

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02595

研究課題名(和文) 大脳辺縁系と睡眠覚醒制御系との構造的・機能的連関の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the structural and functional linkage between the limbic system and the sleep-wake control system.

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：扁桃体におけるドーパミンの動態がレム睡眠制御に及ぼす影響を明らかにしたほか、脊髄前角に投射する延髄腹側部のグリシン作動性ニューロンがレム睡眠時の筋緊張低下に必須であること、これらのニューロンはSLDからの興奮性ニューロンによる制御を受けていることを明らかにした。またこの経路がカタプレキシーの発現にも関与することを示した。また、オレキシンニューロンとヒスタミンニューロンは大脳辺縁系や報酬系、視索前野などから、非常に似通った入力を受けていることが明らかになった。強い関係をもつこれら二つのニューロン群は並列に同様の制御を受けていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レム睡眠時には脳の広範な領域が賦活しているが、運動神経は強く抑制されている。脳幹から脊髄前角に投射し、レム睡眠時に運動神経を抑制する神経回路を明らかにした。また、扁桃体がレム睡眠制御に関わるメカニズムの一部を明らかにした。このような知見からレム睡眠の制御機構を理解することにより、レム睡眠行動障害やカタプレキシーのメカニズム理解に資する知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：We revealed importance of dopamine signaling in the amygdala in the regulation of REM sleep. We also found that glycinergic neurons in the ventral part of the medulla projecting to the anterior horn of the spinal cord are essential for hypotonia during REM sleep, and that these neurons are regulated by excitatory neurons from the SLD. These neurons are controlled by excitatory neurons from the SLD. We also showed that this pathway is involved in the expression of cataplexy. We also found that orexin and histamine neurons receive very similar inputs from the limbic system, reward system, and preoptic area. These two groups of neurons, which have a strong relationship, were shown to be similarly regulated in parallel.

研究分野：神経科学

キーワード：扁桃体 レム睡眠 ドパミン 筋緊張 グリシン

## 1. 研究開始当初の背景

覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠の表出は情動の影響を強く受けている。しかし、情動に関わる大脳辺縁系がどのような神経経路および神経機構で睡眠覚醒制御系に影響を与えているかは明らかにされていない。逆に覚醒レベルは行動の変化など情動表出にも強い影響を与えるものでもあり、大脳辺縁系がどのような機構で覚醒に影響をあたえるかを明らかにすることは、情動のメカニズムを包括的に理解する上で重要である。レム睡眠中には、大脳辺縁系が強く賦活していることが知られており、その意義と機構を理解する上でもレム睡眠の制御系を含む睡眠覚醒制御系と大脳辺縁系の関係を解明する必要がある。大脳辺縁系と覚醒-ノンレム睡眠-レム睡眠を制御する睡眠覚醒制御系の間には機能的連絡があり相互に影響を与えながら機能していると考えられる。さらに、レム睡眠中には大脳辺縁系が強く賦活していることが、fMRI や PET による研究などで示されており、また、脳幹から  $\alpha$  運動ニューロンにグリシンと GABA を介した強力な抑制信号が送られ、筋緊張は大きく低下している(レムアトニア)。一方、オレキシンニューロンが欠損したナルコレプシー患者では、覚醒時、情動が発動している時にレムアトニアの機構が働いてしまい、カタプレキシー(情動脱力発作)と呼ばれる筋緊張の低下をとまなう発作を来す。これらから、大脳辺縁系の活動と、レム睡眠中に見られる筋緊張低下のメカニズムに深い関係があり、ここにオレキシン系が介在して覚醒中には筋緊張機構を解除している可能性が高い。

## 2. 研究の目的

大脳辺縁系が覚醒制御系にどのような神経経路で覚醒レベルを上昇させるのかを明らかにする一方、レム睡眠の出力の一つである筋緊張低下メカニズムからさかのぼり、大脳辺縁系とレム睡眠の制御系との関連、さらにオレキシンがこれらのシステムにどのように作用するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)レムアトニアに関わる神経回路の研究

遺伝子改変マウスを用いて、延髄腹内側部(VMM)のグリシン作動性ニューロンの出力先を探索した。腰髄前角の運動ニューロンに出力するグリシン作動性ニューロンのみを GFP で標識し、このニューロンの軸索を探索した。

