

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19390402

研究課題名 (和文)

麻酔覚醒反応におけるオレキシン産生神経の役割：各種遺伝子操作マウスを用いた解析

研究課題名 (英文) Roles of orexin-producing neurons in awakening from anesthesia: Analyses using various genetically-modified mice.

研究代表者

高橋 宏 (TAKAHASHI HIROSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：70236313

研究成果の概要 (和文)：GABAB1 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、その表現系を解析した。オレキシン神経特異的 GABAB1 cKO マウスではコントロールに比べオレキシン神経に対する GABA-A 受容体を介した IPSC が増加しており、膜抵抗が低下しているため、興奮性および抑制性入力 of シャントが起こっていた。そのために、オレキシン産生神経の制御が不安定になり、結果として睡眠・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。

研究成果の概要 (英文)：We analyze the in vivo and in vitro phenotype of mice lacking the *GABAB1* gene specifically in orexin neurons (*GABAB1^{flox/flox};orexin-Cre* mice), and demonstrate that GABA_B receptors on orexin neurons are essential in stabilizing and consolidating sleep/wake states. In *GABAB1^{flox/flox};orexin-Cre* brain slices, we show that the absence of GABA_B receptors decreases the sensitivity of orexin neurons to both excitatory and inhibitory inputs, due to an augmented GABA_A-mediated inhibition that increases the membrane conductance and shunts postsynaptic currents in these neurons. This increase in GABA_A-mediated inhibitory tone is apparently due to an OX1 orexin receptor-mediated activation of local GABAergic interneurons that project back onto orexin neurons. *GABAB1^{flox/flox};orexin-Cre* mice exhibit severe fragmentation of sleep/wake states during both the light and dark periods, without showing an abnormality in total sleep time or signs of cataplexy. Thus, GABA_B receptors on orexin neurons are crucial in the appropriate control of the orexinergic tone through sleep/wake states, thereby stabilizing the state switching mechanisms. We also made mice lacking the *5HT1a* gene specifically in orexin neurons, and are analyzing their phenotypes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：麻酔学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：オレキシン、GABA、睡眠、覚醒、セロトニン

1. 研究開始当初の背景

オレキシンは、摂食および睡眠・覚醒の制御に非常に重要な働きをもつことが知られている。われわれは、オレキシン産生神経に作用する脳内物質を電気生理的に同定するとともに、オレキシン神経の入力系を解剖学的に検討してきた結果、睡眠中枢と考えられている視索上核や、視床下部外側野の介在神経からの顕著な GABA 入力を受けることが明らかとなった。また、オレキシン神経は GABA によって強力に抑制されることが明らかになった。この機能は、睡眠の維持にかかわることが予想される。

2. 研究の目的

オレキシン産生神経の制御系における GABA の重要性、特に GABAB 受容体の機能を明らかにする。さらに、この入力を遺伝子操作によって欠損させたときのオレキシン神経への影響を *in vivo*, *in vitro* で明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトオレキシンプロモーターを用い、Cre リコンビナーゼをオレキシン神経特異的に発現する Tg マウスを作製した (図 1)。このマウスを GABAB1 flox マウスと掛け合わせて得られる GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスの脳波筋電図解析を行い、睡眠制御機構に関する解析を行った。さらに、このマウスにオレキシン神経特異的 GFP 発現マウスを掛け合わせ交配して得られるマウスの脳スライスを用い、オレキシン神経の電気生理学的解析を行った。

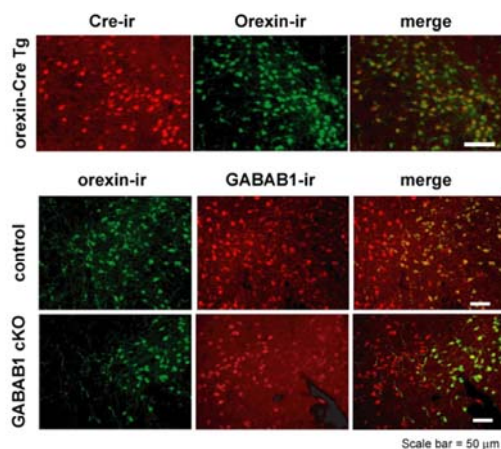


図 1 GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスに

おける Cre の発現。オレキシン神経特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスの視床下部外側野における Cre とオレキシンの二重免疫組織化学 (上段) および GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスのオレキシン神経における GABAB1 の免疫染色 (下段; オレキシンとの蛍光二重染色)

4. 研究成果

パッチクランプ法を用いた解析により、オレキシン神経は GABA_A、GABAB 受容体両方のアゴニストにより、活動電位の減弱を伴う過分極反応 (抑制作用) を示すことが明らかになった。特に GABAB 受容体を介した入力は、GIRK チャンネル活性化により起こることを明らかにした。次に、オレキシン神経特異的 GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスの睡眠調節機構を検討したところ、コントロールに比べ睡眠ステージの非常に顕著な分断化が起こっていることが観察された (図 2)

