

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700401

研究課題名（和文）ナルコレプシーにおけるモノアミン・コリン作動性神経の変化と可塑性の検討

研究課題名（英文）Analysis plasticity of monoaminergic and cholinergic neurons in narcoleptic mice.

研究代表者

辻野 なつ子 (TSUJINO NATSUKO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40432166

研究成果の概要（和文）：ナルコレプシーモデルマウスにおけるモノアミンおよびコリン作動性神経の電気生理学的解析を行った。青斑核ノルアドレナリン作動性神経はナルコレプシーマウスにおいて覚醒および徐波睡眠時に有意に発火頻度が高かった。スライスパッチクランプによる解析ではノルアドレナリン神経への抑制性入力が増加していた。一方、免疫組織学的解析ではナルコレプシーマウスと野生型マウスのノルアドレナリン神経への興奮性および抑制性シナプスの密度に変化はなかった。

研究成果の概要（英文）：I examined monoaminergic neuronal activities of narcoleptic mice (orexin neuron deficiency mice). Firing frequency of Locus ceruleus noradrenergic neuron was increased in narcoleptic mice by in vivo extracellular recording during wakefulness and slow wave sleep. In vitro patch clamp recording, IPSC of noradrenergic neuron was reduced in narcoleptic mice. This reduction might be results the increasing of firing frequency of noradrenergic neuron in narcoleptic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経疾患の病態と治療、神経ペプチド、睡眠障害

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患により、特定の神経機能が失われた場合、その投射先の神経活動に何らかの影響を与えることは必至であり、それによる投射先の神経活動の変化が病態発現を修飾する可能性がある。ナルコレプシーは睡眠障害を主徴とする神経疾患であり、脳の視床下部外側野に存在するオレキシン神経の機能不全が原因であることが分かっている。オレキシン神経はモノアミンおよびコ

リン作動性神経に投射し、睡眠覚醒の調節を行っているが、オレキシン神経が欠損したナルコレプシーの脳内でこれらのオレキシン神経の投射先の神経活動が変化しているかは明らかになっていない。報告者はこれまでに、ナルコレプシーのモデル動物である、オレキシン神経が生後脱落するナルコレプシーモデルマウス (orexin-ataxin3マウス) のマウス個体を用いた in vivo 解析で、モノアミン神経の発火頻度が野生型と異なる

現象を発見している。モノアミン神経は睡眠覚醒調節に重要な神経であり、この神経活動の変化がナルコレプシーの病態に関与している可能性が考えられる。本研究ではこれを発展させ、モノアミンおよびコリン作動性神経について注目し、オレキシン神経の脱落が引き起こす神経活動の変化のメカニズムを *in vitro* で詳細に検討する。

2. 研究の目的

ナルコレプシーはオレキシン神経系の機能不全が原因であることが分かっているため、ナルコレプシーでは、オレキシン神経の投射先の神経活動が変化している可能性が考えられる。報告者はこれまでに生体内でモノアミン神経の発火頻度に変化があることを見いだしている。しかしながら投射先の神経細胞活動の詳細な変化は明らかになっていない。オレキシン神経の投射先の神経活動の変化が、ナルコレプシーの病態を修飾している可能性は十分考えられるため、オレキシン神経脱落マウスの、睡眠調節領域の神経活動を解析することは、睡眠覚醒調節の解明だけでなく、ナルコレプシーの病態解明にも重要と考えられる。以上より、本研究では、ナルコレプシーにおけるオレキシン神経投射先の神経活動の変化を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

orexin-ataxin3 マウスとモノアミンおよびコリン作動性神経に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現したマウスをかけ合わせ、ダブルトランスジェニックマウスを作成した。作成したマウス脳スライス標本を製作し、orexin-ataxin3 マウスにおけるモノアミンおよびコリン作動性神経の活動をパッチクランプ法を用いて記録し、神経活動に野生型と違いがあるかどうか検討した。神経の電気生理学的な性質 (静止膜電位、発火頻度) および、モノアミン神経への入力に変化があるかどうかについて興奮性シナプス後電流および抑制性シナプス後電流について検討した。さらにオレキシンやグルタミン酸を投与した場合の反応について、オレキシン神経欠損マウスと対照群との間に反応性に違いがあるか検討した。以上によりオレキシンシグナルの欠如が神経活動に変化を起こす機序を明らかにした。

4. 研究成果

ノルアドレナリン作動性神経はチロシンキナーゼ発現細胞に GFP を発現するマウスと orexin-ataxin3 マウスのダブルトランスジェニックマウスを作成し、オレキシン神経欠損かつノルアドレナリン神経が蛍光顕微鏡下で GFP により同定できるマウスを得