また、このグリシン作動性ニューロン群への信号の入力源を探索するため、神経回路の標識として、改変型狂犬病ウイルスベクターを用いた実験を行った。

次に、VMM のグリシン作動性ニューロンに、破傷風毒素軽鎖(TeTxLC)を発現させて神経伝達を阻害し、レム睡眠時の筋緊張にあたえる影響を明らかにした。

VMM に入力している SLD の興奮性ニューロンの神経伝達の阻害も試みた。

さらに、ナルコレプシーモデルマウス orexin-ataxin3 mouse に TeTxLC を導入して、VMM のグリシン作動性ニューロンや、VMM へ投射する SLD の興奮性ニューロンの神経伝達を阻害し、カタプレキシーへの影響を調べた。

### (2)扁桃体によるレム睡眠の制御に関わる研究

GRAB<sub>DA</sub> センサーを用いて、扁桃体外側部(BLA)を含む複数の脳部位におけるドーパミン(DA)の濃度をファイバーフォトメトリーによりリアルタイムでモニターし、EEG/EMG 計測による睡眠覚醒状態との相関関係を明らかにした。また、光遺伝学および化学遺伝学的に DA レベルを操作し睡眠覚醒状態に与える影響を明らかにした。

### (3)オレキシンニューロン及びヒスタミンニューロンの神経性入力

覚醒に関わる視床下部オレキシンニューロンやヒスタミンニューロンの制御系を明らかにするために組み替え狂犬病ウイルスを用いて逆行性トレーシングを行った。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った。特に重要な働きをしていると考えられるオレキシンニューロンの視床下部内における存在部位と入力系をその出力先別に cTRIO 法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1)レムアトニアに関わる神経回路の研究

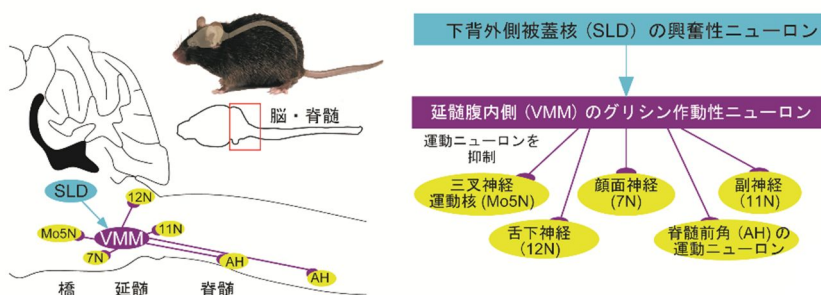
延髄腹内側部(VMM)のグリシン作動性ニューロンの出力先を探索した。腰髄前角の運動ニューロンに出力するグリシン作動性ニューロンのみを蛍光色素で標識し、このニューロンの軸索を探索したところ、三叉神経運動核、顔面神経、副神経、舌下神経、および頸髄から腰髄にかけての脊髄前角へ、軸索が伸びていることを認めた。すなわち、VMM のグリシン作動性ニューロンでは、体性運動ニューロンに限って信号の出力先を持つニューロン群が存在していた。一方で、外眼筋を支配する動眼神経、滑車神経、外転神経には、VMM のグリシン作動性ニューロンの支配が及んでいなかった。

この VMM グリシン作動性ニューロン群への信号の入力源を探索するため、神経回路の標識として、改変型狂犬病ウイルスベクターを用いた実験を行った。その結果、このニューロン群は、脳

幹を中心に多くの領域から入力を受けていることが明らかになった。その中でも特に、レム睡眠時に活発に活動することで知られる下背外側被蓋核 (SLD) に多くの入力源が存在していた。次に、VMM のグリシン作動性ニューロンに、破傷風毒素軽鎖 (TeTxLC) を発現させて神経伝達を阻害し影響を明らかにしたところ、本来筋活動が生じないレム睡眠中に、筋活動と四肢体幹の運動が生じ、レム睡眠行動障害 (RBD) と同様の異常を呈した。VMM に入力している SLD の興奮性ニューロンの神経伝達の阻害によっても RBD が生じた。つまり、SLD→VMM→運動ニューロンという神経回路が、レム睡眠時の筋脱力を制御することが示唆された。VMM に入力している SLD の興奮性ニューロンの神経伝達の阻害も試みた。

さらに、ナルコレプシーモデルマウス orexin-ataxin3 mouse に TeTxLC を導入して、VMM のグリシン作動性ニューロンや、VMM へ投射する SLD の興奮性ニューロンの神経伝達を阻害し、カタプレキシーが顕著に減少することが分かり、レム睡眠時に筋脱力を制御している神経回路が、カタプレキシーの筋脱力時にも共通して働いていることが明らかになった (Uchida et al., 2021) (図)。

