

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月16日現在

機関番号：74415

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300133

研究課題名（和文）局所的 RNA 干渉法を用いた睡眠促進物質アデノシンの作用部位の同定

研究課題名（英文）Developing focal RNA interference for the identification of neural entry points for sleep-promoting adenosine

研究代表者

ラザルス ミハエル（Lazarus Michael）

財団法人 大阪バイオサイエンス研究所

研究者番号：80469650

研究成果の概要（和文）：

アデノシンは、 A_{2A} 受容体を活性化して睡眠を誘発する。 A_{2A} 受容体は大脳基底核間接路の線条体淡蒼球系神経細胞に多く発現している。ここではドーパミン D_2 受容体と A_{2A} 受容体が共発現し、運動、習慣形成、報酬など覚醒にかかわるすべての活動に寄与している。パーキンソン病のような低ドーパミン状態では覚醒の維持が損なわれることが知られているが、大脳基底核における A_{2A} 受容体の睡眠と覚醒の制御への寄与に関しては未だ不明である。

本研究では、領域特異的に遺伝子導入するための以下に示す強力なツールを用いて、大脳基底核に発現する A_{2A} 受容体の覚醒意識に関する役割について研究を行った。具体的には、Cre/lox システムを使った A_{2A} 受容体のコンディショナルノックアウトマウス、および A_{2A} 受容体の short-hairpin RNA をアデノ随伴ウイルスを用いて局所的に導入することにより、脳内の特定の部位での A_{2A} 受容体の発現を抑制したラット、光感受性チャネルロドプシンやデザイナードラッグのみで活性化するデザイナー受容体（designer receptors exclusively activated by a designer drug: DREADD）などの遺伝子改変受容体-チャンネルシステムを用いて、大脳基底核の A_{2A} 受容体発現神経の活動を *in vivo* での刺激と抑制を利用して調節した。本研究により、カフェインの覚醒効果は、側坐核殻部の神経に発現する A_{2A} 受容体に決定的に依存し、これらの神経の一過性の活性化が睡眠を誘発することを明らかにした。これらの実験結果から、側坐核に発現する A_{2A} 受容体が睡眠覚醒を制御する鍵となることが示された。腹側線条体は行動機能を統合する特別な能力を持っているため、意識により制御された睡眠覚醒において重要な領域である。我々は、動機付けが睡眠覚醒を制御する重要な基本原理ではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：

Adenosine promotes sleep through the activation of A_{2A} receptors. A_{2A} receptors are densely expressed on striatopallidal neurons of the basal ganglia, where dopamine D_2 receptors are co-expressed with A_{2A} receptors and involved in motor function, habit formation, and reward/addictive behaviors, all activities that require wakefulness. Abilities to maintain arousal are compromised under low dopamine conditions such as Parkinson's disease, but the extent to which A_{2A} receptors in the basal ganglia contribute to the regulation of sleep and wakefulness is not known. We investigated the role of A_{2A} receptors in the basal ganglia for wakeful consciousness by using powerful tools for site-specific gene manipulations, including conditional A_{2A} receptor knockout mice based on the Cre/lox technology; focal A_{2A} receptor knockdown in rats through the local infection with adeno-associated virus carrying short-hairpin RNA of A_{2A} receptors; and modulation of

neuronal activity through in-vivo stimulation and inhibition with genetically engineered receptor-channel systems, e.g., optical switches, including channelrhodopsin, and designer receptors exclusively activated by a designer drug (DREADD). Our studies have revealed that the arousal effect of caffeine critically depends on A_{2A} receptors on neurons in the shell of the nucleus accumbens and that transient activation of these neurons promotes sleep.

These observations imply that A_{2A} receptors in the nucleus accumbens are key structural elements for the control of sleep and wakefulness. The ventral striatum has the unique capability to integrate behavioral functions and thus, it is an ideal site where sleep and wakefulness are regulated by processes that require consciousness. We believe that motivation may be considered as an important fundamental principle by which sleep and waking are regulated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網・睡眠・局所的 RNA 干渉・マウス・ラット

1. 研究開始当初の背景

睡眠と覚醒は、視床と大脳皮質を活性化する視床下部と脳幹の細胞群のネットワークにより調節される。我々が何故眠るかについては未だ解明されていないが、睡眠が脳の機能回復や覚醒中に生じる機能異常の修正に効果を示すことを示唆する多くの研究結果がある。睡眠は覚醒状態での内在性の睡眠物質の蓄積により誘発されると信じられている。アデノシン (AD) は、このような睡眠物質の有力候補である (Porkka-Heiskanen et al., *Science* 1997, 1265) が、アデノシンの睡眠誘発シグナルの入口や、目覚めている間のシナプスの可塑性に対するアデノシンの効果については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 局所的 RNA 干渉法 (RNAi) を確立してシステム睡眠学に応用する。具体的には、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて目的遺伝子の

short-hairpin RNA を局所的に導入して、ラット脳内の特定部位での目的の遺伝子発現を抑制する。

(2) 高選択性アデノシン A_{2A} 受容体アゴニスト CGS21680 の吻側前脳基底核への投与は、側坐核 (NAc) 殻部の c-fos の発現を上昇させ (Scammell et al., *Neuroscience* 2001)、A_{2A} 受容体ゴニストの NAc 殻部への直接灌流は NREM 睡眠と REM 睡眠を誘発する (Satoh et al., *Eur. J. Neurosci.* 1999)。これらの結果は、NAc 殻部もしくは近傍の A_{2A} 受容体が睡眠を促進することを示唆している。そこで、側坐核の A_{2A} 受容体が睡眠と覚醒の制御の鍵を握る構成要素であるという仮説を立て、その可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) ハーバード大学医学部教授 Clifford Saper 博士との共同研究により、我々は既にコンディショナル KO マウスへの局所的遺伝

子導入のための AAV ベクター微量注入技術を考案した(Lazarus et al., *Nat. Neurosci.* 2007, 1131)。我々は、覚醒状態における基底核での A_{2A} 受容体の役割を調査するために、以下のような 3 種類の部位特異的な遺伝子操作技術を用いた。

- ① Cre/lox 法を用いたコンディショナル A_{2A} 受容体 KO マウス
- ② A_{2A} 受容体の short-hairpin RNA をアデノ随伴ウイルスを用いて局所的に導入した局所的 A_{2A} 受容体発現抑制ラット
- ③ チャネルロドプシンやデザイナードラッグのみで活性化するデザイナー受容体(DREADD)による *in vivo* での刺激と抑制を介した神経活性の調節

(2) 動物の睡眠と覚醒は、脳波 (EEG) と筋電 (EMG) に基づいて判定した。それには EEG と EMG のモニタリング用の有線系の睡眠バイオアッセイシステムを使用し、EEG の高速フーリエ変換に基づくパワースペクトル解析用のソフトウェアを用いて自由行動下の睡眠覚醒を自動的にスコア化した。

4. 研究成果

(1) RNAi を用いて生細胞内で遺伝子の発現や活動量を制御できる。この効果は低分子干渉 RNA (siRNA) と mRNA の相互作用や、mRNA からタンパク質への合成過程を妨げることも含まれる。我々はシステム睡眠学に向けた新技術として、睡眠関連遺伝子に対する short hairpin RNA (shRNA) に AAV を導入して、その発現を抑制する局所的 RNA 干渉法 (fRNAi) を開発した。そして、AAV 感染部位において、様々な“睡眠遺伝子”の発現がそれぞれの shRNA により効率的に抑制されることを証明した(図 1)。定位的な AAV の微小注入は、組織の損傷を最小限に抑え、広範囲の神経への導入を可能とする。現在、大脳基底核においてアデノシン A_{2A} 受容体及びドーパミン D_2 受容体、結節乳頭核において小胞型 ATP 輸送体 (VNUT)、アデノシンデアミナーゼ及びヒスチジンデカルボキシラーゼ、さらに中脳、視床及び前頭皮質の GABA 及びグルタミン酸の小胞型輸送体の局所的遺伝子操作を行っており、睡眠覚醒調節にお

けるその効果を調べている。この局所的ノックアウト法は、複雑な構造を有する脳において、様々な受容体の機能を神経解剖学的に解明する実験に、広範囲に応用可能である。



図 1. AAV を用いた A_{2A} 受容体の局所的 RNA 干渉 (ラット線状体)

(2) 上述の方法を用いて、我々はアデノシン A_{2A} 受容体を対象として、Cre/loxP システムに基づく選択的な遺伝子欠損マウスや、shRNA 搭載 AAV ウイルスの局所的注入による局所的 RNA 干渉法を利用した遺伝子抑制ラットを用いて、側坐核の殻部に存在する A_{2A} 受容体が、カフェインによる覚醒作用に必須であることを見出した。一方、ラット側坐核の核部や大脳基底核などの他の部位から A_{2A} 受容体を局所的に欠失させても、カフェインによる覚醒は影響を受けなかった。この結果は、自発運動や情動行動との関連で語られてきた脳の神経経路 (側坐核の殻部) が活性化されることで、カフェインが覚醒作用を持つことを示している(図 2) (Lazarus, M. et al. *J Neurosci* 31, 10067-10075, 2011)。

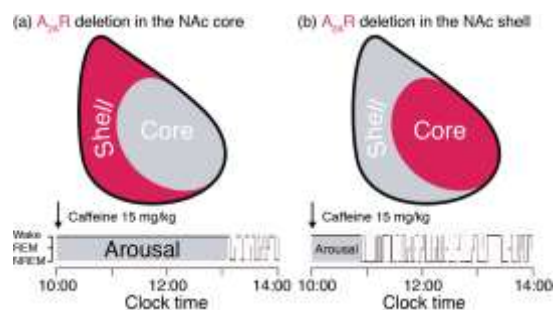


図 2. 側坐核の殻部局所的に A_{2A} 受容体を欠失させたラットでのカフェインの覚醒効果の消失

アデノシン受容体拮抗薬であるカフェインは、興奮や覚醒作用をもつ化合物として広く用いられている。カフェインが脳の A_{2A} 受容体を阻害することで覚醒を促進することは、数年前に我々が世界に先駆けて証明したが (Huang ZL et al., *Nat Neurosci* 8, 858-859, 2005)、カフェインが覚醒作用を及ぼす神経細胞は未だ同定されていなかった。従って、この研究成果は、新たな睡眠中枢が前脳基底部に存在することを示唆する画期的な発見である (図3)。



図3. 側坐核の殻部に存在する A_{2A} 受容体発現神経細胞によるカフェインの覚醒効果の制御

我々は、ハーバード大学医学部の Clifford Saper 博士と Patrick Fuller 博士との密接な共同研究により、in vivo で可逆的かつ細胞種特異的な刺激および抑制を可能にする手技を確立した (Lazarus M, Fuller P, Saper CB, *Sleep Biol Rhythms* 78, 2011)。最近開発したシステムでは、IVM-チャンネル-FLEXシステムに似た三大 GPCR シグナル経路 (G_i , G_s , G_q) 全てを介した神経細胞活性の選択的かつ遠隔的な操作 (遺伝子の活性化と停止) を可能にした。デザイナー受容体 (DREADDs) は、デザイナードラッグのみで活性化し、内在的なリガンドには反応しない GPCR 変異体である。

遺伝子改変光学的スイッチ (例えば、光チャンネルロドプシン) や、DREADD による神経の活性化を用いて、覚醒状態での基底核における A_{2A} 受容体の役割を調査した。チャンネルロドプシン受容体 (ChR2) と DREADD 受容体は、逆方向に挿入してあるので、導入遺伝子が Cre-リコンビナーゼに曝露されてセンス方向に遺伝子をはじきだされるまでナンセンス転写産物が生産される。これらのシステ

ムを A_{2A} 受容体プロモーターの下流に Cre が発現する Cre-リコンビナーゼトランスジェニックマウスに応用することで、側坐核の神経の遺伝子発現の in vivo で選択的かつ可逆的な停止が可能となった。これにより、側坐核の一過性の神経の活性化が、睡眠を誘発することを明らかにできた (図4)。

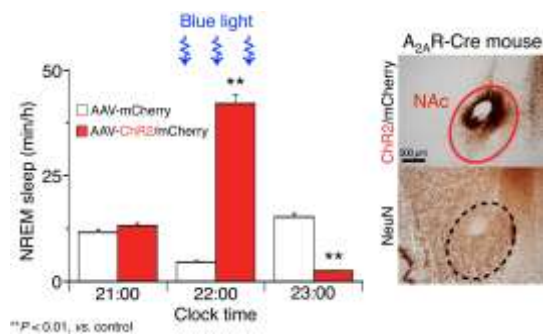


図4. AAVを介したチャンネルロドプシン (ChR2) の強制発現を行ったNAcでの A_{2A} 受容体神経の光遺伝的刺激による睡眠量の上昇

これらの結果は、側坐核の A_{2A} 受容体が睡眠と覚醒を制御の鍵を握る構成要素であることを意味する。腹側線条体は行動機能を統合する能力を持つので、意識により制御される睡眠覚醒の調節において重要な領域である。我々は、動機づけが睡眠と覚醒を制御する重要な基本原理であると考えている。

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8件)

- ① Oda A, Kaneko K, Mizushige T, Lazarus M, Urade Y, Ohinata K. Characterization of ovalin, an orally active tryptic peptide released from ovalbumin with anxiolytic-like activity. *Journal of Neurochemistry*, 査読有、2012, in press, DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07777.x
- ② Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T, Narumiya S, Urade Y, Ohinata K. Orally administered rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocalin-type prostaglandin (PG) D synthase in mice.