ることができた。ホールセルパッチクランプ法を用いて解析を行った。ノルアドレナリン作動性神経の基本的な性質 (静止膜電位、膜容量) は、野生型および orexin-ataxin3 で有意な差はなかった。また、ノルアドレナリン神経のオレキシン、グルタミン酸、GABA への反応性も野生型と有意な差はなかった。一方、ノルアドレナリン作動性神経への興奮性入力および抑制性入力を解析したところ、興奮性入力には頻度および大きさとも変化がなかったが、抑制性入力の頻度が有意に減少していることが明らかになった。抑制性入力の大きさには変化がなかった。このことから、抑制性入力の前シナプスに機能的もしくは構造的な変化が起こり、この変化がノルアドレナリン神経の発火頻度の上昇に関与している可能性が考えられた。一方、免疫組織学的に興奮性入力と抑制性入力のシナプスを観察した結果、野生型および orexin-ataxin3 マウスとのシナプスの密度に有意な差は見られなかった。以上から、オレキシン神経が脱落すると、青斑核ノルアドレナリン神経への抑制性入力に機能的な変化が起こり、抑制性入力が増加していることが考えられた。この増加が生体内でのノルアドレナリンの発火頻度上昇に関与し、さらには、ナルコレプシーの病態を修飾している可能性が示唆された。コリン作動性神経については、電気生理学的解析のため、コリンアセチルトランスフェラーゼ GFP マウスを作成したが、GFP の発現が弱く、解析が困難のため、GFP を強く発現するマウスを作成した。

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 7 件)

- (1) Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T. Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. PLoS One 2011 6(5). 査読有
- (2) Nagata-Kuroiwa R, Furutani N, Hara J, Hondo M, Ishii M, Abe T, Mieda M, Tsujino N, Motoike T, Yanagawa Y, Kuwaki T, Yamamoto M, Yanagisawa M, Sakurai T. Critical role of neuropeptides b/w receptor 1 signaling in social behavior and fear memory. PLoS One 2011 Feb 24; 6(2):e16972. 査読有

- (3) Tsujino N, Nakada T, Tsubouchi K, Kobayashi M, Kawai Y, Yano S, Matsunaga T, Hirose M, Ohmori S, Ohhashi T, Yamada M. Thrombin activates Ca²⁺-permeating nonselective cation channels through protein kinase C in human umbilical vein endothelial cells. *Shinshu Medical Journal* 2011 Feb; 59 (1):13-26 査読有
- (4) Hirose M, Yano S, Nakada T, Horiuchi-Hirose M, Tsujino N, Yamada M. Nicorandil ameliorates impulse conduction disturbances during ischemia in isolated arterially perfused canine atria. *International Journal of Cardiology* 2011 Jan 7;146(1):37-43 査読有
- (5) Furutani N, Hondo M, Tsujino N, Sakurai T. Activation of Bombesin Receptor Subtype-3 Influences Activity of Orexin Neurons by Both Direct and Indirect Pathways. *Journal of Molecular Neuroscience* 2010 Sep;42(1):106-11 査読有
- (6) Sakurai, T., Mieda, M., Tsujino N. The orexin system: Roles in sleep/wake regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1200:149-161 査読有
- (7) Tsujino N, Sakurai T. Orexin/Hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacological Reviews* 2009 Jun;61(2):162-76. 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
- (1) 辻野なつ子, 常松友美, 山中章弘, 渡辺雅彦, 小山純正, 桜井武
Chronic functional alterations of locus ceruleus noradrenergic neurons in orexin neuron-ablated narcoleptic mice
第 89 回日本生理学会大会 2012 年 3 月 31 日 信州大学 (長野県)
- (2) 辻野なつ子, 常松友美, 山中章弘, 小山純正, 桜井武
Chronic functional alterations of locus ceruleus noradrenergic neurons in orexin neuron-ablated narcoleptic mice.
Worldsleep 2011 2011 年 10 月 19 日 京都国際会館 (京都府)
- (3) 辻野なつ子, 常松友美, 山中章弘, 小山純正, 桜井武
Alterations in noradrenergic neurons in orexin neuron-deficient mice.
第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 15 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (4) 辻野なつ子, 齊藤夕貴, 本堂茉莉, 三枝理博, 桜井武
Functional and histological interaction between preoptic area GABAergic neurons and orexin neurons.
第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 学会誌上開催
- (5) 辻野なつ子, 常松友美, 山中章弘, 小山純正, 桜井武
Alterations in noradrenergic neurons in orexin neuron-ablated mice.
第 87 回日本生理学会 2010 年 5 月 19 日 岩手市民文化ホール (岩手県)
- (6) 辻野なつ子, 古谷直生, 本堂茉莉, 桜井武
Regulation of orexin neurons by bombesin receptor subtype 3.
Official Satellite Symposium of the 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) :Obesity and Metabolic Syndrome 2010 年 3 月 30 日 京都大学 芝蘭会館 (京都府)
- (7) 辻野なつ子, 常松友美, 山中章弘, 小山純正, 桜井武
オレキシン神経欠損マウスでのノルアドレナリン作動性神経活動の解析
第 56 回中部日本生理学会 2009 年 12 月 4 日 音楽堂 (石川県)
- (8) 辻野なつ子, 常松友美, 小山純正, 山中章弘, 桜井武
Alterations in noradrenergic neurons in the narcoleptic mice.
第 9 回 VIP/PACAP 関連ペプチド国際シ

ンポジウム
サテライトシンポジウム 2009年10月2
日 いわさきホテル (鹿児島県)

- (9) 辻野なつ子、常松友美、山中章弘、小
山純正、桜井武
オレキシン神経欠損マウスにおけるモ
ノアミン神経活動の変化
第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9
月 18 日 国際会議場 (愛知県)
- (10) 辻野なつ子、常松友美、山中章弘、
小山純正、桜井武
Alterations in monoaminergic neurons
in orexin neuron-ablated mice.
第36回 国際生理学会世界大会 2009
年 8 月 1 日 国際会館 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻野 なつ子 (TSUJINO NATSUKO)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：40432166

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし