

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07284

研究課題名(和文) 背側縫線核セロトニンニューロンの発火パターンに対する覚醒物質オレキシンの作用

研究課題名(英文) Effect of orexin on the firing pattern of serotonergic dorsal raphe neurons.

研究代表者

石橋 賢 (Ishibashi, Masaru)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：90832189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、オレキシンの背側縫線核セロトニン作動性ニューロンの活動に及ぼす影響を検討した。オレキシンは、セロトニン作動性ニューロンを脱分極させると共に発火後過分極を増強して発火頻度順応を大きくする。このオレキシンによる発火後過分極増強のうちカルシウム感受性カリウムチャンネルに依存しない遅い成分が、オレキシンにより活性化された非選択的陽イオンチャンネルが発火活動に伴い細胞内へ流入したカルシウムにより一過性に抑制されたために生じる過分極であることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、オレキシンによる脱分極だけでなく発火後過分極の増強による発火頻度順応の変化、膜ノイズによるシナプス入力に対する感受性調節など入出力信号の処理にいかに関与するか？という機能面に注目し総合的に検討する研究である。また、予備実験から得られたオレキシンの作用に対するカルシウム濃度依存性を示す結果は、本研究がオレキシンの作用機序のより詳細な解明という学術的問いに対する結果をもたらすことに留まらず、睡眠/覚醒調節に関連した病態機序を説明できることから、将来的には睡眠障害などの治療薬開発に向けた創薬につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study examined the effects of orexin on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. Orexin depolarizes serotonergic neurons and enhances the action potential afterhyperpolarization (AHP) to enhance firing frequency adaptation. Results suggest that the late part of this AHP is novel and due to transient inhibition of the orexin-activated nonselective cation channel by action potential-induced calcium influx into the cell.

研究分野：神経生理学

キーワード：オレキシン 発火後過分極 非選択的陽イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

正常な睡眠/覚醒調節は、心身の健康に非常に重要である。しかし、正常な睡眠/覚醒調節を司る脳内機序を始めとして、居眠り病であるナルコレプシー、睡眠の経過中に心身機能の異常を示す睡眠時随伴症、不眠症などの病理の根本的な機序は、十分に理解されているとは言えない。

オレキシンが発見されて以来[Sakurai ら Cell, 1998]、オレキシン信号伝達系の欠損が情動性脱力発作であるカタプレキシーを伴うナルコレプシーを発症することから睡眠/覚醒調節の分野で様々な研究が行われてきた。オレキシン1型受容体 (OX1R)とオレキシン2型受容体 (OX2R)欠損マウスにおいて背側縫線核(DR)のニューロンにOX2Rを再発現することによりカタプレキシー発作を軽減すること[Hasegawa ら J Clin Invest, 2014]、扁桃体へのセロトニン作動性(5-HT)入力を活性化することでカタプレキシーを抑制することから[Hasegawa ら Proc Natl Acad Sci U S A, 2014]、DR 5-HT ニューロンへのオレキシン入力に睡眠/覚醒調節において極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

一方で、これまで DR 5-HT ニューロンを対象としたオレキシンの作用を検討した研究では、その作用が発火頻度を増加(脱分極)させるのか、減少(過分極)させるか、その細胞内信号伝達系の同定、膜電位変化を引き起こす分子の同定などに重きを置かれていたため[Brown ら J Neurosci, 2002; Liu ら J Neurosci, 2002; Kohlmeier ら J Neurophysiol, 2008]、その重要性にもかかわらずオレキシンの標的的部位に対する発火様式への影響すなわち出力調整への作用の理解は未だ限られていた。このためオレキシン信号伝達系の障害がどのように脳回路機能を変化させるのかは、いまだ明らかではない。

この問題に取り組む第一歩として我々は、オレキシンの作用が単に細胞に興奮性内向き電流を発生させるだけではなく、同時に抑制性的作用である発火後過分極 (AHP)を増強 (oeAHP と命名)することで、急激に変化する入力への発火応答性を損なうことなく、定常状態ではその脱分極の大きさのみから予想される発火頻度よりも低い頻度で、かつ、ばらつきの少ない安定した頻度での発火活動を引き起こすということを DR 5-HT ニューロンにて証明した[図 1、Ishibashi ら J Neurosci, 2016]。従って、オレキシンは単にニューロンを興奮や抑制させるというのではなく、AHP や膜ノイズなど膜特性の複数要因を同時に変化させることで、様々な行動状態に応じた発火パターンを DR 5-HT ニューロンに起こしていることが予想される。

