

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293046

研究課題名(和文)メラニン凝集ホルモン産生神経の活動操作と運命制御を用いたレム睡眠調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of REM sleep by using manipulation of activity and fate of melanin concentrating hormone producing neurons

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：MCH産生神経特異的に光遺伝学を適用し、その活動を光で操作した。その結果表出する個体レベルでの睡眠覚醒を解析することによって、ノンレム-レム睡眠を調節する神経回路とその動作原理について解析した。その結果、MCH神経を光遺伝学を用いて活性化させると、ノンレム睡眠時間が減少し、レム睡眠時間が3倍に増加した。一方、覚醒時間はほとんど影響無かった。これらのことは、MCH神経活動が、睡眠覚醒状態変化において、ノンレム睡眠 レム睡眠の切り替えにおいて役割を担っていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Activity of MCH neurons were manipulated by optogenetics. Sleep/wakefulness analysis during manipulation of MCH neurons revealed its role in the regulation of sleep/wakefulness. Activation of MCH neurons increased total time in REM sleep to three-fold. However, time in wakefulness was not affected. These results suggest that MCH neurons play role in the regulation of sleep/wakefulness, especially in the transition of non-REM sleep and REM sleep.

研究分野：神経生理学

キーワード：睡眠覚醒 視床下部 メラニン凝集ホルモン 遺伝子改変 光遺伝学 ノンレム睡眠 レム睡眠 運命制御

### 1. 研究開始当初の背景

メラニン凝集ホルモン(MCH)は、元々魚類において同定された神経ペプチドであり、皮膚にあるメラニン顆粒を凝集させることによって体色を白色に変化させる作用をもつことから命名された。ほ乳類では体色変化には関与していないが、MCH 遺伝子は種を超えて大変良く保存されている。このことはMCH が重要な生理機能に関与していることを示唆しているものの、未だに生理的役割が解明されていない。MCH 受容体は G タンパク質共役型の MCH1R と MCH2R が知られており、マウスには MCH1R のみが存在する。MCH 神経細胞は、視床下部外側野に存在し、マウスでは約 9,000 個の細胞が疎らに分布する。しかし、そこから脳内のほとんどの領域に幅広く軸索を投射している。合成した MCH ペプチドを脳室内に投与すると強力に摂食行動を惹起すること(Qu et al., Nature 1996)、プロ MCH 遺伝子の欠損では摂食量の減少と体重減少が認められることから(Shimada et al., Nature 1998)、これまで長らく MCH は摂食行動を調節する因子と考えられてきた。しかしながら、近年の研究から睡眠覚醒調節における作用に注目が集まってきている。2008 年に MCH 欠損マウスのノンレム睡眠が減少していること(Willie et al., Neuroscience 2008)、また 2009 年に MCH 神経細胞がレム睡眠時に活動が上昇することが相次いで報告された(Hassani et al., PNAS 2009)。しかし、睡眠覚醒は丸ごとの個体でのみ生じる現象であるため、睡眠覚醒調節における MCH 神経の役割を明らかにするには、全ての神経回路が保存された個体動物を用いた解析が不可欠であった。そこで、本研究では、光遺伝学などの神経活動操作を行い、睡眠覚醒調節における MCH 神経の役割について明らかにすることを試みる。

### 2. 研究の目的

睡眠はノンレム睡眠とレム睡眠に分かれている。必ずノンレム睡眠が先行し、ノンレム睡眠後にレム睡眠が現れる。このノンレムとレムがどのような神経回路によって調節されているのかについてはほとんど分かっていなかった。我々は、視床下部のメラニン凝集ホルモン(MCH)産生神経活動を光遺伝学を用いて制御可能なマウスを独自に作成し、MCH 神経の活動を操作するとレム睡眠が約 3 倍に増加することを見いだした。本研究では、これらのマウスを用いてノンレム睡眠-レム睡眠の調節メカニズムを個体動物を用いて詳細に解明することを目的としている。また、MCH 神経細胞を時期特異的に脱落可能なマウスを用いて、ほとんど研究が進んでいないレム睡眠の生理的意義についても明らかにする。

