

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01832

研究課題名(和文) 錐体オプシンを用いた光遺伝学的手法による睡眠・覚醒制御システム作動機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of sleep-wake regulatory system by optogenetics featuring cone opsins.

研究代表者

前島 隆司 (Maejima, Takashi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70399319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 錐体視細胞のオプシンを人為的に神経細胞に発現させると、光照射により神経細胞の電気活動と伝達物質の放出を抑制させることができる。本研究では、この手法を用い睡眠・覚醒制御システムの中核を担う視床下部神経系とモノアミン作動性神経系の機能的役割について解析を行った。

まず、ナルコレプシー睡眠障害モデルマウスにおいて、扁桃体におけるセロトニン放出の低下が情動性脱力発作の発症をもたらしていることが明らかになった。また、覚醒制御に関わる視床下部外側野オレキシン神経が、青斑核ノルアドレナリン神経の活性化を介して、扁桃体で処理される恐怖記憶によって表出する恐怖反応の発現を促していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： When cone opsins of photoreceptors are artificially expressed in neurons, light irradiation can suppress the neuronal activity and the release of transmitters from the neurons. Applying this method, we analyzed the functional roles of the hypothalamus and the monoaminergic system, which are the core of the sleep-wake regulatory system.

First, reduction of serotonin release in the amygdala has been shown to result in the development of the cataplexy-like episode in the mice model of sleep disorder, narcolepsy. Second, in the fear conditioning test of mice the lateral hypothalamic orexin neurons involved in brain arousal have been elucidated to promote the fear-related behaviors regulated in the amygdala via the activation of noradrenergic neurons.

研究分野：脳科学(基盤・社会脳科学)、光脳科学、神経生理学

キーワード：睡眠・覚醒 光遺伝学 錐体オプシン オレキシン セロトニン ノルアドレナリン ヒスタミン

1. 研究開始当初の背景

近年、光感受性を持つ機能性タンパク質を人為的に特定の神経細胞に発現させ、光照射によってその神経細胞の活動を操作する手法(光遺伝学的手法)が開発されてきた。これは従来の薬理的な手法に比べ、時空間的に精緻な操作を行える点で優れており、これまでに様々な脳機能の研究に適用され大きな成果を挙げている。

研究代表者らは神経細胞の活動を抑制する手法として、脊椎動物の錐体視細胞に発現する錐体オプシン(フォトプシン)の適用を検証してきた。この錐体オプシンを神経細胞に発現させ光を照射すると、Gタンパク質共役型内向き整流性K⁺チャネルを活性化して細胞の膜電位を過分極させることができる。錐体オプシンは光感受性が高く、励起波長の異なる3種類の型が存在するため、光遺伝学的素子として非常に有効であることが見込まれていた。しかしながら、この錐体オプシンを用いた光遺伝学的手法が実際に生体動物における脳機能の解析に適用できるの十分な検証がなされていなかった。

2. 研究の目的

睡眠は心身の健康を保つために不可欠な生理機能である。睡眠・覚醒制御システムの解明は健康な生活スタイルの提唱と睡眠障害の治療開発に寄与する重要な研究課題である。睡眠・覚醒の切り替えとその状態の維持を制御するシステムは視床下部外側野に存在するオレキシン神経とモノアミン・コリン作動性神経系を中心とした脳内の広範囲に及ぶ神経回路網によって担われている。オレキシンの欠損は睡眠発作と情動性脱力発作を生じるナルコレプシー睡眠障害の要因となっている。睡眠・覚醒の切り替えは、概日リズム、体内のエネルギー状態、外的環境に依存し、脳の活動パターン、筋緊張、呼吸、心拍、体温調節など様々な生理機構のモード切り替えを生じる複雑なプロセスである。このような複雑な制御を担う神経回路網の解析は分子遺伝学的手法や薬理学的手法のみでは不十分な点があり、近年開発が進んできた光遺伝学的手法の導入が行われている。本研究では、錐体オプシンを用いた光遺伝学的手法の実証と技術改良を行うための実践研究の対象としてこの睡眠・覚醒制御システムの中核を担う視床下部神経系とモノアミン作動性神経系の機能解析を選定し、以下の項目の研究においてその手法を適用した。

