

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300142

研究課題名(和文) オプトジェネティクスを用いた覚醒と依存形成に関わる神経機構の解明

研究課題名(英文) Study for neural mechanism of wakefulness and dependence using optogenetics

研究代表者

山中 章弘 (Yamanaka, Akihiro)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：60323292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部のオレキシン産生神経細胞は、睡眠覚醒調節において覚醒維持に重要な役割を担っている。オレキシン神経細胞の特異的な脱落によって、睡眠障害のひとつであるナルコレプシーを発症することが知られている。ナルコレプシーの治療には、依存を生じやすい薬物が用いられるが、ナルコレプシー患者が薬物依存になることはほとんどない。このことはオレキシン神経細胞が依存形成において重要な役割を担っている事を示唆している。本研究では、光遺伝学を用いてオレキシン神経活動を操作し、依存形成における役割について明らかにした。新たなオレキシン神経脱落マウスを用いて、睡眠覚醒調節と依存形成における役割について検討した。

研究成果の概要(英文)：Orexin producing neurons are distributed in the hypothalamus. These neurons are involved in the maintenance of wakefulness. Specific loss of orexin neurons is caused by sleep disorder, Narcolepsy. Although drugs which easily form dependence are used for treatment of Narcolepsy, it is very rare to form dependence in Narcoleptic patients. These facts suggest that orexin neurons are involved in the dependence as well. In this study, we studied the role of orexin neurons in formation of dependence using optogenetics. Additionally, we evaluated the role of orexin neurons on the regulation of sleep/wakefulness and dependence.

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：神経筋肉生理学

キーワード：覚醒 依存 遺伝子改変マウス 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

ナルコレプシーは、覚醒が維持できず、いかなる状況においても眠りに落ちてしまう睡眠障害である。これらのことから「ナルコレプシーはオレキシン神経の脱落が原因」であり、オレキシン神経系が睡眠覚醒調節において重要な役割を担っていることが分かってきた。一方、これらの研究とは全く独立して、オレキシン神経が依存形成にも重要であることが報告された。コカインやモルヒネに条件付けされたラットの脳では、オレキシン神経に神経活動の上昇を示す c-Fos タンパク質の発現が認められ、また、オレキシン受容体拮抗薬存在下では、それら薬物に対する条件付けが全く形成されなかった。これらのことは、オレキシン神経の活動が条件付けに必須であることを示唆していた。

2. 研究の目的

我々は人生の 1/3 もの時間を睡眠に費やすにもかかわらず、睡眠覚醒がどのように調節されているのか未だによく分かっていない。また、アルコールやたばこなどの嗜好品や薬物などに精神依存が形成されるメカニズムも未だに十分解明されていない。これら一見全く独立した二つの生理現象が視床下部に存在するオレキシンを産生する神経（オレキシン神経）によって調節されていることが明らかになりつつある。本研究では、神経活動の光制御を可能にする分子をオレキシン神経特異的に発現させ、その神経活動を人為的に操作することによって、個体レベルにおいて睡眠覚醒調節および、依存形成のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

睡眠覚醒や依存形成に重要な役割を担っている視床下部のオレキシン神経特異的に光活性化タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成し、組織化学的解析および、電気生理学的解析によって、オレキシン神経特異的な発現と光活性化タンパク質の機能を確認する。確認後に個体を用いた行動実験を行う。睡眠覚醒調節機構の解明と依存形成機構の解明を並行して行いつつも、それぞれの結果を有機的に連結し、オレキシン神経系が睡眠覚醒と依存形成の両方を調節する仕組みを解明する。

4. 研究成果

オレキシン神経細胞特異的に細胞死を誘導する遺伝子改変マウスの作成に成功した。tTA/TetO 遺伝子発現制御システムを用いて、オレキシン神経細胞にジフテリア毒素 A 断片を発現させて細胞死を誘導させた。オレキシン神経細胞だけを任意の時期に脱落させることに成功した。約 85% のオレキシン神経

細胞の脱落によって、睡眠覚醒の分断化が認められ、95% の脱落によって脱力発作が認められた。GHB(ハイドロキシブチレート)がナルコレプシーの治療に用いられていることから、GABAB 受容体アゴニストであるバクロフェンを用いてこれらのマウスの症状を改善できるかどうか確認した。バクロフェンの作用は GHB よりも強く、ナルコレプシーの治療に有用であることが明らかとなった。

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 11 件)

1. Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, Tanaka KF, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, Yamanaka A: Optogenetic manipulation of activity and temporally-controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. J Neurosci (2014 in press)
2. Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, Tominaga M, Maruyama M, Takagi K, Minokoshi Y, Sakurai T, Kilduff TS, Yamanaka A: Conditional ablation of orexin/hypocretin neurons: A new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function. J Neurosci (2014 in press)
3. Black SW, Morairty SR, Chen TM, Leung AK, Wisor JP, Yamanaka A, Kilduff TS: GABAB agonism promotes sleep and reduces cataplexy in murine narcolepsy. J Neurosci (2014 in press)
4. Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, Yamanaka A, Yoshioka M: Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behavior in mice. Int J Neuropsychopharmacology (2014 in press)
5. Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M: Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. FASEB J (2014 in press)
6. Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K: Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. Neuron 81(2): 314-20 (2014)
7. John J, Thannickal TC, McGregor R, Ramanathan L, Ohtsu H, Nishino S, Sakai N, Yamanaka A, Stone C, Cornford M, Siegel JM: Greatly

increased numbers of histamine cells in human narcolepsy with cataplexy. *Ann Neurol* 74(6): 786-93 (2013)

