

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500412

研究課題名(和文)オレキシンニューロンへの侵害性入力を実験形態学的に視る

研究課題名(英文) Morphological analysis of the nociceptive inputs to orexin-containing neurons in the hypothalamus

研究代表者

安井 幸彦 (Yasui, Yukihiro)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30174501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)視床下部のオレキシン(ORX)ニューロン分布域に投射する外側結合腕傍核(IPBN)ニューロンが侵害刺激によって活性化されること、2)上記分布域に投射するIPBNニューロンが、脊髄後角や三叉神経脊髄路核(Vsp)尾側亜核から投射を受けること、および3)IPBNに投射する脊髄後角やVsp尾側亜核のニューロンはグルタミン酸作動性であることを明らかにした。

脊髄後角やVsp尾側亜核からIPBNを介して視床下部ORXニューロンに至る興奮性の連絡路が存在し、この経路によって運ばれた痛覚情報により、ORXニューロンが活性化され、覚醒反応を引き起こすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have analyzed the nociceptive inputs to orexin-containing neurons (ORX neurons) in the hypothalamus. The results were as follows: 1)lateral parabrachial (IPBN) neurons that sent projection fibers to the ORX neurons-containing hypothalamic area were activated by nociceptive inputs; 2) these IPBN neurons received projection fibers from the dorsal horn of the spinal cord as well as from the caudal subnucleus of the spinal trigeminal nucleus (Vsp); 3) IPBN-projecting neurons in the dorsal horn and caudal subnucleus of the Vsp were glutamatergic.

These data suggest that nociceptive inputs activate hypothalamic ORX neurons through the pathways from the dorsal horn and the caudal subnucleus of the Vsp to these neurons via the IPBN, resulting in producing arousal response.

研究分野：神経解剖学

キーワード：オレキシン 視床下部 結合腕傍核 脊髄後角 三叉神経脊髄路核 覚醒反応

## 1. 研究開始当初の背景

近年、筆者は摂食行動の制御に関わる神経機構を解明するために、オレキシン (ORX) を産生するニューロンへの扁桃体や脳幹からの入力様式について解析してきた。その過程において、痛み刺激によって覚醒反応が起こることから、覚醒・睡眠の制御にも関与することがよく知られている ORX ニューロンへの侵害性入力が存在するのではないかという考えに至った。そして、その入力源や入力様式 (シナプス構築や伝達物質など) についてほとんど分かっていないことを知った。そこで本研究では、ORX ニューロンへの侵害性入力の存在様式を実験形態学的に明らかにすることを計画した。

ORX 産生ニューロンは視床下部脳弓周囲領域から外側領域にかけて多数存在し、食欲や報酬系に関わるほか、覚醒や睡眠の制御にも関わることが明らかになっている。また、ORX を産生するニューロンが消滅するとナルコレプシーという睡眠障害を引き起こされることもよく知られている。一方、侵害性入力が視床下部へ至る経路として、脊髄後角や三叉神経脊髄路核 (Vsp) 尾側亜核から外側結合腕傍核 (IPBN) を介する投射路の存在が知られており、侵害性刺激によって上述の視床下部領域に Fos 蛋白陽性ニューロンが多数現れることも報告されている。しかし、覚醒・睡眠に関与する ORX ニューロンへの入力系に関する報告はまだ極めて少なく、ほとんどないのが現状であり、痛み刺激による覚醒反応の神経基盤の一つとして、ORX ニューロンへの侵害性入力に注目したものは本研究が初めてである。

## 2. 研究の目的

本研究では、痛み刺激による覚醒反応の神経機構を形態学的立場から明らかにすることを目的とし、視床下部 ORX ニューロンへの侵害性入力の存在様式を、神経解剖学的な

らびに神経化学的に分析した。脊髄後角や Vsp 尾側亜核から IPBN を介して視床下部に達する投射路が、ORX ニューロンの侵害性入力による活性化に働き、覚醒反応を生じることを明らかにすることによって、目的を達成したい。なお、ニューロン連絡の解析は標識物質の軸索輸送を利用した神経路標識法や痛覚刺激による Fos 蛋白発現という機能的標識法などを駆使して、顕微鏡レベルと電顕レベルで行われた。

