

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16296

研究課題名（和文）視床下部ニューロテンシン神経が司る覚醒機構の重要性

研究課題名（英文）Importance of lateral hypothalamic neurotensinergic neurons in wake maintenance

研究代表者

長沼 史登（Naganuma, Fumito）

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：80780519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：視床下部外側ニューロテンシン神経細胞（Nts-LH）の有する覚醒調節機構についてオプトジェネティクスとファイバースコープにより解析を行った。まず、Nts-LH特異的に光受容体を発現させ、光刺激を行うと、NREM睡眠からマウスは毎回覚醒したが、REM睡眠中では影響がなかった。次に、カルシウムセンサーをNts-LHに発現させ、脳波、筋電図を測定しながらカルシウムイメージングを行ったところ、Nts-LHは睡眠時と比較し、覚醒時に有意に興奮していることが明らかになった。以上のことから、Nts-LHは覚醒の維持に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nts-LHが強力な覚醒作用を持つことは本研究により初めて明らかにされた。これに加え、Nts-LHは腹側被蓋核や結節乳頭核などの覚醒に重要なモノアミン神経系が神経核を有する脳部位に強く投射していることが明らかになっている。そのため、Nts-LHを中心とする覚醒調節機構の全容解明は、睡眠覚醒を司る神経基盤の理解に大きく貢献する可能性がある。将来的には睡眠障害の病態の理解や新規治療標的の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The optical stimulation of neurotensinergic neurons in lateral hypothalamus (Nts-LH) during NREM sleep strongly promoted arousal in mice. In addition, in vivo calcium imaging elucidated that neuronal activity of Nts-LH was high during wakefulness compared with during sleep. These results indicated that Nts-LH is important for wake maintenance.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ニューロテンシン 視床下部 睡眠覚醒

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は視床下部外側部 (LH) に存在する神経ペプチドの1つであるニューロテンシン (Nts-LH) 神経細胞が関与する覚醒調節機構について研究を行っている。これまでの研究で、化学遺伝学的手法により数時間 Nts-LH 神経細胞を活性化したところ、その間マウスは一度も睡眠することなく覚醒が維持された。これにより、Nts-LH 神経細胞は非常に強力な覚醒誘導作用を持っていることが明らかになった (F Naganuma et al., *PLoS Biol.* 2019)。これに加え、Nts-LH 神経細胞は視索前野、腹側被蓋核、結節乳頭核、縫線核、青斑核など睡眠覚醒に重要な脳部位に神経線維を投射していることが明らかになった。これらのことから Nts-LH を中心とした覚醒制御機構を解明することで、睡眠覚醒調節機構の神経分子メカニズムの理解が進むことが期待される。

## 2. 研究の目的

睡眠覚醒調節は様々な種類の神経系が複雑に機能し合うことで行われていると考えられる。先行研究の結果から、Nts 神経細胞は視床下部外側部における覚醒調節機構の中心的役割を果たしている可能性が示唆された。そのため、Nts-LH 神経細胞を中心とした覚醒調節機構の詳細を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

まず、オプトジェネティクス的手法を用い、Nts-LH 神経細胞の機能解析を行った。Cre-LoxP システムにより、Cre 依存的に活性化チャンネルロドプシン (ChR2) を発現する AAV8-EF1 $\alpha$ -LoxP-ChR2(H134R)-mCherry (Addgene, 20297-AAV8) をニューロテンシン神経細胞特異的に Cre が発現する Nts-Cre マウスの視床下部外側部にステレオタキス固定下、ガラスキャピラリーを用いて微量注入した (100 nL, AP-1.70, DV-5.10, LR $\pm$ 1.1 from bregma)。これにより、Nts-LH 神経細胞にのみ ChR2 が発現する。AAV 注入後、LH に光ファイバーを挿入し、脳波、筋電図測定用の電極を埋め込んだ。これにより、脳波、筋電図を測定しながら青色光刺激を行うことで、任意のタイミングで Nts-LH 神経細胞を活性化することができる。AAV 注入から 3 週間後、強い覚醒作用を有する Nts-LH 神経細胞を REM 睡眠中、NREM 睡眠中に活性化した場合マウスの睡眠にどのような変化を及ぼすかについて検討をした。

次に、カルシウムセンサーの1つである GCaMP7f を用い、*in vivo* カルシウムイメージングにて Nts-LH 神経細胞の神経活動をモニタリングした。上記同様 AAV8-Syn-LoxP-GCaMP7f (Addgene, 104492-AAV8) を Nts-Cre マウスの LH に微量注入し (100 nL, AP-1.70, DV-5.10, LR $\pm$ 1.1 from bregma) Nts-LH 神経細胞にのみ GCaMP7f を発現させた。AAV 注入後、測定用の光ファイバーを LH に挿入し、脳波、筋電図測定用の電極を埋め込んだ。これにより、脳波、筋電図を測定しながら、覚醒時、急速眼球運動 (rapid-eye-movement: REM) を伴う REM 睡眠、伴わない NREM 睡眠中の Nts-LH 神経細胞の神経活動をモニタリングした。