図 本研究で明らかにした筋脱力を起こす神経回路



### (2)扁桃体によるレム睡眠の制御に関わる研究

ノルアドレナリン、セロトニン、および DA の脳内濃度をファイバーフォトメトリによって測定したところノンレム睡眠からレム睡眠へ移行するタイミングで BLA において特徴的な DA のピークが観察された。この DA は腹側被蓋野由来であり、光遺伝学的にこの DA ピークを誘導するとレム睡眠が誘導され、阻害するとレム睡眠の発現が強く阻害された。このことから扁桃体の DA 動態がレム睡眠制御に大きくかかわっていることが示唆された (投稿中)。

### (3)オレキシンニューロン及びヒスタミンニューロンの神経性入力

オレキシンニューロンとヒスタミンニューロンに着目し、これらのニューロン群に接続する神経細胞を網羅的に明らかにする研究を行った。狂犬病ウイルスベクターと遺伝子改変マウスを用いて、これらのニューロンにシナプスを介して入力するニューロン群を明らかにした。その結果、オレキシンニューロンとヒスタミンニューロンは大脳辺縁系や報酬系、視索前野などから、非常に似通った入力を受けていることが明らかになった。強い関係をもつこれら二つのニューロン群は並列に同様の制御を受けていることが示された。さらに、視索前野のスリープアクティブニューロンがオレキシンおよびヒスタミンニューロンにシナプス接続し、これらのニューロン群を抑制することによって睡眠を促すことを明らかにした。また、電気生理学的に、オレキシンニューロンやヒスタミンニューロンに接続しているスリープアクティブニューロンは、覚醒物質であるノルアドレナリンやセロトニンによって抑制されることが明らかになった (Saito et al., 2018)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi, T.M., Sunagawa, G.A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., Sakimura, K., Takahashi, M., Sakurai, T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2163-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Tong, Yanagida Junko, Kamii Hironori, Wada Shintaro, Domoto Masaki, Sasase Hitoki, Deyama Satoshi, Takarada Takeshi, Hinoi Eiichi, Sakimura Kenji, Yamanaka Akihiro, Maejima Takashi, Mieda Michihiro, Sakurai Takeshi, Nishitani Naoya, Nagayasu Kazuki, Kaneko Shuji, Minami Masabumi, Kaneda Katsuyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex mediate the formation and retrieval of cocaine associated memories in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Addiction Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/adb.12723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito Yuki C., Tsujino Natsuko, Abe Manabu, Yamazaki Maya, Sakimura Kenji, Sakurai Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Serotonergic Input to Orexin Neurons Plays a Role in Maintaining Wakefulness and REM Sleep Architecture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2018.00892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito Yuki C., Maejima Takashi, Nishitani Mitsuhiro, Hasegawa Emi, Yanagawa Yuchio, Mieda Michihiro, Sakurai Takeshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6366 ~ 6378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2835-17.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Steiner Nadia, Rossetti Clara, Sakurai Takeshi, Yanagisawa Masashi, de Lecea Luis, Magistretti Pierre J., Halfon Olivier, Boutrel Benjamin	4. 巻 133
2. 論文標題 Hypocretin/orexin deficiency decreases cocaine abuse liability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 395 ~ 403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2018.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 内田 俊太郎, 征矢晋吾, 櫻井 武
2. 発表標題 レム睡眠時筋脱力の神経回路
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学学会大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 恵美, 前島 隆司, 吉田 隆行, 吉岡 充弘, 柳沢 正史, 三枝 理博, 櫻井 武
2. 発表標題 レム睡眠関連脱力発作における扁桃体へのドーパミン放出の影響
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学学会大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakurai T
2. 発表標題 Neural circuits that link the limbic system and systems that regulate arousal
3. 学会等名 IRC* Decoding Sleep SYMPOSIUM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakurai T
2. 発表標題 Neuronal Circuits of Narcolepsy
3. 学会等名 Workshop on Sleep Regulation and Circadian Rhythm (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Sakurai
2. 発表標題 Neurons at the Interface of Systems that Regulate Emotion and Arousal/Vigilance.
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 覚醒と睡眠の制御におけるオレキシンの役割
3. 学会等名 第20回国際農村医学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 大脳辺縁系と覚醒系を結ぶオレキシンの役割
3. 学会等名 第7回日本精神科医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 大脳辺縁系と覚醒系の相互作用におけるオレキシン系の役割
3. 学会等名 日本睡眠学会第43回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 睡眠・覚醒研究におけるコネクトーム解析と神経操作技術の役割
3. 学会等名 日本睡眠学会第43回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 睡眠覚醒制御系におけるオレキシンの役割
3. 学会等名 第2回日本脳神経外科認知症学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 櫻井 武	4. 発行年 2018年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 240
3. 書名 「こころ」はいかにして生まれるのか 最新脳科学で解き明かす「情動」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------