- Molecular Nutrition and Food Research*, 査読有、2012, 56巻、in press
- ③ Wolburg H, Mogk S, Acker S, Frey C, Meinert M, Schönfeld C, Lazarus M, Urade Y, Kubata BK, Duszenko M. Late Stage Infection in Sleeping Sickness. *PLoS ONE*, 査読有、2012, 7巻、e34304、DOI: 10.1371/journal.pone.00343041
- ④ Lazarus M, Shen HY, Cherasse Y, Qu WM, Huang ZL, Bass C, Winsky-Sommerer R, Semba K, Fredholm B, Boison D, Hayaishi O, Urade Y, Chen JF. Arousal effect of caffeine depends on adenosine A_{2A} receptors in the shell of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 査読有、2011, 31巻、10067–10075、DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6730-10.2011
- ⑤ Lazarus M, Saper CB, Fuller PM. Genetic dissection of neural circuitry regulating behavioral state using conditional transgenics. *Sleep and Biological Rhythms*, 査読有、2011, 9巻、1479-8425、DOI: 110.1111/j.1479-8425.2010.00469.x
- ⑥ Gautron L, Lazarus M, Scott MM, Saper CB, Elmqvist JK. Identifying the efferent projections of leptin-responsive neurons in the dorsomedial hypothalamus using a novel conditional tracing approach. *Journal of Comparative Neurology*, 査読有、2010, 518巻、2090-2108、DOI: 10.1002/cne.22323
- ⑦ Vardeh D, Wang D, Costigan M, Lazarus M, Saper CB, Woolf CJ, FitzGerald GA, Samad TA. COX-2 expressed in central neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity. *Journal of Clinical Investigation*, 査読有、2009, 119巻、287–294、DOI: 10.1172/JCI37098
- ⑧ Yoshida K, Li X, Cano G, Lazarus M, Saper CB. Parallel preoptic pathways for the inhibition of hyperthermia. *Journal of Neuroscience*, 査読有、2009, 29巻、11954–11964、DOI: 10.1523/JNeurosci.2643-09.2009
- [学会発表] (計9件)
- ① Lazarus M. Role of the A_{2A} receptors in the nucleus accumbens in sleep-wake regulation. SLEEP 2012 - 26th Annual Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, LLC (APSS), 平成22年6月9-13日、ボストン、米国、招待講演
- ② (2) Lazarus M, Kaushik MK, Moriyama T, Qu WM, Aritake K, Rahman MA, Huang ZL, Urade Y, Hayaishi O. The role of prostaglandin D₂ in causing post-ictal sleep following seizures. Neuroscience 2010 [41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience], 平成22年11月12-16日、ワシントン、米国
- ③ Lazarus M, Urade Y, Hayaishi O. The role of adenosine A_{2A} receptors in the nucleus accumbens for sleep-wake regulation. WORLDSLEEP2011 - 6th Quadrennial Congress of the World Sleep Federation, 平成23年10月16日-10月20日、京都、招待講演
- ④ Lazarus M, Urade Y, Hayaishi O. The role of the nucleus accumbens in the regulation of behavioral arousal. 21st World Congress on Psychosomatic Medicine, 平成23年8月25日-8月28日、ソウル、韓国、招待講演
- ⑤ Lazarus M. The role of adenosine A_{2A} receptors in the nucleus accumbens for sleep-wake regulation. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 平成23年7月14日-7月18日、フィレンツェ、イタリア、招待講演
- ⑥ Lazarus M, Hiasa M, Ko Mitamura E, Cherasse Y, Moriyama Y, Urade Y, Hayaishi O. Immunohistochemical localization of the vesicular ATP transporter (VNUT) in the rat central nervous system and its role in sleep-wake regulation. Neuroscience 2010 [40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience], 平成22年11月13-17日、サンディエゴ、米国
- ⑦ Lazarus M, Urade Y, Hayaishi O. The role of extracellular adenosine in the basal ganglia for sleep-wake regulation. 6th Congress of the Chinese Sleep Research Society, 平成22年10月27日-11月1日、成都、中国、招待講演
- ⑧ Lazarus M, Urade Y, Hayaishi O. The role of extracellular adenosine in the basal ganglia for sleep-wake regulation. Neuro2010 [第33回日本神経科学大会], 平成22年9月2-4日、神戸、招待講演
- ⑨ Lazarus M. Dissection of adenosine-responsive sleep circuits by using adeno-associated viral (AAV) vectors for focal RNA interference. 第6回アジア睡眠学会(ASRS), 平成21年10月24-27日、大阪、招待講演

[その他]

ホームページ等

<http://www.obi-dept2.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

ラザルス ミハエル (Lazarus Michael)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生
物学部門・研究員

研究者番号：80469650

(2)研究分担者

大石 陽 (Oishi Yo)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生
物学部門・研究員

研究者番号：10321704

(H22→H23：連携研究者)

松本 直実 (Matsumoto Naomi)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生
物学部門・研究員

研究者番号：60450243

(H23：連携研究者)

(3)連携研究者

早石 修 (Hayaishi Osamu)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生
物学部門・教授

研究者番号：40025507

裏出 良博 (Urade Yoshihiro)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生
物学部門・研究部長

研究者番号：10201360

黄 志力 (Huang Zhi-Li)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生

物学部門・研究副部長

研究者番号：10321704

シェラス ヨアン (Cherasse Yoan)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生
物学部門・研究員

研究者番号：60544319

ミタムラ コ エリザベス (Mitamura Ko
Elizabeth)

大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生
物学部門・研究員

研究者番号：20450249