### 3. 研究の方法

視床下部のメラニン凝集ホルモン(MCH)産

生神経特異的に光遺伝学を適用し、その活動を光で操作する。その結果表出する個体レベルでの睡眠覚醒を解析することによって、ノンレム-レム睡眠を調節する神経回路とその動作原理について解析する。また、MCH 神経細胞特異的除去によって睡眠覚醒調節がどのように変化するのかについて神経除去前後を解析し、睡眠覚醒調節における MCH 神経細胞の役割について詳細に明らかにする。さらに、これらのマウスを用いて、レム睡眠の生理的役割についても検討し、記憶の固定とレム睡眠といった従来の手法では解析が難しかった現象のメカニズムについても追える。

### 4. 研究成果

MCH 産生神経特異的に光遺伝学を適用し、その活動を光で操作した。その結果表出する個体レベルでの睡眠覚醒を解析することによって、ノンレム-レム睡眠を調節する神経回路とその動作原理について解析した。その結果、MCH 神経を光遺伝学を用いて活性化させると、ノンレム睡眠時間が減少し、レム睡眠時間が 3 倍に増加した。一方、覚醒時間はほとんど影響無かった。これらのことは、MCH 神経活動が、睡眠覚醒状態変化において、ノンレム睡眠-レム睡眠の切り替えにおいて、何らかの役割を担っていることを示している。しかし、光遺伝学を用いて MCH 神経の抑制を行ったところ、レム睡眠時間に影響が認められなかった。そこで、MCH 神経細胞特異的除去によって睡眠覚醒調節がどのように変化するのかについて神経除去前後を解析し、睡眠覚醒調節における MCH 神経細胞の役割について詳細に明らかにした。MCH 神経を除去すると、合計覚醒時間が延長し、ノンレム睡眠時間が減少した。しかし、レム睡眠時間は変化しなかった。これらのことは、MCH 神経の活動が覚醒とノンレム睡眠の切り替えにも関わっていることを示している。さらに、睡眠中の MCH 神経活動の役割について明らかにするために、MCH 神経軸索の可視化を行った。強力な蛍光タンパク質である Yellow Cameleon(YC)を MCH 神経特異的に発現する遺伝子改変マウスを用いて軸索の投射先を確認したところ、海馬領域に密な投射が認められた。そこで、海馬依存的な記憶を評価可能な、新奇物体認識試験を用いて、MCH 神経脱落マウスの記憶を評価したところ、非脱落マウスと比較して、記憶の形成と保持が良くなっていることを見いだした。これらのことは、MCH 神経が睡眠中に活動し、海馬において記憶に影響を与えている可能性を示唆している。