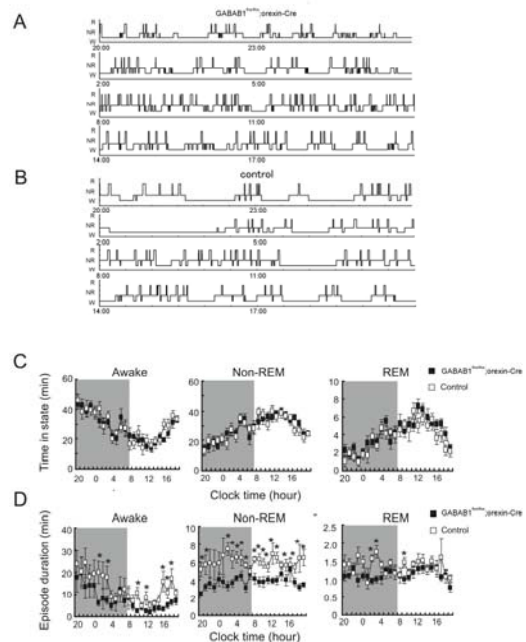


図 2 GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスの睡眠異常 A. GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスの 24 時間ヒプノグラムの典型例。B. コントロールマウス (C57B1/6) のヒプノグラム。C. 1 時間ごとの覚醒 (Awake)、ノンレム睡眠 (Non-REM) およびレム睡眠 (REM) の量を GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウス (N=10)

とコントロールマウス(N=11)についてプロットした。D.1 時間ごとの覚醒 (Awake)、ノンレム睡眠 (Non-REM) およびレム睡眠 (REM) の持続時間を GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスとコントロールマウスについてプロットした。

また、このマウスの脳スライスを用いた電気生理学的解析から、オレキシン神経に対する GABAA 受容体を介した入力系が亢進していることを見いだした。さらに、コントロールでは、オレキシン投与によりオレキシン神経への自発的抑制性入力が増進すること、逆に、GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスでは、オレキシン受容体アンタゴニストによりコントロールと同程度まで抑制性入力が増加することから、オレキシンは GABA 作動性の介在神経を活性化することにより、オレキシンニューロン自体を抑制しており、GABAB1flox/flox;orexin-Cre マウスではこの系路の機能が亢進することにより代償的にオレキシンニューロンの活性を抑制していることが明らかになった。そのために、オレキシン神経特異的 GABAB1 cKO マウスではコントロールに比べオレキシン神経に対する GABAA 受容体を介した IPSC が増加しており、膜抵抗が低下しているため、興奮性および抑制性入力のシャントが起こっていた。そのために、オレキシン産生神経の制御が不安定になり、結果として睡眠・覚醒状態の顕著な分断化が起こっていた。

オレキシン産生ニューロンのみで GABAB 受容体が欠損した場合にも、上記のような生理的にも重要な睡眠調節の異常が現れることを初めて明らかにした。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、一つの重要な受容体が欠損した場合、オレキシン産生ニューロンの活動性は、代償性メカニズムによって野生型と同程度になるが、そのために、種々の機能的異常が引き起こされていた。

GABA は主要な神経抑制物質であるが、そのシグナル入力のうち、GABAB 受容体を介する入力は、オレキシン神経活動をシナプス前、シナプス後で調節しており、この調節は睡眠および覚醒の安定化に重要な働きをしていると考えられる。

現在、引き続き、5HT1A 受容体遺伝子に関して、オレキシン産生神経特異的にノックアウトしたマウスを作製したので、表現系を解析中である。

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 29 件)

1. Uchio, N, Doi, M, Matsuo, M, Yamazaki, F, Mizoro, Y, Hondo, M, Sakurai, T & Okamura, H. Circadian characteristics of mice depleted with GPR7. *Biomed Res.* **30**, 357-364, 2009. 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., Nomiyama, M, Takahira, H., Hirashima, N., Kilduff, T.S., Kunita, S., Takahashi, S., Yagami, K., Bettler, B., Yanagisawa, M., Sakurai, T. Selective loss of GABA_B 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, J.P., Hara, J., Crowder, T.L., 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

[学会発表] (計 19 件)

1. Sakurai, T. Genetic variation of NPBWR1 alters amygdala function. Neuroendocrine Function of GPCRs (GPCR2010). Official Satellite Symposium of the 14th International Congress on Endocrinology, Kyoto, March 30-31, 2010.
2. Sakurai, T. Roles of orexins in regulation of energy homeostasis. Symposium of the 14th 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」 2009年12月8日、札幌
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 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptide, Yakushima, Kagoshima, Oct 02-03, 2009.
8. Sakurai, T. A decade of research on orexin. The 36th 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 3rd 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 (22nd APSS annual meeting), Baltimore, MD, USA, June 7-12, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宏 (TAKAHASHI HIROSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：70236313

(2) 研究分担者

桜井 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