## 3. 研究の方法

(1) ORX ニューロン分布域に投射する IPBN ニューロンの痛覚刺激による活性化の解析

1) ラットの視床下部 ORX ニューロン分布領域にコレラトキシン B サブユニット (CTb) を電気泳動的に注入し、1週間後にホルマリンを前肢足底部あるいは上唇と下唇に注入し、2時間後に灌流固定した。

2) 抗 Fos 抗体を用いて、免疫組織化学により、Fos 陽性ニューロンを検出した後、抗 CTb 抗体を用いて、CTb 標識ニューロンを検出した。

4) Fos 陽性ニューロンと CTb 標識ニューロンとの異同を、IPBN にて解析した。

(2) 脊髄後角あるいは Vsp 尾側亜核からの投射線維が、シナプス小胞の構成蛋白であるシナプトフィジンに陽性を示し、視床下部オレキシンニューロン分布域に投射する結合腕傍核ニューロンと接合することの証明

1) ラットの視床下部 ORX ニューロン分布領域に CTb を、脊髄後角あるいは Vsp 尾側亜核に BDA を、それぞれ電気泳動的に注入し、1週間後に灌流固定した。

2) CTb とシナプトフィジンを免疫組織化学的に、ピオチン化デキストランアミン (BDA) を組織化学的に検出した。

3) IPBN にて、シナプトフィジン陽性を示す BDA 標識終末が CTb 標識ニューロンと

接合するかどうかを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検索した。

(3) ORX ニューロン分布域に投射する IPBN ニューロンと、脊髄後角および Vsp 尾側亜核線維とのシナプス構築解析

1) ORX ニューロンと IPBN および Vsp 尾側亜核線維の分布の一致が見られた視床下部領域に CTb を、脊髄後角あるいは Vsp 尾側亜核に BDA を注入し、1週間後に灌流固定した。

2) BDA 標識終末をアビジン-ビオチン複合体で検出後、CTb 標識ニューロンを免疫組織化学的に検出した。

3) IPBN にて、BDA 標識終末と CTb 標識ニューロンの分布が一致する領域を電顕用試料とし、これらの中で形成されるシナプス構築を解析した。

(4) ORX ニューロンへの入力路における脊髄後角および Vsp 尾側亜核ニューロンの伝達物質がグルタミン酸であることの確定

1) IPBN に CTb を注入し、1週間後に灌流固定した。

2) グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT2) mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検出し、Alexa-546 (赤色) で蛍光標識した後、CTb を免疫組織化学的に検出し、Alexa-488 (緑色) で蛍光標識した。

3) 試料を共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、CTb 標識ニューロンが VGLUT2 mRNA 陽性を示すかどうかを、脊髄後角や Vsp 尾側亜核にて検索した。

#### 4. 研究成果

(1) 前肢足底部へのホルマリン注入例では IPBN に多数の、内側結合腕傍核に中等度の Fos 蛋白陽性ニューロンが、IPBN に多数の、内側結合腕傍核に少数の CTb 陽性ニューロンが認められた。そして、Fos 蛋白と CTb によって二重標識されたニューロンが IPBN の吻尾にわたって、対照群 (ホルマリンの代わ

りに生理食塩水を注入) よりも明らかに多く認められた。上唇と下唇へのホルマリン注入例では、Fos 蛋白陽性ニューロンおよび二重標識されたニューロンの数は前肢足底部例に比べてやや少なかったが、ほぼ同様の分布様態を示した。

(2) 脊髄後角あるいは Vsp 尾側亜核からの投射線維がシナプトフィジン陽性であり、視床下部 ORX ニューロン分布域に投射する結合腕傍核ニューロンの細胞体や樹状突起と接合することを、共焦点レーザー顕微鏡下で明らかにした。

(3) 視床下部 ORX ニューロン分布域に投射する IPBN ニューロンと、脊髄後角あるいは Vsp 尾側亜核からの投射線維とのシナプス構築に関する解析を行い、これらのニューロンと投射線維との間に非対称性のシナプスが形成されていることを証明した。

(4) 上記の脊髄後角あるいは Vsp 尾側亜核からの投射線維が VGLUT2 mRNA 陽性であることを、すなわちグルタミン酸作動性であることを、蛍光顕微鏡下で観察した。

