

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700322

研究課題名(和文) 視索前野GABA作動性神経の遺伝薬理的および光操作による睡眠回路解析

研究課題名(英文) Research on the role of the POA GABAergic neuron in the sleep regulation.

研究代表者

上田 なつ子(辻野なつ子)(Kanda, Natsuko)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：40432166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：視索前野GABA作動性神経は睡眠調節に重要と考えられている。本研究は視索前野GABA作動性神経特異的にChannelrhodopsin2を発現させ、その投射先を示した。またDREADDシステムを用いて、視索前野GABA作動性神経特異的に神経活動を抑制または興奮させたときのマウスの睡眠を測定した。GABA作動性神経の興奮はNREM睡眠時間を延長し、抑制はREM睡眠の減少および明期のNREM睡眠の増加、さらに暗期の覚醒持続時間の減少を起こした。また、視索前野GABA作動性神経終末の興奮は、オレキシン作動性神経の発火頻度を減少させることが分かり、この抑制経路は睡眠調節経路の一つである可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：GABAergic neurons in the preoptic area (POA) is thought to have an important role in sleep regulation. We applied DREADD system to POA GABAergic neurons to modulate activities of the neurons. Activation of POA GABAergic neurons increased total NREM sleep time. Inhibition of the neurons reduced REM sleep time and increased NREM sleep time during light period and reduced episode durations of wakefulness during dark period. Axonal projections of POA GABAergic neurons were observed in hypothalamic area where orexin neurons localized using Channelrhodopsin2 (ChR2) as an anterograde tracer. Moreover, light stimulation of axonal terminals of POA GABAergic neuron which expressed ChR2 inhibited firings of orexin neurons in slice preparation. These results suggest that the functional connection between POA GABAergic neurons and orexin neurons might be an important pathway in sleep regulation.

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：sleep GABAergic neuron preoptic area orexin

1. 研究開始当初の背景

睡眠は高等生物にとって必須の生理活動であるが、睡眠調節機構の神経回路は十分に解明されていない。これまでの報告から、睡眠の駆動および維持には、視床下部の視索前野が重要であると考えられている。特に、視索前野 GABA 作動性神経 (GABA 神経) が重要であるとの見解がある。しかしながら、これまで、GABA 神経特異的に活動を調節することは困難であり、その詳細については不明であった。そこで本研究では、トランスジェニックマウスとアデノ随伴ウイルスを用いて、視索前野 GABA 神経特異的な操作を可能にした。さらに覚醒の維持に重要であると考えられている視床下部外側野のオレキシン産生神経 (オレキシン神経) が視索前野 GABA 神経から入力を受けているという解剖学的報告があることから、睡眠調節経路における視索前野 GABA 神経とオレキシン神経の機能的連関について検討した。

2. 研究の目的

睡眠に重要な視索前野 GABA 神経の活動を人為的に操作し、GABA 神経活動が睡眠およびオレキシン神経活動に与える影響を解析し、睡眠調節機構の一端を解明する。

3. 研究の方法

マウスの視索前野 GABA 神経特異的に、人工 G タンパク質共役型受容体の hM3Dq または hM4Di を発現させた。この受容体のアゴニストである Clozapin N-oxid (CNO) の腹腔投与により任意の時期に GABA 神経を活性化もしくは抑制し、睡眠覚醒状態がどのように変化するかを経時的に解析した。また、組織学的解析より GABA 神経の投射部位を明らかにした。さらに光刺激を行い、GABA 神経終末を興奮させたときの、オレキシン神経活動を電気生理学的に解析し、睡眠中枢が覚醒系に与える影響を調べることで、睡眠調節回路の一端を明らかにした。

平成 24 年度

GAD1 遺伝子領域に Cre リコンビナーゼを発現した遺伝子改変マウス (GAD1-cre マウス) を用いて、Cre 発現細胞でのみ hM3Dq を発現する double inverted floxed hM3Dq を持つアデノ随伴ウイルスを視索前野に投与した。この手法により視索前野 GABA 神経特異的に hM3Dq の発現が可能となる。hM3Dq は CNO の腹腔内投与で活性化され、神経興奮に寄与する。始めに、視索前野での hM3Dq の発現を免疫染色で確認し、また CNO による、GABA 神経の活性化を神経活動マーカー (c-fos) の染色により確認した。hM3Dq 発現の確認後、脳波筋電図用電極および、腹腔への CNO 投与用のカテーテル留置手術を行い、睡眠覚醒状態を記録した。CNO 投与により、GABA 神経を興奮させたときの 24 時間の睡眠パターンを生理食塩水投与時と比較した。CNO は任意の時期に投与でき、作用時間は 2-3 時間である。本実験では、マウスの活動期である暗期と休息期である明期の両方について検討した。睡眠時間、睡眠覚醒のパターン、潜時、脳波周波数の解析を行い、GABA 神経活性化が睡眠に与える影響を詳細に解析した。実験後、CNO 刺激が正確に行われていたかを、hM3Dq 発現と GABA 神経活動を免疫染色することにより確認した。さらに、視索前野 GABA 神経の活動がオレキシン神経活動に与える影響を解析するため、GABA 神経にチャンネルロドプシン 2 を発現させ、GABA 神経終末の光刺激を行ったときの、オレキシン神経の電気生理学的活動を in vitro で記録した。また in vivo において、神経活動のマーカーとオレキシンの二重免疫染色を行い、GABA 神経の活動がオレキシン神経活動に与える影響を解析した。