(1)ナルコレプシー睡眠障害モデルマウスにおける情動性脱力発作に対するセロトニン神経系の病態生理学的役割の解析

(2)恐怖記憶によって表出する恐怖反応の発現機構におけるオレキシン神経-ノルアドレナリン神経回路の機能的役割の解析

3. 研究の方法

光遺伝学的手法を用いてオレキシン神経、セロトニン神経、ノルアドレナリン神経の神経活動及び軸索終末からの伝達物質の放出を増強または抑制させ、マウスの睡眠・覚醒状態の変化や恐怖反応の変化を観察した。脳波・筋電図および撮影したマウスの行動を解析してレム・ノンレム睡眠・覚醒状態を識別した。恐怖条件付け実験においては、音(条件刺激)と電気ショック(無条件刺激)の組み合わせによる恐怖条件付けの後、条件刺激(音)に対して生じるすくみ行動の発現時間を計測した。

錐体オプシンはアデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)により神経細胞に遺伝子導入した。長波長型(LWO)及び短波長型錐体オプシン(SWO)をそれぞれ励起波長が重ならない蛍光タンパク質eGFPとmCherryで標識し、Creリコンビナーゼ(Cre)依存的に発現が惹起されるように2重loxP配列で挟み込んだ発現ベクター(D10-LWO-eGFPとD10-SWO-mCherry)を設計した。精製したAAVベクターは、特定の神経細胞にのみCreを発現する遺伝子改変マウスにおいて目的の神経細胞が存在する脳領域に微量投与された。オレキシン神経への遺伝子導入にはOrexin-Creマウスの視床下部外側野に、セロトニン神経の場合はSERT-Creマウスの背内側縫線核に、ノルアドレナリン神経の場合はNAT-Creマウスの青斑核にそれぞれ投与された。錐体オプシンの発現と機能性の評価は、細胞マーカーとの二重免疫組織染色と脳スライス標本におけるパッチクランプ記録により行った。マウスに手術を施して、目的の神経細胞の起始核または軸索投射領域の近傍に光ファイバーを留置し、行動実験中にレーザー光源を用いた光照射を行い、錐体オプシンや他の光遺伝学的分子を活性化した。

4. 研究成果

(1)情動性脱力発作に対するセロトニン神経系の病態生理学的役割の解析

本研究では、ナルコレプシー睡眠障害モデルマウスにおいて、情動性脱力発作(カタプレキシー)に対するセロトニン神経系の病態生理学的役割を解析し、扁桃体でのセロトニン放出レベルによってカタプレキシーの発現が制御されることを明らかにした(業績2)

疾患モデルマウスとしてオレキシン欠損マウス(Orexin-ataxin3マウス)を解析した。このマウスは暗期にチョコレートを与えるとレム睡眠と筋弛緩を特徴とするカタプレキシーを容易に発症する。このマウスとセロトニン神経特異的にCreを発現するSERT-Creマウスを交配して得られた仔マウスを実験に用いた。AAVベクターを用いてセロトニン

神経特異的に変異型チャネルロドプシン (SSFO) を遺伝子導入し、縫線核を光照射してセロトニン神経の活動を持続的に上昇させると、カタプレキシーの発症が著しく抑制された。また、セロトニン神経の投射脳領域のうち情動反応の処理に寄与する扁桃体においてのみ、セロトニン投射線維を光刺激してセロトニンの放出を促進するとカタプレキシーの発症が減少した。

また先行研究により、別の睡眠障害モデル動物である二つのオレキシン受容体 (Ox1r と Ox2r) の二重遺伝子欠損マウスにおいて、セロトニン神経特異的に Ox2r 受容体を戻し発現させるとカタプレキシーの発症が抑制されることが明らかにされている。そこでこの症状改善が扁桃体におけるセロトニン放出に依存しているのか検証するために、扁桃体におけるセロトニン放出を特異的に抑制した場合、カタプレキシーが再度発症するか試験した (図 1)。まず、Ox2r レスキューマウスのセロトニン神経に錐体オプシン (SWO) を遺伝子導入した。次に、脳スライス標本を用いて電気生理学的実験を行い、扁桃体においてセロトニン投射線維上の錐体オプシンを光刺激するとセロトニンの放出が抑制されることを確認した。そして、疾患モデルマウスの行動実験において、この光遺伝学的手法により扁桃体におけるセロトニンの放出を抑制すると、カタプレキシーの発症が著しく高まることが観察された。