視床下部 ORX ニューロン分布域に投射する IPBN ニューロンがグルタミン酸作動性であることは既に報告している。この結果と今回の結果を合わせて考えると、脊髄後角あるいは Vsp 尾側亜核から IPBN を介して視床下部 ORX ニューロンに至るグルタミン酸作動性の連絡路が存在し、この連絡路によって運ばれる侵害性情報によって ORX ニューロンが活性化され、覚醒反応を引き起こすことが示唆された。

#### 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. Y. Yasui

Control pathways from the subcortical

limbic structures to the trigeminal motor system in the lower brainstem: a hodological review. *Neuroscience & Medicine*, 査読有, Vol.6, No.1, 2015, pp.24-34

2. 安井幸彦

扁桃体と顎顔面運動

*Clinical Neuroscience*, 査読無, Vol.32, No.6, 2014, pp.652-655

3. 安井幸彦

皮質下辺縁系による運動制御回路

*島根医学*, 査読無, Vol.34, No.1, 2014, pp.1-9

4. N. Koshiya, Y. Oku, S. Yokota, Y. Oyamada, Y. Yasui, Y. Okada

Anatomical and functional pathways of rhythmogenic inspiratory premotor information flow originating in the preBötzing complex in the rat medulla  
*Neuroscience*, 査読有, Vol.268, No.1, 2014, pp.194-211

5. T. Tsumori, T. Oka, S. Yokota, J.G. Niu, Y. Yasui

Intrapancreatic ganglia neurons receive projection fibers from melanocortin-4 receptor-expressing neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve of the mouse.

*Brain Research*, 査読有, Vol.1537, No.1, 2013, pp.132-142

6. T. Oka, S. Yokota, T. Tsumori, J.G. Niu, Y. Yasui

Glutamatergic neurons in the lateral periaqueductal gray innervate neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventrolateral medulla of the rat.  
*Neuroscience Research*, 査読有, Vol.74, No.1, 2012, pp.106-115

7. J.G. Niu, S. Yokota, T. Tsumori, T. Oka, Y. Yasui

Projections from the anterior basomedial and anterior cortical amygdaloid nuclei to melanin-concentrating hormone-containing neurons in the lateral hypothalamus of the rat.

*Brain Research*, 査読有, Vol.1479, No.1, 2012, pp.31-43

[学会発表](計 16 件)

1. 横田茂文, S. Kaur, V.G. Vanderhorst, C.B. Saper B, 岡 達郎, 安井幸彦, N.L. Chamberlin

高炭酸ガス負荷によって活性化する結合腕傍核から横隔神経核への連絡路

第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、神戸国際会議場(神戸)、2015年3月21-23日

2. 横田茂文, S. Kaur, V.G. Vanderhorst, C.B. Saper, 安井幸彦, N.L. Chamberlin

高炭酸ガス負荷による呼吸促進路を遺伝子改変マウスを用いて機能形態学的に解析する

日本解剖学会第69回中国・四国支部学術集会、広島大学広仁会館(広島)、2014年10月25、26日

3. 岡田泰昌, 越久仁敬, 横田茂文, 小山田吉孝, 安井幸彦, 越谷直弘

Functional anatomy of the rhythmogenic inspiratory premotor information pathway from the preBötzing complex.

第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜(横浜)、2014年9月11-13日

4. 横田茂文, 岡 達郎, 浅野裕彦, 安井幸彦

Orexinergic fibers are in contact with Kölliker-Fuse neurons projecting to the ventrolateral medulla and phrenic and hypoglossal nuclei in the rat.

第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、(横浜)、2014年9月11-13日

5 . 岡 達郎、横田茂文、浅野裕彦、安井幸彦

Lateral periaqueductal gray neurons innervate cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus of the rat.

第 3 7 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜, (横浜), 2014 年 9 月 11-13 日

6 . 津森登志子、岡 達郎、横田茂文、安井幸彦

Melanocortin-4 receptor expressing neurons in the geniculate and petrosal ganglia send their fibers to the tongue taste bud cells.

第 1 1 9 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (下野市), 2014 年 3 月 27-29 日

7 . 岡 達郎、横田茂文、浅野裕彦、安井幸彦

Lateral periaqueductal gray neurons innervate cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus of the rat.

