

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15345

研究課題名(和文)恐怖記憶の表出が睡眠に与える影響

研究課題名(英文)The effect of behavioral fear expression on sleep/wake architecture

研究代表者

征矢 晋吾 (Soya, Shingo)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：90791442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、オレキシンがOX1Rを介して下流のドーパミンおよびセロトニンニューロンを制御することで恐怖記憶の固定および恐怖応答の表出に関与することが明らかになった。先行研究の結果を考慮すると、オレキシンは下流のモノアミンニューロンに発現するOX1Rを介して恐怖刺激による覚醒の増加および恐怖応答の調節を行っていると考えられる。また、恐怖応答の減弱が観察されたOX1R欠損マウスにおいては、恐怖刺激による顕著な覚醒時間の増加は観察されなかった。したがって、恐怖刺激による過度な覚醒および恐怖応答は興奮性であるOX1Rを介したモノアミンニューロンの活動増加に起因する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTSD患者においては睡眠障害が併発することが知られている。過度な覚醒や恐怖による睡眠障害において、覚醒の維持に関わるオレキシンとその下流の神経回路の役割が明らかになれば不眠を引き起こす神経基盤の解明に寄与できる。本研究では、モノアミンニューロンに発現するOX1Rが恐怖応答の調節に関与し、OX1Rの欠損による恐怖応答の減弱はその後の過覚醒時間を減少させることが明らかになった。このことから、オレキシンは覚醒および恐怖応答の強弱を調節し、オレキシンシステムの過剰な興奮が恐怖による睡眠障害の作用機序の一つであるとともに、OX1R選択的拮抗薬により過度な恐怖応答および覚醒を抑制できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we found that orexin modulates dopaminergic and serotonergic neurons via OX1R signaling to control fear memory consolidation and behavioral fear expression. Considering the previous studies, OX1R signaling in monoaminergic neurons might play an important role in fear-induced hyper-arousal and modulation of fear expression. Moreover, OX1RKO mice which showed decreased fear expression didn't show hyper-arousal phenotype induced by fearful stimuli. Therefore, hyper-arousal and increased fear expression induced in fearful situation might be regulated by increased monoaminergic tone via excitatory OX1R signaling.

研究分野：行動生理学

キーワード：オレキシン 恐怖 睡眠 過覚醒

## 1. 研究開始当初の背景

過度な恐怖体験からPTSDを発症する患者の多くは同時に睡眠障害を併発することが知られている。しかし、PTSD患者における睡眠障害の発症メカニズムについては全く明らかになっていない。恐怖応答や恐怖記憶の形成メカニズムに関する研究報告が多数ある一方で、過剰な恐怖が睡眠を傷害する詳細な神経メカニズムについては未だ不明な点が多い。この問題を解決するため、申請者は覚醒の維持にかかわるオレキシンに注目した。オレキシンは主として覚醒の維持に関わることが知られているが、様々な生理作用との関わりについても報告されている。近年、申請者はオレキシンがその直接の下流である青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロン (LC-NAニューロン) を調節し、恐怖記憶の形成に関与することを報告した(Soya et al., 2013)。さらに、その後の研究によりオレキシン神経が下流のLC-NAニューロンを活性化させることにより恐怖記憶だけでなく恐怖行動自体の表出についても関与していることが示唆された(Soya et al., 2017)。LC-NAに投射するオレキシンニューロンの過度な興奮は覚醒および恐怖応答を促進することが考えられ、過度な恐怖による睡眠障害のメカニズムの一端である可能性が考えられる。また、OX1Rの選択的拮抗薬によって、過度な恐怖応答が減弱することから、LC-NAおよびモノアミンニューロンに発現するOX1Rが恐怖応答制御に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、恐怖応答制御においてモノアミンニューロンに発現するOX1Rが果たす役割については不明な点が多い。上記の知見から、オレキシンニューロンはOX1Rを介して下流のモノアミンニューロンを調節することで恐怖応答の制御に関与することが推察され、この神経回路の制御不全が睡眠を傷害する誘発する可能性が考えられる。したがって本研究では、オレキシンとその下流のモノアミンニューロンに着目し、過度な恐怖が睡眠覚醒動態に与える影響について検討した。