しかしながら、oeAHP のおよそ半分がアパミン感受性のカルシウム感受性カリウムチャネル (SK)の活性化によるものであると同定したものの[Ishibashi ら J Neurosci, 2016]、oeAHP に未同定の成分が残っていること、オレキシンの作用発現に必須となる分子の同定、オレキシンが引き起こす膜ノイズがシナプス入力の統合に果たす役割など完全には解明されておらず不明な部分が残っている。

2. 研究の目的

本研究は、DR セロトニン作動性(5-HT)ニューロンに対するオレキシンの作用機序解明を目的としているが、特にオレキシンが5-HT ニューロンに引き起こす作用の一つであるオレキシン誘発性発火後過分極増強(oeAHP)のうち、未同定であったアパミン非感受性成分(ai-oeAHP)の発現機序ならびに5-HT ニューロンの発火特性に及ぼす影響の解明を目的としている。

3. 研究の方法

DR 5-HT ニューロンを含む脳スライス標本を用いホールセルパッチクランプ法による計測を行

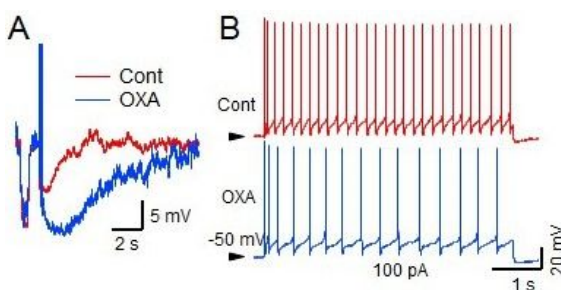


図 1. oeAHP、オレキシンは発火後過分極(A)と発火頻度順応(B)を増強する。

なった。

(1)薬理的アプローチによる ai-oeAHP 発現機序の同定

これまでの研究によってオレキシンの作用が細胞内外のカルシウム濃度に強い依存性を示し、カルシウムイオンの濃度上昇がオレキシンの作用を減弱させることを示唆するデータが得られている。さらに、一般的な AHP の発生機序として K⁺チャンネルの開口が考えられるが、これまでの研究により Apamin 感受性のカルシウム感受性 K⁺チャンネル(SK)以外の K⁺チャンネルの関与を検討するため細胞内 K⁺を Cs⁺へ置換し、ほとんどの K⁺チャンネルを阻害した条件下でオレキシンの作用を検討したところ、oeAHP の SK 部分は阻害されるのに対して ai-oeAHP は阻害されないという結果が得られている。従って、K⁺チャンネル以外による ai-oeAHP の発現が考えられるため、膜輸送体である Na⁺/K⁺-ATPase や Na⁺/Ca²⁺交換体の阻害薬(ouabain、KB-R7943)、オレキシンの作用分子と推定される非選択的陽イオンチャンネル(NSCC)の選択的阻害薬(flufenamic acid)や細胞外 Na⁺の置換などが ai-oeAHP へ及ぼす影響を検討する。

(2)電気生理学的膜特性の計測による ai-oeAHP の発現機序同定

オレキシン誘発性の作用に想定しているイオンチャンネル以外のイオンチャンネルが関与しているかを検討するため瞬間的な矩形波を連続で加えることにより ai-oeAHP 発生中のコンダクタンス変化を計測する。ダイナミッククランプ法によりオレキシンが誘発する膜ノイズ成分を細胞へフィードバックすることによって、オレキシンの作用のうちオレキシン誘発膜ノイズ成分が DR 5-HT ニューロンの発火活動パターンに及ぼす影響について検討する。

4 . 研究成果

(1) 薬理的アプローチによる ai-oeAHP 発現機序の同定

オレキシンの作用に対する灌流投与された薬物の影響を計測した。Na⁺/K⁺-ATPase の阻害薬である Ouabain や、Na⁺/K⁺交換体の阻害薬である KB-R7943 ではオレキシンの作用に有意な阻害作用がなかった。一方で、細胞外ナトリウムの除去(NMDG への置換)によってオレキシン誘発性内向き電流が抑制されたのに対して、oeAHP は ai-oeAHP に相当する遅い成分のみが抑制され SK 成分の増強に相当する速い成分は抑制されなかった(図 2A)。さらに、非選択的陽イオンチャンネルの阻害薬である Flufenamic acid(FFA)の投与により、低濃度の FFA(1 μM)ではオレキシンの作用が抑制されなかったのに対して、高濃度の FFA(100 μM)によってオレキシンの作用が抑制された(図 2A)。これらの実験結果から、オレキシンの作用発現にはナトリウムイオン透過性をもつ非選択的陽イオンチャンネルの関与が考えられる。

