312834  
H19-H21