## 2. 研究の目的

課題では「恐怖記憶の表出が睡眠に与える影響」と題し、過度な恐怖を呈するPTSDや不安症の患者に多く見られる睡眠障害がどのようにして引き起こされるのか明らかにするため、覚醒維持に関わるオレキシンシステムの制御不全が恐怖応答および睡眠覚醒動態に与える影響を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ・遺伝子改変マウスの導入

OX1Rのエクソンの両端にloxP1配列を挿入したOX1R-floxedマウス (OX1R<sup>F/F</sup>) をノルアドレナリンニューロン特異的にCreが発現するマウス (NAT-Cre)、セロトニンニューロン特異的にCreが発現するマウス (ePET-Cre)、ドーパミンニューロン特異的にCreが発現するマウス (DAT-IRES-Cre) とそれぞれ交配させることでモノアミンニューロン特異的にOX1Rが欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成した (OX1R<sup>F/F</sup>; NAT-Cre, OX1R<sup>F/F</sup>; ePET-Cre, OX1R<sup>F/F</sup>; DAT-IRES-Cre)。また、全身でOX1Rを欠損したマウス (OX1R<sup>KO</sup>, OX1R<sup>-/-</sup>) およびコントロールとして野生型のマウスについても解析に用いた。

### ・オレキシン受容体拮抗薬による受容体抑制

OX1Rの急性的な作用を確かめるため、OX1R選択的受容体拮抗薬 (SB334867) を用いた。腹腔内に投与し (5mg/kg)、恐怖応答および睡眠解析を行った。

### ・恐怖条件付けテスト

恐怖記憶の評価には2種類の恐怖条件付けテストを用いた。まず、チャンバーAにマウスを入れ、30秒の音刺激 (正弦波: 2900Hz) の直後に0.3mAの電気刺激を与える操作を五回行った。24時間マウスをホームケージで飼育し、再び同じチャンバーに入れ恐怖記憶の指標であるすくみ行動時間を測定した (文脈依存的恐怖記憶想起テスト)。さらに異なるチャンバーBにマウスを

暴露し、チャンパーAで用いた音刺激を提示している間のすくみ行動時間を測定した（手がかり依存的恐怖記憶想起テスト）。

#### ・睡眠解析

マウスの頭蓋に電極を固定し、電極に取り付けたワイヤーによってマウスの頸部の筋肉に留置することで筋電を同時に計測した。得られたデータは専用ソフトウェア（Sleep sign）によって解析し、睡眠覚醒動態（覚醒、Non-REM、REM）を定量および可視化した。

#### 4. 研究成果

モノアミンニューロン特異的なコンディショナルノックアウトマウスを用いて恐怖条件付けテストを行った結果、特にセロトニンニューロンおよびドーパミンニューロン特異的にOX1Rを欠損したマウス（OX1R<sup>F/F</sup>; ePET-Cre, OX1R<sup>F/F</sup>; DAT-IRES-Cre）は、音および文脈に対する恐怖記憶テストにおいて顕著な恐怖応答の減弱を示した。さらにOX1RKOマウスを用いて実験を行った結果、恐怖条件付けおよびその後の想起テストにおいて恐怖応答の減弱が見られた。また、OX1R選択的拮抗薬を腹腔に投与し、急性的にOX1Rこの機能を抑制した場合も同様の効果が観察された。これらのことから、オレキシンは覚醒の維持だけでなく、OX1Rを介して下流のセロトニンニューロンやドーパミンニューロンを制御することで、恐怖記憶の固定および恐怖応答の表出に関与することが明らかになった（図2）。申請者はオレキシンがOX1Rを介してノルアドレナリンニューロンを制御し、恐怖応答を調節すること(Soya et al., 2017)を明らかになっており、覚醒システムと恐怖応答の制御機構の密接な関係が示唆される。このことから、オレキ

