

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659134

研究課題名(和文) AAVベクターと人工GPCRを用いたナルコレプシーの遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel gene therapy on narcolepsy using AAV vectors and artificial GPCRs

研究代表者

三枝 理博 (Mieda, Michihiro)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：20296552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ナルコレプシーは強い眠気と情動性脱力発作(カタプレキシー)を主症状とする睡眠障害であり、その病態にオレキシン産生ニューロン(オレキシンニューロン)の変性・脱落が関わる。しかし、オレキシンニューロンがナルコレプシーを抑制するメカニズムは不明であった。

本研究ではマウスにおいて、青斑核・ノルアドレナリンニューロンと背側縫線核・セロトニンニューロンがオレキシンニューロンの下流で働き、前者は強い眠気、後者はカタプレキシーを抑制することを明らかにした。また、これらのニューロンを人為的に活性化してナルコレプシーを抑制する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The loss of orexin neurons in humans is associated with narcolepsy, a sleep disorder characterized by excessive daytime sleepiness and cataplexy. However, the precise neural mechanisms downstream of orexin neurons remain unknown.

We found that the locus coeruleus noradrenergic and dorsal raphe serotonergic neurons play differential roles in the regulation of sleep/wakefulness by orexin neurons: the former stabilizes wakefulness episodes (reduce sleepiness) and the latter suppresses cataplexy in mice. In addition, we developed a system to suppress narcolepsy in mice by artificially activating these neurons using recombinant AAV vectors and an artificial GPCR called DREADD.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経 睡眠・覚醒 オレキシン ノルアドレナリン セロトニン ウィルスベクター DREADD マウス

1. 研究開始当初の背景

ナルコレプシーは強い眠気と情動脱力発作(カタプレキシー)を主症状とする睡眠障害であり、その病態にオレキシン産生ニューロン(オレキシンニューロン)の変性・脱落が関わっていることが確立していた。オレキシン投与により活性化されるニューロンは複数報告されていたが、個体の生理的な睡眠・覚醒サイクルにおいて、内因性オレキシンにより活性化され(オレキシンニューロンの直接の下流で機能し)、覚醒を安定化する神経回路は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) ナルコレプシーモデルマウスにおいて、オレキシンニューロンにより活性化されるとナルコレプシー様症状を抑制することのできる最小限の脳領域・ニューロンを同定することにより、オレキシンニューロンの下流で睡眠・覚醒調節に関わるニューロンを明らかにする(下流ニューロン)。

(2) 特定のケミカル・アイデンティティをもったニューロン(ニューロンタイプ)に特異的な遺伝子導入ができる AAV ベクターを開発する。これを用いて、(1)で同定した最小限の下流ニューロンに人工 GPCR を遺伝子導入し、人工 GPCR に特異的な人工リガンドを投与することで当該ニューロンを活性化し、ナルコレプシー様症状を抑制できることを示す。開発した AAV ベクターは、霊長類を始めマウス以外の哺乳類にも適用可能な細胞特異的遺伝子導入ツールを提供する。さらに、人工 GPCR-人工リガンドの組み合わせを用いた新たなコンセプトに基づく、ナルコレプシーのみならず他の疾患へも適用可能な遺伝子治療法を提案する。

3. 研究の方法

(1) オレキシン受容体欠損マウス(OX1R;OX2R DKO)は、覚醒の分断化、カタプレキシー様発作など、ナルコレプシーの症状を示す。このマウスではオレキシンニューロンは正常なので、組換え AAV ベクターを微量インジェクションすることでオレキシン受容体の発現を局所的にレスキューし、脳のどの領域にオレキシン受容体の発現を回復すればナルコレプシー様症状が抑制されるかをマップする。標的領域としては、覚醒を亢進すると考えられており、またオレキシン受容体を強く発現する、視床下部・脳幹のモノアミン作動性ニューロン、コリン作動性ニューロンを選択した。

(2) DREADD (designer receptors exclusively activated by a designer drug)の一つ、hM3Dq(変異型 m3 ムスカリン受容体)は、生理的濃度の内在性リガンド・アセチルコリンでは活性化されず、合成化合物 clozapine-N-oxide (CNO)によって活性化さ