オプトジェネティクス、*in vivo* カルシウムイメージング実験終了後は組織学的検討を全てのマウスで行い、ChR2、GCaMP7f が視床下部外側部に発現しているかについて確認を行った。ChR2 を用いた実験では Nts-LH 神経細胞が光刺激により活性化されているかについて神経活動のマーカーである cFos の免疫染色も行い検討した。上記実験に使用した AAV はすべて Addgene 社から購入した。

## 4. 研究成果

まず、Nts-LH の詳細な機能についてオプトジェネティクス的手法により検討を行った。脳波、筋電図を確認しながら、NREM 睡眠中、REM 睡眠中に光刺激により、Nts-LH 神経細胞を活性化した。その結果、NREM 睡眠中に Nts-LH を活性化した場合、ほぼ毎回マウスは覚醒した。一方、REM 睡眠中の Nts-LH の光刺激はマウスの睡眠に影響を与えなかった。このことから、Nts-LH 神経細胞の有する覚醒機能は NREM 睡眠中のマウスを毎回起こすほど強力なものであることが明らかになった。一方、REM 睡眠中の光刺激によりマウスが起きなかった原因を明らかにすることについては今後の課題である。光刺激後マウスを灌流固定し組織学的に検討を行ったところ、視床下部外側部に AAV 注入部位のマーカーである mCherry の発現を認め、光刺激による cFos の発現も確認できた。今後はこの手法を用い、Nts-LH 神経細胞の投射が認められている脳部位にて光刺激を行うことにより神経回路特異的な覚醒調節における機能を明らかにしたいと考えている。

次に、*in vivo* カルシウムイメージングを行った。脳波、筋電図を測定しながら、GCaMP7f を用いたカルシウムイメージングにより Nts-LH 神経細胞の神経活動をモニタリングした。脳波、筋電図のパターンから、覚醒時、NREM 睡眠時、REM 睡眠時と3つのステージに分割し、それぞれのステージにおける Nts-LH 神経細胞の働きについて検討を行った。その結果、Nts-LH 神経細胞は、NREM 睡眠、REM 睡眠時と比較し、覚醒時に有意に神経活動が亢進していることが明らかになった。このことから、Nts-LH 神経細胞は覚醒の維持に重要な役割を果たしている可能

性が示唆された。実験後、マウスを灌流固定し、視床下部外側部の GCaMP7f の発現を確認した。In vivo カルシウムイメージングについても今後は神経回路ごとに検討を行い、Nts-LH 神経細胞の神経活動と、睡眠、覚醒における機能的連関を明らかにしたいと考えている。

本研究により、オプトジェネティクス、*in vivo* カルシウムイメージングのための設備、実験環境が整備できたため、今後 Nts-LH 神経細胞を中心とした覚醒制御機構の詳細についてさらに明らかにすることで、睡眠覚醒調節に関わる新規神経回路基盤を解明したいと考えている。

#### 参考文献

F Naganuma, D Kroeger, SB Bandaru, G Absi, JC Madara, R Vetrivelan: Lateral hypothalamic neurotensinergic neurons promote arousal and hyperthermia. *PLoS Biol.* 2019, e3000172

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Bandaru Sathyajit S., Khanday Mudasir A., Ibrahim Nazifa, Naganuma Fumito, Vetrivelan Ramalingam	4. 巻 20
2. 論文標題 Sleep-Wake Control by Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Neurons: a Review of Recent Findings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Neurology and Neuroscience Reports	6. 最初と最後の頁 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11910-020-01075-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Yo, Yoshikawa Takeo, Naganuma Fumito, Kikkawa Takako, Osumi Noriko, Yanai Kazuhiko	4. 巻 175
2. 論文標題 Chronic brain histamine depletion in adult mice induced depression-like behaviours and impaired sleep-wake cycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108179 ~ 108179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2020.108179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Karpati Aniko, Yoshikawa Takeo, Naganuma Fumito, Matsuzawa Takuro, Kitano Haruna, Yamada Yo, Yokoyama Mariko, Futatsugi Akira, Mikoshiba Katsuhiko, Yanai Kazuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Histamine H1 receptor on astrocytes and neurons controls distinct aspects of mouse behaviour	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52623-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naganuma Fumito, Kroeger Daniel, Bandaru Sathyajit S., Absi Gianna, Madara Joseph C., Vetrivelan Ramalingam	4. 巻 17
2. 論文標題 Lateral hypothalamic neurotensin neurons promote arousal and hyperthermia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Fumito Naganuma, Tadahiko Nakamura, Vetrivelan Ramalingam, Nobuyuki Okamura
2. 発表タイトル Neurotensin in lateral hypothalamus
3. 学会等名 Novel Pain Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長沼史登、中村正帆、Vetrivelan Ramalingam、岡村信行
2. 発表タイトル 視床下部ニューロテンシン 神経系が関与する新規覚醒機構
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumito Naganuma, Tadahiko Nakamura, Vetrivelan Ramalingam, Nobuyuki Okamura
2. 発表タイトル Neurotensinergic neurons in lateral hypothalamus have critical roles in wake promotion and hyperthermia
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumito Naganuma, Tadahiko Nakamura, Vetrivelan Ramalingam, Nobuyuki Okamura
2. 発表タイトル メラニン凝集ホルモン神経細胞から放出されるグルタミン酸のREM睡眠調節における役割
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			