### 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 26 件)

1. Yamashita T,\* Yamanaka A, Lateral hypothalamic circuits for sleep-wake control, *Curr Opin Neurobiol*, 査読有, 44, 2017, 94-100  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095943881730051X>
2. Miyamoto D, Hirai D, Fung CC, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R, Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, \*Murayama M, Top-down cortical input during nrem sleep consolidates perceptual memory, *Science*, 査読有, 352, 2016, 1315-1318  
doi: 10.1126/science.aaf0902.
3. Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, \*Yamanaka A. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation, *Sci Rep*, 査読有, 6, 2016, 29480  
doi: 10.1038/srep29480.
4. \*Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D, Direct projections from hypothalamic orexin neurons to brainstem cardiac vagal neurons. *Neuroscience*, 査読有, 339, 2016, 47-53  
doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.09.038.
5. \*Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D, Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats, *J Neurophysiol*, 査読有, 116(5), 2016, 2250-2259  
doi: 10.1152/jn.00196.2016.
6. Chowdhury S, \*Yamanaka A, Optogenetic activation of serotonergic terminals facilitates gabaergic inhibitory input to orexin/hypocretin neurons, *Sci Rep*, 査読有, 6, 2016, 36039  
doi: 10.1038/srep36039.
7. Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, Watanabe M, Kato S, Senba E, Kobayashi K, Kuzumaki N, Yamanaka A, Morisaki H, \*Narita M, Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with gi-dreadd in mice, *Mol Pain*, 査読有, 12, 2016, 1-11  
doi: 10.1177/1744806916681567.
8. Branch AF, Navidi W, Tabuchi S, Terao A, Yamanaka A, Scammell TE, \*Diniz Behn C, Progressive loss of the orexin neurons reveals dual effects on wakefulness, *Sleep*, 査読有, 39, 2016, 369-377  
doi: 10.5665/sleep.5446.
9. Kato HE, Kamiya M, Sugo S, Ito J, Taniguchi R, Orito A, Hirata K, Inutsuka A, Yamanaka A, Maturana AD, Ishitani R, Sudo Y, \*Hayashi S, \*Nureki O, Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools. *Nat Commun*, 査読有, 6, 2015, 7177  
doi: 10.1038/ncomms8177.
10. Manita S, Suzuki T, Homma C, Matsumoto T, Odagawa M, Yamada K, Ota K, Matsubara C, Inutsuka A, Sato M, Ohkura M, Yamanaka A, Yanagawa Y, Nakai J, Hayashi Y, Larkum ME, \*Murayama M, A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception, *Neuron*, 査読有, 86, 2015, 1304-1316.  
doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.006.
11. Mizoguchi H, Katahira K, Inutsuka A, Fukumoto K, Nakamura A, Wang T, Nagai T, Sato J, Sawada M, Ohira H, Yamanaka A, \*Yamada K, Insular neural system controls decision-making in healthy and methamphetamine-treated rats, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 112, 2015, E3930-3939.  
doi: 10.1073/pnas.1418014112.
12. Hososhima S, Yuasa H, Ishizuka T, Hoque MR, Yamashita T, Yamanaka A, Sugano E, Tomita H, \*Yawo H, Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics, *Sci Rep*, 査読有, 5, 2015, 16533  
doi: 10.1038/srep16533.
13. \*Fuller PM, \*Yamanaka A, \*Lazarus M, How genetically engineered systems are helping to define, and in some cases redefine, the neurobiological basis of sleep and wake, *Temperature*, 査読有, 2, 2015, 406-417  
doi: 10.1080/23328940.2015.1075095
14. Black SW, Yamanaka A, \*Kilduff TS, Challenges in the development of therapeutics for narcolepsy, *Prog Neurobiol*, 2015. in press  
doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.12.002.
15. Black SW, Morairty SR, Chen TM, Leung AK, Wisor JP, \*Yamanaka A, \*Kilduff TS, KILDUFF Thomas S, GABAB agonism promotes sleep and reduces cataplexy in murine