れる。オレキシンニューロン欠損マウスにおいて AAV ベクターを用いて下流ニューロンに hM3Dq を発現させ、CNO 腹腔内投与によって下流ニューロンを活性化することでナルコレプシー様症状を改善できるか検証する。オレキシンニューロン欠損マウスは生後オレキシンニューロンが変性・脱落するトランスジェニックマウスで、ヒトのナルコレプシーの病態をより正確に反映するマウスモデルである。

4. 研究成果

(1) オレキシン受容体欠損マウスにおいて、ヒスタミン作動性ニューロンを含む結節頭体核(TMN)、セロトニン作動性ニューロンを含む背側縫線核(DR)、ノルアドレナリン作動性ニューロンを含む青班核(LC)、コリン作動性ニューロンを含む脚橋被蓋核(PPT)、の計4つの神経核それぞれに、AAV ベクターを用いてオレキシン受容体発現を局所的にレスキューした。その結果、LCにレスキューすると覚醒の分断化(平均覚醒持続時間の減少、眠気の指標)が有意に改善されたが、カタプレキシーの頻度には影響が見られないのに対し、DRにレスキューするとカタプレキシーがほぼ消失するが、覚醒の分断化は改善しないことが明らかになった(図1)。

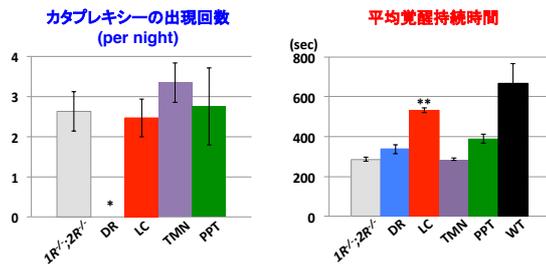


図1 モノアミン、コリン作動性神経核にオレキシン受容体を局所的にレスキューしたオレキシン受容体欠損マウスのナルコレプシー症状

(2) ノルアドレナリンニューロン選択的プロモーター、セロトニンニューロン選択的プロモーターの制御下でオレキシン受容体を発現する組換え AAV ベクターを開発した。これらのベクターを用いて、オレキシン受容体欠損マウスにおいて、LC ノルアドレナリンニューロン選択的、DR セロトニンニューロン選択的にオレキシン受容体発現をレスキューしたところ、前者では覚醒分断化が改善され、後者ではカタプレキシーがほぼ消失した。(1)(2)の結果より、生理的な睡眠・覚醒サイクルにおいて、LC ノルアドレナリンニューロン、DR セロトニンニューロンはオレキシンニューロンの直接の下流で機能し、前者は覚醒の維持に、後者はカタプレキシーの抑制に重要な役割を果たすことが明らかになった。今回の研究により、オレキシンによる睡眠・覚醒スイッチ制御の詳しいメカニズム

が明らかになった。この知見はナルコレプシーのみならず、不眠症などさまざまな睡眠障害の対処に応用できると期待される。

(3) ノルアドレナリンニューロン選択的プロモーター、セロトニンニューロン選択的プロモーターの制御下でhM3Dqを発現する組換えAAVベクターを開発した。これらのベクターを用いて、オレキシンニューロン欠損マウスにおいて、LCノルアドレナリンニューロン選択的、DRセロトニンニューロン選択的にhM3Dqを発現させた。CNO腹腔内投与によりhM3Dq発現ニューロンを興奮させると、LCノルアドレナリンニューロンでは覚醒分断化が改善されたが、カタプレキシーの頻度に変化は無かった。一方、DRセロトニンニューロンの活性化では、カタプレキシーの頻度が劇的に減少したが、覚醒分断化は改善しなかった(図2)。これらの結果は、(1)、(2)で得られた結果を支持する。