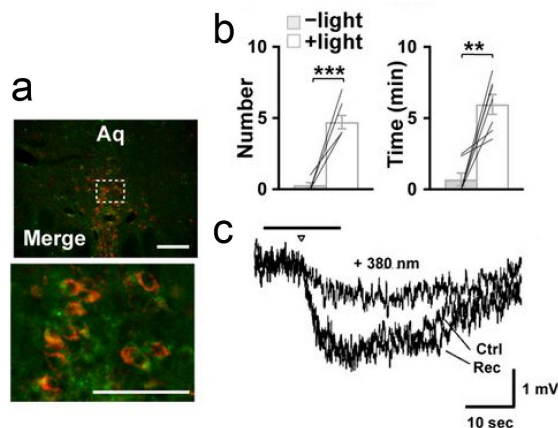


図 1 a.セロトニン神経(緑)に錐体オプシン(赤)を発現させた。(上:背内側縫線核、下:点線内の拡大) b.扁桃体において、セロトニン線維上の錐体オプシンを光刺激し、セロトニンの放出を抑えると、カタプレキシーの発症数と時間が増加した。c.電気生理学的実験により、錐体オプシンを光刺激(380 nm)すると、セロトニン線維を刺激して誘導される1型セロトニン受容体を介する過分極応答が减弱することを確認した。

以上の実験から、睡眠障害モデルマウスにおいて、扁桃体でのセロトニン放出を促進するとカタプレキシーの発症が著しく抑制され、逆にセロトニンの放出を抑えると発症が促されることが明らかになった。セロトニン神経の活動はオレキシン神経の入力により

維持されており、その入力の欠損がナルコレプシー発症の要因となる。今回の研究から、扁桃体に対するセロトニン入力がかたプレキシー発症に関わる重要な神経回路であることが示された。また、錐体オプシンを用いた光遺伝学的手法が生体における脳機能の解析に適応できることが確認された。

(2) 恐怖反応の発現機構におけるオレキシン神経 - ノルアドレナリン神経回路の機能的役割の解析

本研究では、覚醒状態の制御に寄与するオレキシン神経が、心的外傷後ストレス障害で見られるような恐怖記憶により表出する恐怖反応の発現レベルの調節にも関与していることを明らかにした(業績1)。

オレキシン神経は脳幹青斑核に投射し、オレキシン受容体 (OX1R) を介してノルアドレナリン神経を活性化する。このオレキシン - ノルアドレナリン神経伝達を人為的に操作し、マウスの恐怖条件付け実験において、条件刺激(音)に対する恐怖反応(すくみ行動)がどのように変化するか観察した。Orexin-cre マウスの視床下部外側野に AAV ベクターを投与してオレキシン神経特異的にチャネルロドプシン 2 (Chr2) または錐体オプシン (LWO) を発現させた。条件付け後、マウスをホームケージに戻し、青斑核においてオレキシン線維上に発現する Chr2 を光照射して活性化すると、音刺激に対して生じるすくみ行動の発現が著しく高まった。また新規のケージにおいて試験した場合には、音の提示がなくとも、青斑核への光照射だけですくみ行動を生じた。反対に、錐体オプシンを発現させたマウスでは、青斑核における光照射によりオレキシンの放出を抑制すると、すくみ行動の発現が顕著に低下することが観察された。さらに Chr2 を用いた光遺伝学的手法により扁桃体におけるノルアドレナリン神経の投射線維を活性化すると、条件付けされたマウスは新規ケージにおいてすくみ行動を生じることも示された。

以上の実験から、覚醒制御に関わる視床下部外側野オレキシン神経が、オレキシン伝達により青斑核ノルアドレナリン神経の活動を高め、次いで恐怖記憶の責任部位である扁桃体においてノルアドレナリンの放出を促すことで、マウスの恐怖反応の発現を高めていることが示された。