- narcolepsy, *J Neurosci*, 査読有, 34(19), 2014, 6485-6494  
doi:  
10.1523/JNEUROSCI.0080-14.2014
16. 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*, 査読有, 34(19), 2014, 6495-6509  
doi:  
10.1523/JNEUROSCI.0073-14.2014
  17. 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*, 査読有, 34(20), 2014, 6896-6909  
doi:  
10.1523/JNEUROSCI.5344-13.2014
  18. Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, Takahashi A, Tabuchi S, Doya K, Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr Biol*, 査読有, 24(17), 2014, 2033-2040  
doi: 10.1016/j.cub.2014.07.041.
  19. Inutsuka A, Inui A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Lazarus M, Yamanaka A, Concurrent and robust regulation of feeding behaviors and metabolism by orexin neurons, *Neuropharmacology*, 査読有, 85, 2014, 451-460  
doi:  
10.1016/j.neuropharm.2014.06.0159.
  20. \*Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, \*Yamanaka A, Yoshioka M, Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behavior in mice, *Int J Neuropsychopharmacology*, 査読有, 17(11), 2014, 1777-1783  
doi:  
<http://dx.doi.org/10.1017/S1461145714000637>
- [学会発表](計 59 件)
1. 山中章弘, 視床下部神経活動の記録と操作による睡眠覚醒と記憶の制御機構の解明, 第 94 回日本生理学会大会, 2017.3.28, 浜松アクトシティ (浜松)
  2. 山中章弘, 視床下部神経細胞の活動記録と活動操作, 第 90 回日本薬理学会年会 2017.3.17, 長崎ブリックホール, 長崎新聞文化ホール (長崎).
  3. Yamanaka A, Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory, The 5th Annual IIS Symposium, 2016.12.12, Tokyo Conference Center Shinagawa (Tokyo, Japan)
  4. 山中章弘, 床下部神経細胞による睡眠覚醒、睡眠関連機能の調節メカニズム, 第 23 回日本時間生物学会学術大会, 2016.11.13, 名古屋大学 (名古屋)
  5. Yamanaka A, Hypothalamic melanin concentrating hormone (MCH) neurons inhibiting memory formation during sleep, Neuroscience 2016 Satellite Meeting, 2016.11.8, University of California, San Diego (San Diego, California, U.S.A)
  6. 犬束 歩, 山下 哲, スリカント チョドリ, 田口 徹, 山中章弘, オレキシン神経による鎮痛作用. 第 36 回鎮痛薬・オピオイドペプチシンポジウム, 2016.8.19, 北海道大学 (札幌)
  7. 山中章弘, 犬束 歩, 山下 哲, 田口 徹, ファイバーフォトメトリを用いた視床下部オレキシン神経活動の記録. 第 39 回日本神経科学大会, 2016.7.22, パシフィコ横浜 (横浜)
  8. Yamanaka A, The role of hypothalamic peptidergic neurons in the regulation of brain states, 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, 2016.7.3, Bella Center, Copenhagen, (Denmark)
  9. 山中章弘, 視床下部神経細胞による睡眠覚醒調節と記憶の制御, 日本薬学会第 136 年会, 2016.3.29, パシフィコ横浜 (横浜)
  10. 山中章弘, 視床下部ペプチド作動性神経細胞による睡眠覚醒と記憶の制御, 第 93 回日本生理学会大会, 2016.3.24, 札幌コンベンションセンター (札幌)
  11. 山中章弘, 犬束 歩, 山下 哲, オレキシン神経の活動操作と運命制御による痛み知覚における役割, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.3.10, パシフィコ横浜 (横浜)
  12. 山中章弘, 睡眠覚醒調節と睡眠関連脳機能の制御メカニズムについて, 千里ライフサイエンスセミナー, 2016.2.26, 千里ライフサイエンスセンター (豊中)
  13. Yamanaka A, Hypothalamic peptidergic neurons regulates sleep/wakefulness and memory. International Symposium Optogenetics 2015, 2015.12.4, 東京医科歯科大学 (東京)
  14. 山中章弘, 犬束 歩, 山下 哲, 丸ごと動物を用いた特定神経の活動操作と活動記録, 第 42 回日本神経内分泌学会,

