

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23771

研究課題名(和文)モノアミン系ニューロンに投射するオレキシンニューロンの制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of orexin neurons projecting to monoaminergic neurons

研究代表者

齊藤 夕貴(Saito, Yuki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号：70732436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：逆行性トランスシナプス標識法により青斑核あるいは腹側被蓋野に投射するオレキシンニューロンに直接入力するニューロン群をGFPにより標識したところ、両者は共通したインプットニューロンのパターンを示した。次に、同一個体において複数色での逆行性トランスシナプス標識法を行ったところ、腹側被蓋野と縫線核それぞれに投射するオレキシンニューロンには共通したインプットニューロンが存在する一方、一部は異なる入力パターンを持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにオレキシンニューロン群が脳幹のモノアミン神経系の起始核に密に投射しており、覚醒状態の維持に対して非常に重要であることは示唆されているが、特定の出力先をターゲットとしたオレキシンニューロン群の描出については報告がなかった。本研究では逆行性トランスシナプス標識法により出力先に応じたオレキシンニューロンの入力機構が明らかとなり、オレキシンニューロンを介した神経回路を明らかにする一端となった。本研究成果はオレキシンニューロンが関わる神経回路の全貌の理解につながり、将来的に未だ不明な点が多い睡眠メカニズムの解明に大きく寄与することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using retrograde trans-synaptic labeling, we labeled with GFP a group of neurons that directly input to orexin neurons projecting to the LC and VTA, and found that both groups of neurons showed similar patterns of input neurons. Next, we performed retrograde trans-synaptic labeling in multiple colors in the same brain sample, suggesting that orexin neurons projecting to the VTA and DR have similar pattern of input neurons, but part of them have different input patterns.

研究分野：神経科学

キーワード：オレキシン ドーパミン セロトニン ノルアドレナリン モノアミン

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠覚醒制御に関する研究における大きな進展の一つとして、オレキシンの発見が挙げられる。オレキシンは視床下部外側野(LHA)に限局して存在するオレキシンニューロン群によって産生される神経ペプチドである(Sakurai, et al., 1998)。オレキシンニューロンの脱落が睡眠障害のひとつであるナルコレプシーの原因であり、オレキシンは特に覚醒の安定化に重要な神経ペプチドである(Chemelli, et al., 1999)。申請者は近年、オレキシンニューロンのみに Cre が発現する Orexin-Cre マウス(Matsuki, et al., 2009)を使用し、逆行性トランスシナプス標識法を用いてオレキシンニューロンに直接入力する神経群を同定した(Saito, et al., 2018)。その結果、オレキシンニューロンは側坐核や分界条床核から直接入力を受けており、特に睡眠の開始に重要な視索前野の GABA 作動性ニューロンをはじめとする視床下部から多くの入力を持つことが明らかとなっている。一方、オレキシンニューロンの軸索は小脳をのぞく中枢神経系全域に投射していることが明らかになっており、モノアミン神経系の起始核である青斑核 locus coeruleus (LC)、縫線核 raphe nucleus (Raphe)、結節乳頭体核 tuberomammillary nucleus (TMN) などに顕著な投射がみられる。(Nambu, et al., 1999)。このようにオレキシンニューロンの入出力系については研究が進んでいるが、特定の入力源・出力先をもつオレキシンニューロン群が LHA 内でのように分布しているのかは未解明であった。

## 2. 研究の目的

これまでにオレキシンニューロン群が脳幹のモノアミン神経系の起始核に密に投射しており、覚醒状態の維持に対して非常に重要であることは示唆されているが、特定の出力先をターゲットとしたオレキシンニューロン群の描出については報告がない。本研究ではウイルスベクターを用いて出力先である各モノアミン神経系の起始核に対応したオレキシンニューロン群の入力源(インプットニューロン)を明らかにすることを目的とした。

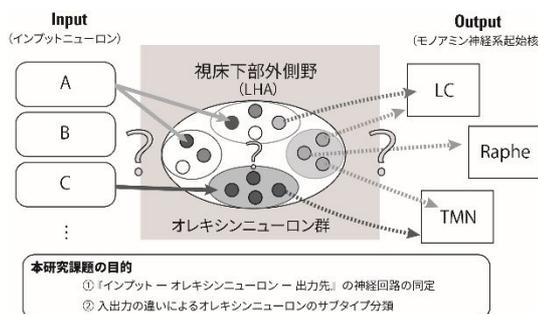


図 1: 本研究課題の概要図

## 3. 研究の方法

### 1) Orexin-iCre マウスの作出および表現型の解析

先行研究ではオレキシンニューロンのみに Cre が発現する Orexin-Cre トランスジェニックマウスを用いてきたが、本研究では組換え効率の改善、特異性の改善を期待して CRISPR/Cas9 により新たに Orexin-iCre ノックインマウス (Orexin-iCre) を作出した。さらに、Orexin-iCre ノックインマウスをドライバーマウスである Rosa26/CAG-tdTomato (Ai9) とかけ合わせ、iCre の発現がオレキシンニューロン特異的であることを確認した。