(3) 改変型狂犬病ウイルスによる逆行性トランスシナプス標識法を用いたヒスタミン神経にシナプス入力する神経細胞の解析

ヒスタミン神経は視床下部結節乳頭核に存在し、脳の広範囲に軸索投射して様々な脳領域にヒスタミンを放出する。この中枢ヒス

タミン神経系は睡眠・覚醒、概日周期、体温調節、エネルギー代謝などの恒常性維持機能に加え、記憶、学習、認知などの高次脳機能にも関与する。このような幅広い脳機能をヒスタミン神経系が統合的に調節する制御機構については未だ不明な点が多い。この間に対するアプローチとして、ヒスタミン神経にシナプス入力を送る神経細胞を同定し、どの脳領域からどのような情報が送り込まれるのか明らかにすることが考えられる。そこで遺伝子改変型狂犬病ウイルスによる逆行性トランスシナプス標識法を導入し、ヒスタミン神経にシナプス入力する神経細胞の解析を行った。

この手法では目的の細胞に対し Cre 依存的に狂犬病ウイルスを初期感染させることができ、逆行性にウイルス感染した一次入力神経は蛍光蛋白質で標識される。今回用いたヒスタミン神経特異的 Cre 発現マウスの系統ではヒスタミン神経系の亜核(E1-E5)のうち、腹側部の E1 と E2 亜核を中心に狂犬病ウイルスが初期感染した。これに対する入力神経は視索前野、視床下部、乳頭体を中心に観察され、遠位の脳領域にも複数確認された。さらに、標識された細胞の一部について機能的解析を行った。腹外側視索前野核に見出された入力細胞(図2)は主に GABA 作動性であり、ノルアドレナリン及びセロトニンでその神経活動が抑制されることが確認された。先行研究に照らし、この神経は睡眠時に活動する神経と同等のものと考えられた。このようにヒスタミン神経に対する入力層を構成する神経群を組織的かつ機能的に解析することで、ヒスタミン神経系の機能的な役割を解明する一助となると考えられる。

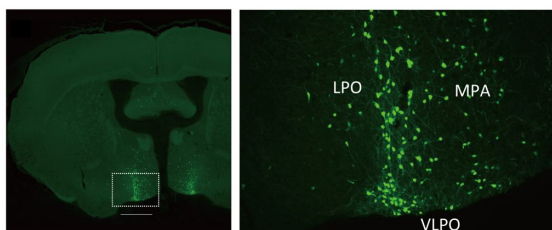


図2.(左)視索前野を含む冠状断脳切片。改変型狂犬病ウイルスによりヒスタミン神経へシナプス入力する神経細胞が蛍光標識された。(右)点線内の拡大。腹外側視索前野核(VLPO)、外側視索前野(LPO)に多くの入力神経が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Soya S, Takahashi TM, McHugh TJ, Maejima T, Herlitz S, Abe M, Sakimura K, Sakurai T; Orexin modulates behavioral fear expression through the locus coeruleus. *Nature Communications* 8(1),1606 (2017)
doi: 10.1038/s41467-017-01782-z.

Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Masseck OA, Herlitz S, Yoshioka M, Sakurai T, Mieda M; Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(17), E3526-E3535 (2017)
DOI: 10.1073/pnas.1614552114

〔学会発表〕(計4件)

前島隆司 「マウス脳におけるヒスタミン作動性神経細胞にシナプス入力する神経細胞のマッピング」
第24回日本時間生物学会学術大会 2017

前島隆司 「ヒスタミン作動性神経細胞にシナプス入力する神経細胞のマッピング」
第64回中部生理学会 2017

前島隆司 「マウス脳におけるヒスタミン作動性神経細胞に直接シナプス入力を送る神経細胞のマッピング」
第39回日本神経科学大会 2016

前島隆司 「マウス脳におけるヒスタミン作動性神経細胞に直接シナプス入力を送る神経細胞のマッピング」
第93回日本生理学会大会 2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

前島 隆司 (MAEJIMA, Takashi)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：70399319

(2)連携研究者

長谷川 恵美 (HASEGAWA, Emi)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教
研究者番号：40765955

征矢 晋吾 (SOYA, Shingo)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教
研究者番号：90791442

櫻井 武 (SAKURAI, Takeshi)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・教授
研究者番号：60251055

三枝 理博 (MIEDA, Michihiro)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：20296552

(3)研究協力者

Stefan Herlitz
ルール大学ポーフム・生物学部・教授