8. Tsujino N, Tsunematsu T, Uchigashima M, Konno K, Yamanaka A, Kobayashi K, Watanabe M, Koyama Y, Sakurai T: Chronic alterations in monoaminergic cells in the locus coeruleus in orexin neuron-ablated narcoleptic mice. *PLoS ONE* 8(7): e70012 (2013)
 9. Tsunematsu T, Tabuchi S, Tanaka KF, Boyden Edward S, Tominaga M, Yamanaka A: Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res* 255: 64-74 (2013)
 10. Tabuchi S, Tsunematsu T, Kilduff Thomas S, Sugio S, Xu M, Tanaka KF, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A: Influence of inhibitory serotonergic inputs to orexin/hypocretin neurons on the diurnal rhythm of sleep and wakefulness. *Sleep* 36 (9): 1391-404 (2013)
 11. Taguchi T, Yasui M, Kubo A, Abe M, Kiyama H, Yamanaka A, Mizumura K: Nociception originating from the crural fascia in rats. *Pain* 154(7): 1103-14 (2013)
- [学会発表](計 15 件)
1. 山中章弘: 神経活動操作を用いた睡眠覚醒調節に関わる神経回路の動作原理. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014.3. (仙台)
 2. 山中章弘: 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた神経活動操作と行動制御. 第 91 回日本生理学会大会, 2014.3. (鹿児島)
 3. 山中章弘: 光遺伝学を用いた視床下部神経活動の操作による睡眠覚醒の制御. International Workshop on Animal Instinctive and Intelligent Behaviors, 2014.2. (札幌)
 4. 山中章弘, 常松友美, 田淵紗和子, 犬束歩: The physiological role of orexin/hypocretin neurons on sleep/wakefulness regulation. 2014 Meeting of the Australasian Neuroscience Society, 2014.1. (Adelaide, Australia)
 5. 山中章弘: オプトジェネティクスを用いた神経活動操作による本能行動制御メカニズムの解明. 第 16 回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム, 2013.12. (名古屋)
 6. 山中章弘: ノンレム睡眠とレム睡眠の調節メカニズム. 第 20 回日本時間生物学学会学術大会, 2013.11. (東大阪)
 7. 山中章弘, 田淵紗和子, 常松友美: New

model mice for narcolepsy. International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, 2013.10. (Seoul, Korea)

8. 山中章弘: 睡眠 - 覚醒を調節する神経回路. 創薬薬理フォーラム第 21 回シンポジウム, 2013.9. (東京)
9. 山中章弘, 常松友美: Optogenetical approach to reveal the regulatory mechanism of instinctive behaviors by the hypothalamic neurons. IUPS 2013, 2013.7. (Birmingham, UK)
10. 山中章弘, 田淵紗和子, 常松友美: 睡眠覚醒調節における視床下部オレキシン神経の役割 ~ 加齢に伴う睡眠覚醒調節障害との関係 ~. 第 13 回日本抗加齢医学会総会, 2013.6. (横浜)
11. 山中章弘: オレキシンの基礎研究の手法と成果. 日本睡眠学会第 17 回睡眠科学研究講座, 2013.6. (秋田)
12. 山中章弘, 田口紗和子, 常松友美: オレキシン神経の時期特異的除去を用いた新規ナルコレプシーモデルマウス. 日本睡眠学会第 38 回定期学術集会, 2013.6. (秋田)
13. 山中章弘: New model mice for narcolepsy revealed the mechanism of symptoms. 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013.6. (京都)
14. 山中章弘: 光遺伝学はじめの一歩. *Neuro* 2013, 2013.6. (京都)
15. 山中章弘, 常松友美: オプトジェネティクスを用いた本能行動調節機構の解明. *Neuro* 2013, 2013.6. (京都)

[図書](計 3 件)

1. 山中章弘: オプトジェネティクス-光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線-, 株式会社エヌ・ティー・エス, P171-176, P216-226 (2013)
2. 山中章弘: アンチ・エイジング医学 9(2), メディカルレビュー社, P41-46 (2013)
3. 山中章弘: 細胞工学 Vol.33 オプトジェネティクスを用いた神経機能操作の現在地-光で行動をコントロールする, 学研メディカル秀潤社, P238-242, P264-269 (2014)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムにおける発現量を増幅させる遺伝子座とノックインによる増幅の効果

発明者: 山中章弘, 田中謙二

権利者: 山中章弘, 田中謙二

種類:

番号: 特願 2011-193680

出願年月日：平成 26 年 3 月 25 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山中章弘（名古屋大学環境医学研究所・教授）

研究者番号：60323292

(2)研究分担者

田中謙二（慶應義塾大学・特任准教授）

研究者番号：30329700

(3)連携研究者

()

研究者番号：