一方で、オレキシン誘発性内向き電流と ai-oeAHP の振幅を比較したところ、およそ傾き 0.5 で正の相関が見られることから(r=0.656, P=0.0012)、オレキシン誘発性内向き電流と ai-oeAHP 共に同じ細胞内信号伝達系を介して発現していると考えられる(図 2B)。

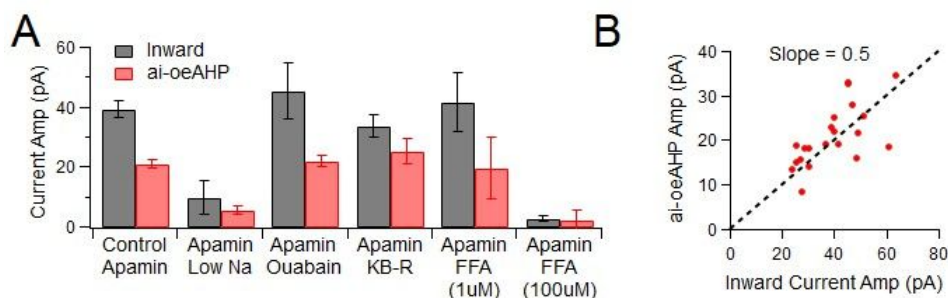


図 2.(A)オレキシンの作用に対する阻害薬の影響。(B) オレキシン誘発性内向き電流と ai-oeAHP の振幅には正の相関がみられる。

(2) 電気生理学的膜特性の計測による ai-oeAHP の発現機序同定

ai-oeAHP 発現に関与するイオンチャンネルを検討するため、短矩形波刺激(-10mV、20ms、20Hz)による ai-oeAHP 中の膜抵抗を計測した。カルシウム感受性カリウムチャンネルの阻害薬である Apamin の存在下において ai-oeAHP 中に膜抵抗が一過性に増加していることを示す結果が得られた。この一過性の膜抵抗増加の振幅は、オレキシンが誘発する内向き電流の元となる膜抵抗減少

の振幅のおよそ半分であった。この比は、オレキシンが誘発する内向き電流振幅と ai-oeAHP 振幅の比と一致していた。

オレキシンが誘発する作用は、脱分極を引き起こすオレキシン誘発性内向き電流と oeAHP に大別できる。このうちオレキシン誘発性内向き電流は、チャンネル開閉ノイズである振幅が大きなノイズ成分を伴う。このノイズ成分を解析したところ、ai-oeAHP 中にノイズ振幅がおよそ半分に抑制されていた。また、ダイナミッククランプ法を使用しノイズ膜電流を誘発するノイズコンダクタンスである仮想オレキシンコンダクタンスを DR 5-HT ニューロンに印加した。結果を記録したニューロン間で比較するためインピーダンス(Z^2)を算出し直流成分(DC)により標準化したところ、細胞外カルシウム存在下でシータ帯域を最大とする膜共鳴現象が 8nS, 12nS の仮想オレキシンコンダクタンス印加で認められた。さらにこの膜共鳴現象が細胞外カルシウム除去(コバルトへの置換)により大きく減弱することから、電位依存性カルシウムチャンネルの活動が膜共鳴現象の発現に関与していると考えられる[Ishibashi ら月刊細胞、2020]。このことから DR 5-HT ニューロンにおいてオレキシンが引き起こすノイズ膜電流の作用によりシータ帯域でのシナプス入力に対する出力電位応答が増強され、シナプス入力感受性が増加していると考えられる。

これらの結果から ai-oeAHP は、オレキシンにより活性化された非選択的陽イオンチャンネルが発火活動に伴い細胞内へ流入したカルシウムにより一過性に抑制されたために生じる過分極と考えられる。従って、ai-oeAHP は、イオンチャンネル閉口によって生じる今までに報告されたことがない新しい種類の発火後過分極と考えられる。