第 1 1 9 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (下野), 2014 年 3 月 27-29 日

8 . 横田茂文、岡 達郎、浅野裕彦、安井幸彦

Orexinergic inputs to Kölliker-Fuse neurons projecting to the ventrolateral medulla and phrenic and hypoglossal nuclei in the rat.

第 1 1 9 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学、下野市, 2014 年 3 月 27-29 日

9 . 岡 達郎、横田茂文、浅野裕彦、安井幸彦

ラット中心灰白質外側部から脚橋被蓋核コリン作動性ニューロンへの投射

日本解剖学会第 6 8 回中国・四国支部学術集会、鳥取大学医学部 (米子), 2013 年 10 月 19、20 日

1 0 . 横田茂文, S. Kaur, V.G. Vanderhorst, C.B. Saper, 安井幸彦, N.L. Chamberlin

結合腕傍核へ投射する孤束核ニューロンは高炭酸ガス負荷によって活性化される

第 3 6 回日本神経科学大会、京都国際会館、(京都), 2013 年 6 月 20-23 日

1 1 . 津森登志子、岡 達郎、横田茂文、安井幸彦

マウス舌の味蕾は膝神経節および錐体神経節に存在するメラノコルチン 4 受容体発現ニューロンの神経終末を受ける

第 3 6 回日本神経科学大会、京都国際会館、(京都), 2013 年 6 月 20-23 日

1 2 . 津森登志子、岡 達郎、横田茂文、安井幸彦

Pancreatic islets cells receive axon terminals from melanocortin-4 receptor-expressing nodose ganglion cells in the mouse.

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, かがわ国際会議場(高松), 2013 年 3 月 28-30 日

1 3 . 横田茂文, S. Kaur, V.G. Vanderhorst, C.B. Saper, 安井幸彦, N.L. Chamberlin

Hypercapnia-activated neurons in the nucleus of the solitary tract project to the parabrachial nucleus in the mouse.

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, かがわ国際会議場(高松), 2013 年 3 月 28-30 日

1 4 . 横田茂文, S. Kaur, V.G. Vanderhorst, C.B. Saper, 安井幸彦, N.L. Chamberlin

高炭酸ガス負荷によって活性化されるマウス結合腕傍核ニューロンの呼吸関連領域への投射.

日本解剖学会第 67 回中国・四国支部学術集会, 山口大学医学部 (宇部), 2012 年 10 月 20-21 日

1 5 . 津森登志子、岡 達郎、横田茂文、安井幸彦

Axon terminals originating from melanocortin-4 receptor-expressing nodose ganglion cells form synapses with pancreatic endocrine cells in the mouse.

第 35 回日本神経科学大会，名古屋国際会議場（名古屋），2012 年 9 月 18-21 日

16. 横田茂文, S. Kaur, V.G. Vanderhorst, C.B. Saper, 安井幸彦, N.L. Chamberlin  
Mouse parabrachial neurons projecting to the rostral ventral respiratory group, phrenic and hypoglossal motor nuclei are activated by hypercapnia.

第 35 回日本神経科学大会，名古屋国際会議場（名古屋），2012 年 9 月 18-21 日

〔図書〕(計 3 件)

1. 安井幸彦

(分担訳) 第 9 章 化学感覚：味覚と嗅覚.  
金子武嗣、野村 巖監訳、マーティン神経解剖学、西村書店、新潟、2015、pp. 168-184

1. 安井幸彦

骨格(骨学総論、骨学各論). 野村 巖編：  
標準理学療法学・作業療法学〔専門基礎分野〕  
解剖学 第 4 版、医学書院、東京、2015、pp.  
105-160

2. 安井幸彦

神経系(神経系総論、中枢神経系). 野村  
巖編：標準理学療法学・作業療法学〔専門基礎  
分野〕解剖学 第 4 版、医学書院、東京、  
2015、pp. 309-353

6. 研究組織

(1)研究代表者

安井 幸彦 (YASUI YUKIHIKO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30174501

(2)研究分担者

津森 登志子 (TSUMORI TOSHIKO)

県立広島大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：30217377

横田 茂文 (YOKOTA SHIGEFUMI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50294369

岡 達朗 (OKA TATSURO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：20508923