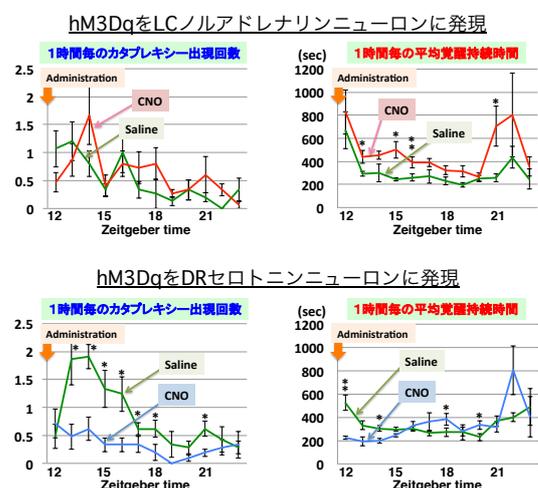


図2 hM3Dqを用いたLC、DRニューロンの人為的活性化によるナルコレプシー症状の抑制

また、DREADDによってナルコレプシー様症状を抑制できた結果は、次のような新たなコンセプトの遺伝子治療法にもつながると期待される。まず、有効性・安全性が保証された人工化合物-人工受容体のペアを開発しておく。その人工受容体の遺伝子をウイルスベクターを用いて必要最小限の神経細胞に導入する。その上で人工化合物を服用して当該神経細胞を適切なタイミングで活性化することで症状を抑える。この方法により、莫大な費用と時間のかかる創薬プロセスを経ず、より多くの疾患に治療方法を提供できる可能性がある。

(4) LCノルアドレナリンニューロン、DRセロトニンニューロンのさらに下流で睡眠・覚醒を調節する神経回路の同定を目指して、まずはAAVによりオレキシン受容体をレスキューされたこれらのニューロンがどの脳領域に投射するかを、オレキシン受容体

の代わりに軸索トレーサーChR2::EYFPを発現させて、マップした。その結果、両者とも脳の広範な範囲に投射が見られたが、特に睡眠・覚醒調節に関わる領域への投射が多かった。LCノルアドレナリンニューロンはTMNや睡眠中枢・視索前野腹外側部、対角帯核、DRセロトニンニューロンはPPTや黒質緻密部、扁桃体などである。特にDRセロトニンニューロンの扁桃体への投射は、カタプレキシーが強い情動によって誘発される事実と関係する可能性がある。

## 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13件)

①Hasegawa E, Yanagisawa M, Sakurai T, Mieda M. Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways. *J. Clin. Invest.* 124:604-616, 2014. 査読有 doi: 10.1172/JCI71017

②Mieda M, Sakurai T. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation of circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. *J. Neurosci.* 31:15391-15396, 2011. 査読有 doi: 10.1523/JNEUROSCI.2801-11.2011

③Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T. Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One* 6:e20360, 2011. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0020360

④Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T. Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J. Neurosci.* 31:6518-6526, 2011. 査読有 doi: 10.1523/JNEUROSCI.6506-10.2011

[学会発表] (計10件)

①Hasegawa, E., Yanagisawa, M., Sakurai T., and Mieda, M. Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways. Gordon Research Conferences, Sleep Regulation & Function, March 17, 2014, Galveston, USA.

②Hasegawa, E., Yanagisawa, M., Roth, B.L., Sakurai, T., and Mieda, M. Restoration of orexin signaling in the dorsal raphe and locus coeruleus differentially ameliorate symptoms of narcoleptic mice. The 5th World Congress on Sleep Medicine, September 28, 2013, Valencia, Spain.

③Mieda, M. Differential regulation of non-REM and REM sleep by orexinergic neurons. Neuroscience 2012, the 33th

annual meeting of the Society for Neuroscience, October 17, 2012, New Orleans, USA.

④Hasegawa, E., Yanagisawa, M., Sakurai, T., and Mieda, M. Search for neurons mediating functions of orexin as a wakefulness-stabilizer. 21st Congress of the European Sleep Research Society, September 7, 2012, Paris, France.

⑤Mieda, M., Hasegawa, E., Kisanuki, Y.Y., Sinton, C.M., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. Worldsleee2011 (World Federation of Sleep Research & Sleep Medicine Societies), October, 2011, Kyoto.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 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

北國、毎日、北陸中日新聞 (朝刊) 平成 26  
年 1 月 3, 5 日

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/university/administration/prstrategy/release/pdf/14/140103.pdf>

<http://physiology.jp/exec/page/stopics89/>

<http://www.jnss.org/140228-07/>

<http://news.mynavi.jp/news/2014/01/10/347/>

他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 理博 (MIEDA MICHITHIRO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：20296552

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

桜井 武 (SAKURAI TAKESHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60251055