- 2015.9.18、仙台市戦災復興記念館（仙台）
15. 山中章弘、常松友美、伊澤俊太郎、上野貴文、大村 優、寺尾 晶、睡眠と記憶の調節に関わる視床下部神経の役割、第38回日本神経科学大会、2015.7.29、神戸国際会議場、国際展示場（神戸）
  16. 山中章弘、How does the brain regulate sleep/wakefulness? RIKEN BSI Summer Program Lecture Course, 2015.7.22, RIKEN BSI（和光）
  17. 山中章弘、犬束 歩、山下 哲、神経活動操作と運命制御を用いた睡眠関連機能の解析、日本睡眠学会第40回定期学術集会、2015.7.3、栃木県総合文化センター、宇都宮東武ホテルグランデ（宇都宮）
  18. 山中章弘、Manipulation of specific neurons using optogenetics or pharmacogenetics、第56回日本神経学会学術大会 2015.5.22、朱鷺メッセ、ホテル日航新潟（新潟）
  19. Yamanaka A、Study of neuroendocrine system in hypothalamus using optogenetics and pharmacogenetics, Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism, 2015.5.1, Sheraton Grand Walkerhill Hotel (Seoul, Korea)
  20. 山中章弘、犬束 歩、常松友美、山下 哲、光遺伝学・薬理遺伝学を用いた内分泌研究、第88回日本内分泌学会学術総会、2015.4.24、ホテルニューオータニ（東京）
  21. 山中章弘、オレキシンの基礎的なメカニズム、第88回日本薬理学会年会、2015.3.19、名古屋国際会議場（名古屋）
  22. 山中章弘、リズムと本能行動調節のメカニズム、第92回日本生理学会大会、2015.3.22、神戸国際会議場（神戸）
  23. 山中章弘、犬束 歩、山下 哲、特定神経活動操作による神経回路機能の解明、第88回日本薬理学会年会、2015.3.18、名古屋国際会議場（名古屋）
  24. 山中章弘、光遺伝学を用いた行動発現制御、大阪大学蛋白質研究所セミナー「光運動反応・光センサー蛋白質・光遺伝学」、2015.3.11、大阪大学（吹田）
  25. 山中章弘、光遺伝学を組み合わせた多角的解析による本能行動調節機構の解明、第6回日本安全性薬理研究会 学術年会、2015.2.21、東京大学（東京）
  26. 山中章弘、光遺伝学、薬理遺伝学を用いた神経活動操作による行動発現機序解明、第58回「脳の医学・生物学研究会」、2015.1.10、名古屋大学（名古屋）
  27. 山中章弘、光遺伝学、薬理遺伝学を用いた行動発現メカニズムの解明、第2回包括的神経グリア研究会、2015.1.11、オースプラザ（名古屋）
  28. 山中章弘、オプトジェネティクスを用いた覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠の制御、第35回日本レーザー医学会総会、2014.11.30、京王プラザホテル（東京）
  29. 山中章弘、光遺伝学を用いた精神神経薬理研究、第44回日本神経精神薬理学会、2014.11.21、名古屋国際会議場（名古屋）
  30. 山中章弘、機能的コネクトームによる本能行動制御に関わる神経機構の解明、第37回日本神経科学大会、2014.9.12、パシフィコ横浜（横浜）
  31. 山中章弘、犬束 歩、常松 友美：覚醒-ノンレム睡眠-レム睡眠調節における視床下部メラニン凝集ホルモン産生神経の役割、第37回日本神経科学大会、2014.9.12、パシフィコ横浜（横浜）
  32. 山中章弘、Manipulation of neural activity and behavior control、第37回内藤コンファレンス、2014.7.16、ヒルトンニセコビレッジ（ニセコ）
  33. 山中章弘、睡眠覚醒調節におけるオレキシン神経の役割、日本睡眠学会第39回定期学術集会、2014.7.4、あわぎんホール（徳島）
- 〔図書〕(計8件)
1. 山中章弘、睡眠科学 最新の基礎研究から医療・社会への応用まで、2016（112-123）
  2. 山中章弘、田淵紗和子、コメディカル専門基礎科目シリーズ 生理学、2016（45-64）
  3. 山中章弘、朝倉書店、光と生命の事典、2016（136-137）
  4. 犬束歩、山中章弘、化学同人、分子脳科学 分子から脳機能と心に迫る、2015（171-180）
  5. Yamanaka A、他、Orexin and Sleep. Springer, 2015（81-92）
  6. Yamanaka A、他、Springer Japan, Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications, 2015(241-248)
  7. Yamanaka A、他、Springer Japan, Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications, 2015(249-264)
  8. 犬束歩、山中章弘、南山堂、プロGRESS生命科学、2014（116-118）
- 〔産業財産権〕
- 出願状況（計1件）
- 名称：投射経路選択的な遺伝子発現制御  
 発明者：山中章弘、犬束歩  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：特願 2014- 93463  
 出願年月日：平成 26 年 4 月 30 日  
 国内外の別：国内

取得状況（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：同上

種類：特許

番号：特許第 5871304 号

取得年月日：平成 28 年 1 月 22 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/drof1/nr/index.html>

6 . 研究組織

(1) 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