### 2) 逆光性トランスシナプス標識法による投射先特異的なオレキシンニューロンのトレース

オレキシンニューロンが密な投射を持つノルアドレナリン神経の起始核・青斑核(LC)やドーパミン神経の起始核・腹側被蓋野(VTA)をそれぞれターゲットとして逆行性トランスシナプス標識法での神経トレース実験を行う。具体的には、Orexin-iCre マウスの視床下部外側野に AAV10-EF1a-FLEX-TVA-mCherry および AAV10-CAG-FLEX-RG を投与し、SAD G-GFP を出力先の神経核に投与する。SAD ベクターの投与から 1 週間後、マウスの脳をサンプリングし、組織標本作製した。レーザー共焦点顕微鏡を用いてインプットニューロンの分布を観察した。

### 3) 免疫組織染色および in situ hybridization 法によるインプットニューロンの同定

2) で作成した組織標本に対して免疫組織染色法や in situ hybridization 法を行い、インプットニューロンが何ニューロンであるのかを明らかにした。

### 4) マルチカラーcTRIO 法の考案

逆行性トランスシナプス標識法を応用し、同一個体において独立した 2 つのインプット/アウトプット経路を同時に標識できるマルチカラーcTRIO 法を考案した。

## 4. 研究成果

1) 先行研究ではオレキシンニューロンのみに Cre が発現する Orexin-Cre トランスジェニックマウスを用いてきたが、本研究では組換え効率の改善、特異性の改善を期待して CRISPR/Cas9 により新たに Orexin-iCre ノックインマウス (Orexin-iCre) を作出した。

Orexin-iCre ノックインマウスをドライバーマウスである Rosa26/CAG-tdTomato(Ai9) とかけ合わせ、オレキシンニューロンの 95%以上で iCre による組換えが起きていることが明らかとなった。また、Orexin-Cre Tg マウスでは異所性の低レベルな Cre の発現が見られていたが、Orexin-iCre マウスでは異所性発現が大幅に減少し、iCre の発現がオレキシンニューロン特異的であることを確認した。

2) ノルアドレナリン神経の起始核である青斑核やドーパミン神経の起始核である腹側被蓋野をターゲットとして cTRIO 法による神経トレース実験を行い、それぞれの起始核に投射するオレキシンニューロンへ直接入力するニューロン群を GFP により標識したところ、両者は共通したインプットニューロンのパターンを示した。

3) SAD-G ベクターや AAV ベクターに改変を加え、同一個体において複数色に蛍光標識ができるマルチカラーcTRIO 法を考案した。腹側被蓋野と縫線核ターゲットにマルチカラーcTRIO 法を用いたところ、共通の領域にインプットニューロンが存在する一方で一部はオレキシンニューロンを介していても異なる入力パターンを持つことが示唆された。また、スターターニューロンであるオレキシンニューロンに着目すると、出力先によって一部共通するニューロンが存在していたが、多くは独立したオレキシンニューロンであることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齊藤夕貴
2. 発表標題 第24回日本睡眠学会研究奨励賞受賞講演 : Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤夕貴、馬島奈彩、櫻井武
2. 発表標題 モノアミン神経系起始核に投射するオレキシンニューロンの制御機構の解明
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki C Saito, Takeshi Sakurai
2. 発表標題 Analysis of input and output organization of orexin neurons
3. 学会等名 FENS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤夕貴、櫻井武
2. 発表標題 逆行性ウイルスベクターを用いたオレキシンニューロンの入出力構築の同定
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sakurai T, Saito Y.C, Yanagisawa M.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Karger	5. 総ページ数 11
3. 書名 Steiner MA, Yanagisawa M, Clozel M (eds): The Orexin System. Basic Science and Role in Sleep Pathology. Front Neurol Neurosci. Basel, Karger, 2021, vol 45, pp 11-21	

〔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
研究協力者	櫻井 武  (Sakurai Takeshi)	筑波大学・医学医療系・教授	
研究協力者	丹羽 康貴  (Niwa Yasutaka)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教	

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
---------	---------