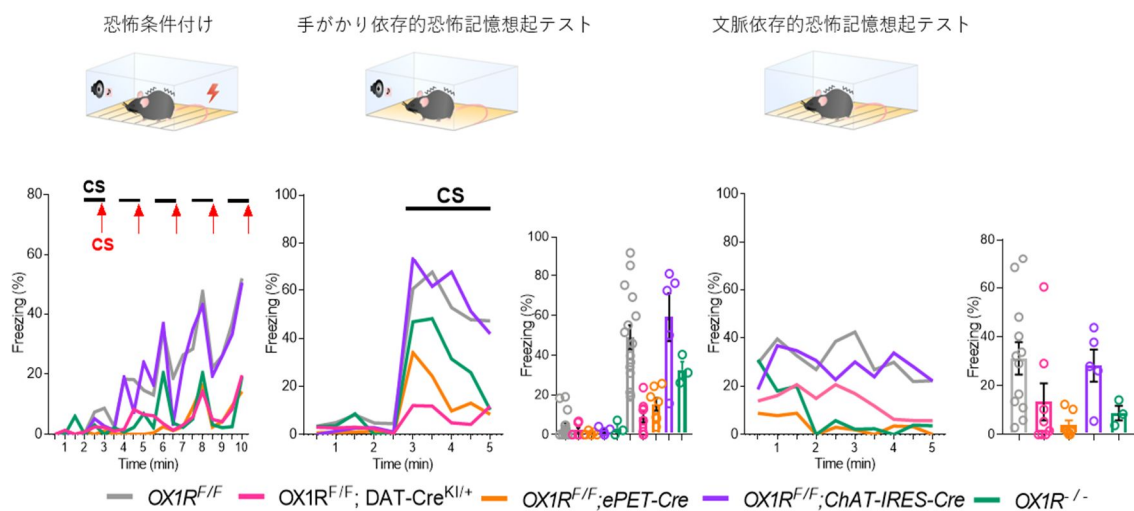
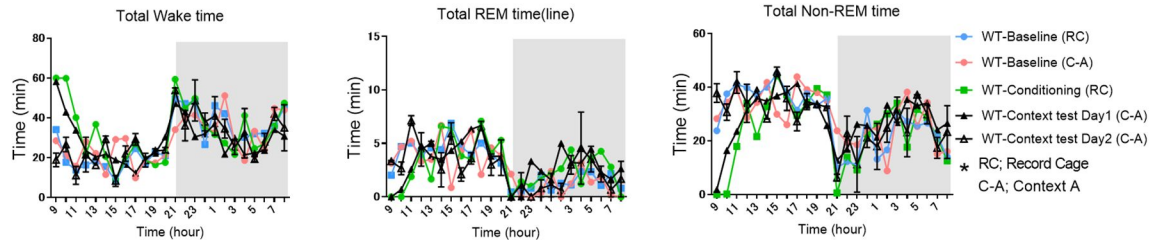


図1 コンディショナルノックアウトマウスにおける恐怖応答の減弱

シンシステムは恐怖応答の強弱を調節し、過度な恐怖応答の表出が睡眠障害を引き起こす可能性が示唆された。

次に、恐怖応答の減弱が見られたOX1RKOマウスを用いて、恐怖想起テストにおける過剰な恐怖応答後に睡眠覚醒動態がどのように変化するかを観察した。野生型マウスおよびOX1RKOマウスの頭蓋に睡眠測定用の電極を留置し、ホームケージ（RC、青線）およびチャンパーA（C-A）、恐怖条件付け直後のホームケージ（RC、緑線）、恐怖条件付け後のチャンパーA（恐怖想起テスト、C-A、黒三角）、恐怖条件付け後二日目のチャンパーA（恐怖想起テスト、C-A、白三角）において脳波および筋電の測定を行った。睡眠覚醒動態を解析した結果、恐怖条件付け直後および恐怖想起テストの際に恐怖応答の減弱が見られたOX1RKOマウスは明期において恐怖による過度な覚醒時間が減弱していた（図2左上下段）。一方で、野生型では恐怖条件付け直後および