平成 25 年度

hM4Di 遺伝子を持つウイルスを作成し、hM3Dq と同様の手法で視索前野 GABA 神経特異的に発現させた。hM4Di の発現および

CNO 投与による GABA 神経抑制は 24 年度と同様に確認した。hM4Di は CNO により活性化され、神経活動を抑制するため、GABA 神経活動を人為的に抑制できる。GABA 神経活動を CNO 投与により抑制し、24 年度と同様に暗期と明期で睡眠覚醒が変化するか解析した。また、視索前野 GABA 神経の活動を抑制したときのオレキシン神経活動を同様に解析し、覚醒領域に与える影響も解析した。

4 . 研究成果

視索前野 GABA 神経特異的に hM3Dq または hM4Di 受容体を発現させ、両受容体のアゴニストである CNO の投与により視索前野 GABA 神経特異的に興奮もしくは抑制させた。hM3Dq および hM4Di の発現は、免疫組織学的に確認した。また CNO の投与後、神経活動が活性化もしくは抑制されているかどうかは、神経活動のマーカーである cfos の免疫染色で確認し、この実験系が機能していることを確認した。次にそれぞれの受容体を発現させ、CNO を投与したときの、マウスの睡眠時間を計測した。視索前野 GABA 神経特異的な活性化により、NREM 睡眠が有意に増加した。一方、同神経を特異的に抑制すると、REM 睡眠が有意に減少し、明期では NREM 睡眠が増加した。暗期においては、覚醒の持続時間がアゴニスト投与 3 時間後に有意に増加した。

次に GABA 神経特異的にチャンネルロドプシン 2 を発現させ、その神経投射を調べた。視索前野 GABA 神経は、睡眠覚醒に重要とされる脳幹のモノアミン神経起始核やオレキシン作動性神経（オレキシン神経）の存在する視床下部外側野に密に投射していることが明らかになった。

そこで、視索前野 GABA 神経の活性化がオレキシン神経活動に影響を与えているかを、電気生理学的に解析した。視索前野 GABA 神経特異的にチャンネルロドプシン 2 を発現させたマウスを用いて、オレキシン神経の存在部位

である視床下部外側野を含む脳スライス標本を作製した。オレキシン神経の近傍の視索前野 GABA 神経終末を光刺激により刺激し、オレキシン神経活動を記録した。オレキシン神経には tdTomato を発現させ、他の神経と区別した。GABA 神経終末の光刺激により、オレキシン神経の発火頻度は有意に減少した。以上から視索前野 GABA 神経によるオレキシン神経活動の抑制が睡眠調節に関与している可能性を示した。この成果は *Frontiers in Neural Circuits* に報告した。

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 7 件)

- (1) Saito YC, Tsujino N, Hasegawa E, Akashi K, Abe M, Mieda M, Sakimura K, Sakurai T. GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. *Front Neural Circuits*. 2013 Dec 2;7:192. 査読有 doi: 10.3389/fncir.2013.00192.
- (2) 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*. 2013 Jul 29;8(7):e70012. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0070012.
- (3) Mieda M, Tsujino N, Sakurai T. Differential roles of orexin receptors in the regulation of sleep/wakefulness. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 May 16;4:57. 査読有 doi: 10.3389/fendo.2013.00057
- (4) Furutani N, Hondo M, Kageyama H, Tsujino N, Mieda M, Yanagisawa M, Shioda S, Sakurai T. Neurotensin co-expressed in orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus plays an important role in regulation of sleep/wakefulness States. *PLoS One*. 2013 Apr 19;8(4):e62391. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0062391

- (5) Tsujino N, Sakurai T. Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. Front Behav Neurosci. 2013 Apr 18;7:28. 査読有 doi: 10.3389/fnbeh.2013.00028.
- (6) 辻野なつ子、桜井武 レプチン、オレキシン、グレリンの日内リズムとその生理的意義
日本臨床：2012年7月号特集
査読無
URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844792>
- (7) Watanabe N, Wada M, Irukayama-Tomobe Y, Ogata Y, Tsujino N, Suzuki M, Furutani N, Sakurai T, Yamamoto M.
A single nucleotide polymorphism of the neuropeptide B/W receptor-1 gene influences the evaluation of facial expressions. PLoS One. 2012;7(4):e35390. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0035390

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) 上田(辻野)なつ子、齊藤夕貴、阿部学、崎村建司、柳沢正史、桜井武
Functional connection between GABAergic neurons in the preoptic area and orexinergic neurons in the hypothalamus.
第51回日本生物物理学会年会 2013年10月28日~30日(国立京都国際会館 発表 10月29日ポスター)
- (2) 辻野なつ子、齊藤夕貴、本堂茉莉、阿部学、崎村建司、桜井武
A critical role of serotonergic inhibitory projections to orexin neurons in regulation of sleep/wakefulness states.
第90回日本生理学会大会 2013年3月 東京 (発表3月27日)
- (3) Tsujino N, Tsunematsu T, Yamanaka A, Koyama Y, Sakurai T.
Chronic functional alterations of locus ceruleus noradrenergic neurons in orexin neuron-ablated narcoleptic mice. European Sleep Research Society 2012. Paris, France.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 なつ子 (辻野 なつ子)

Natsuko Kanda (Natsuko Tsujino)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構

助教

研究者番号：40432166