今後は、ai-oeAHP が DR 5-HT ニューロンの発火様式ならびにシナプス入力感受性に及ぼす影響を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bando Yuki, Ishibashi Masaru, Yamagishi Satoru, Fukuda Atsuo, Sato Kohji	4. 巻 16
2. 論文標題 Orchestration of Ion Channels and Transporters in Neocortical Development and Neurological Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.827284	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 Cisse Youssouf, Ishibashi Masaru, Jost Josefa, Toossi Hanieh, Mainville Lynda, Adamantidis Antoine, Leonard Christopher S., Jones Barbara E.	4. 巻 40
2. 論文標題 Discharge and Role of GABA Pontomesencephalic Neurons in Cortical Activity and Sleep-Wake States Examined by Optogenetics and Juxtacellular Recordings in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5970-5989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2875-19.2020	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 該当する
1. 著者名 石橋賢, 福田敦夫, Leoanrd S. Christopher	4. 巻 52
2. 論文標題 背側縫線核ニューロンに対する覚醒ペプチドオレキシンのダイナミッククランプ研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 50-53
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 該当する
1. 著者名 Masaru Ishibashi, Kiyoshi Egawa, Atsuo Fukuda	4. 巻 20(12)
2. 論文標題 Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20122964	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石橋賢, 福田敦夫, Leonard S Christopher
2. 発表標題 オレキシンは縫線核セロトニン作動性ニューロンにおいて非選択的陽イオンチャネルの閉口による発火後過分極を誘発する
3. 学会等名 第68回 中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 賢, 福田敦夫, Christopher S. Leonard
2. 発表標題 オレキシンは縫線核セロトニン作動性ニューロンにおいて新しい機序の発火後過分極を誘発する
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋 賢, 阪東勇輝, 佐藤康二, 福田敦夫
2. 発表標題 発達期皮質錐体細胞におけるCa ²⁺ 動態とタウリンによるGABAA受容体活性化
3. 学会等名 第67回中部生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 賢、福田敦夫 Christopher S. Leonard
2. 発表標題 背側縫線核セロトニン作動性ニューロンにおけるオレキシン誘発性発火後過分極がシナプス入力感受性に及ぼす影響
3. 学会等名 第47回日本脳科学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Berry E.A., Javed S., McGregor R., Ishibashi M., Siegel JM. And Leonard CS.
2. 発表標題 Chronic morphine exposure induces cell type specific changes in the intrinsic electrophysiological properties of mouse hypocretin/orexin (H/O) neurons.
3. 学会等名 fN Global Connectome: A Virtual Event (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 賢, 阪東勇輝, 佐藤康二, 福田敦夫
2. 発表標題 発達期皮質錐体細胞におけるCa ²⁺ 動態とタウリンによるGABA _A 受容体活性化
3. 学会等名 第7回国際タウリン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 賢、福田敦夫、Christopher S. Leonard
2. 発表標題 Effect of orexin on the firing pattern of serotonergic dorsal raphe neurons.
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋 賢、福田敦夫、Christopher S. Leonard
2. 発表標題 背側縫線核セロトニン作動性ニューロンにおけるオレキシン誘発性発火後過分極と内向き電流に対する細胞内外カルシウム濃度の影響.
3. 学会等名 第66回日本中部生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi M., Berry E.A., Molina N.E., Sato T., Fukuda A., Leonard C.S.
2. 発表標題 Impact of a novel slow afterhyperpolarization (sAHP) on spike encoding by serotonergic (5-HT) dorsal raphe (DR) neurons.
3. 学会等名 48th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋 賢、福田敦夫、Christopher S. Leonard
2. 発表標題 背側縫線核セロトニン作動性ニューロンにおけるオレキシン誘発性発火後過分極と内向き電流に対する細胞内外カルシウム濃度の影響 .
3. 学会等名 第46回日本脳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋 賢, 阪東勇輝, 佐藤康二, 福田敦夫
2. 発表標題 発達期皮質錐体細胞におけるCa ²⁺ 動態とタウリンによるGABA受容体活性化 .
3. 学会等名 オンコロジ-2019 年度第 2 回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋 賢, 阪東勇輝, 佐藤康二, 福田敦夫
2. 発表標題 発達期皮質錐体細胞におけるCa ²⁺ 動態とタウリンによるGABA _A 受容体活性化 .
3. 学会等名 2019年度 自然科学研究機構分野融合型共同研究事業 ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋 賢、福田敦夫、Christopher S. Leonard
2. 発表標題 オレキシンは縫線核セロトニン作動性ニューロンにおいて陽イオンチャネルの閉口による全く新しい機序の発火後過分極を誘発する.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2019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

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		
米国	New York Medical College		