[WT]



[1RKO]

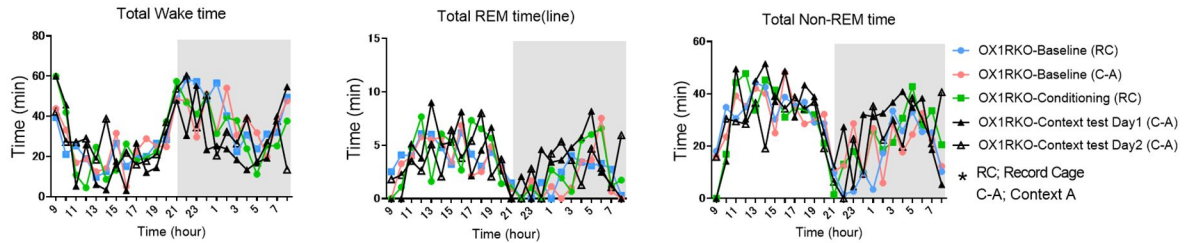


図 2 1RKO マウスにおける恐怖応答および過覚醒の減弱

恐怖想起テスト一日目においてREM睡眠およびNon-REM睡眠時間の減弱が見られたが、OX1RKOマウスについては顕著な減少は観察されなかった（図2真ん中および右上下段）。また、恐怖想起テスト二日目においては恐怖記憶の消去により野生型およびOX1RKOマウスにおいて恐怖応答はほとんど観察されず、過度な覚醒時間の増加も見られなかった（図2、C-A、白三角）。活動期である暗記においては覚醒、Non-REM睡眠、REM睡眠時間に大きな差は観察されなかった。

上記の結果から、オレキシンは下流のドーパミンニューロンおよびセロトニンニューロンに発現するOX1Rを介して恐怖記憶の固定および恐怖応答の表出を制御している可能性が示唆された。申請者はこれまでにノルアドレナリンニューロンに発現するOX1Rがこれらの生理機能に関与することを示しており（Soya et al., 2013, 2017）、本研究結果を考慮するとオレキシンは下流のモノアミンニューロンに発現するOX1Rを介して覚醒の維持および恐怖応答の調節を行っていると推察される。また、睡眠解析の結果からOX1Rの欠損による恐怖応答の減弱は過度の覚醒を引き起こさないことが明らかになった。したがって、恐怖刺激による過度な覚醒および恐怖応答は興奮性であるOX1Rを介したモノアミンニューロンの活動増加に起因する可能性が示唆され、OX1R選択的な拮抗薬によってモノアミンニューロンを抑制することで、PTSD患者で見られるような過度な恐怖応答および覚醒を抑制できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Soya S, Sakurai T	4. 巻 11
2. 論文標題 Orexin as a modulator of fear-related behavior: Hypothalamic control of noradrenaline circuit.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.11.032.	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 征矢 晋吾、櫻井 武	4. 巻 12
2. 論文標題 睡眠覚醒とオレキシン	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 睡眠医療	6. 最初と最後の頁 419-422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 征矢 晋吾	4. 巻 18
2. 論文標題 睡眠覚醒のスイッチングに関わる神経機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 分子精神医学	6. 最初と最後の頁 209-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 征矢晋吾
2. 発表標題 オレキシンと恐怖；不安障害やPTSDの治療薬としてのOX1R拮抗薬の可能性
3. 学会等名 薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 征矢晋吾
2. 発表標題 恐怖記憶の形成および表出におけるオレキシンの役割
3. 学会等名 記憶研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 次世代脳
2. 発表標題 Voluntary wheel running requires orexin receptor 1 signaling to regulate monoaminergic neurons
3. 学会等名 次世代脳
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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