

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860157

研究課題名(和文)薬理遺伝学的手法を用いたオレキシン神経の投射経路別機能の解明

研究課題名(英文)Pharmacogenetic analysis of orexin neuronal projections

研究代表者

犬束 歩 (Inutsuka, Ayumu)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30584776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：orexin-CreマウスとCre依存的に遺伝子発現がスイッチするAAVベクターとの組み合わせにより、オレキシン神経の薬理遺伝学的な活動操作に成功した。また、ジフテリア毒素A断片を用いたオレキシン神経選択的な細胞脱落を達成した。代謝ケージを用いてこうしたマウスを長期間にわたって包括的解析することで、オレキシン神経による睡眠・覚醒、摂食、代謝の同時並行的な調節機構を明らかにした。また、投射経路選択的な遺伝子発現ツールを開発し、オレキシン神経の投射経路選択的な遺伝子発現を行った。

研究成果の概要(英文)：Using orexin-Cre mice and Cre-dependent AAV vectors, we achieved pharmacogenetic activation of orexin neurons. We also achieved selective ablation of orexin neurons using diphtheria toxin fragment A (DTA). Our comprehensive analysis of these transgenic mice revealed a concurrent regulation of sleep/wakefulness, feeding, and metabolism by orexin neurons. In order to manipulate specific orexin neuronal projections, we developed genetic tools for retrograde transport of Cre recombinase.

研究分野：神経生理学

キーワード：DREADD オレキシン神経 視床下部 投射経路

### 1. 研究開始当初の背景

動物が生存にとって最適な行動を選択するためには、いくつもの行動・生理応答を統合的に変化させる必要がある。視床下部外側野に存在するオレキシン神経も、サーカディアンリズムやストレス、体内のエネルギーバランスといった多様な入力を受けてその活動を変化させ、睡眠・覚醒のみならず、摂食・代謝、報酬系などの機能を協調的に調節している。こうした複雑な入出力を統合的に制御している神経回路については、個別の投射経路を特異的に活動制御することで、その正確な動作原理を明らかにすることが期待されている。

申請者は各種遺伝子改変マウスに併せて、局所的な遺伝子導入を可能とするウイルスベクターを用いることで、個別の投射経路を選択的に活動制御することを着想した。神経回路特異的な神経活動操作としては、現在光遺伝学的手法が盛んに用いられている。しかし、この手法の抱える問題点としては神経活動を制御できる時間の短さが挙げられる。数時間から数日間に渡る行動実験の期間内において、標的とする神経回路の活動を操作し続けるために、申請者は合成リガンドによって作動する改変型 GPCR をオレキシン神経特異的に発現させることで、この問題の解決を図りたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、複雑な入出力を持つオレキシン神経の個別の投射経路を選択的に活動操作することにより、その機能分担を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するため、申請者は(1)オレキシン神経特異的な活動操作を達成し、多様な生理応答・行動上の変化を簡便に長期間観察できる実験系を確立すること。(2)特定の投射経路を選択的に遺伝子発現制御できる手法を開発すること。(3)(1)と(2)の手法を組み合わせることで、オレキシン神経の特定の投射経路選択的な活動操作を達成し、その生理機能を明らかにすること、という3つの目標を設定した。

特に(2)については、申請者の先行研究によって、オレキシン神経の細胞集団には投射先の異なる細胞群がモザイク状に混在していることが予想されたため、投射先から投射元への逆行性遺伝子発現制御法の開発に重点をおいた。

### 3. 研究の方法

神経活動の操作方法としては、摂食行動や代謝といった長時間にわたる生理応答を簡便に操作するため、改変型 GPCR (hM3Dq) を用いた薬理遺伝学的手法を適用した。具体的には、オレキシン神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現している *orexin-Cre* マウスの視床下部外側野に、Cre 依存的に hM3Dq-mCherry を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを局所投与した。ヒトムスカリン 3 受容体の改

変体である hM3Dq は、リガンド結合部位に変異を加えることで、本来のリガンドであるアセチルコリンには応答しない一方、合成リガンドである Clozapine-N-oxide (CNO) によって活性化される。また、活動操作が行われた場合には、投射経路に応じた多様な生理応答が観察されることが予想されたため、代謝測定ケージを利用した運動量、摂食量、飲水量、呼吸交換率の同時モニタリングを行った。

また、特定の投射経路選択的に遺伝子発現を制御するため、経シナプス逆行性輸送される Cre リコンビナーゼの開発・機能確認を行った。逆行性感染するウイルスベクターであるレンチウイルスベクター、イヌアデノウイルスベクターを用いた遺伝子発現制御も並行して行った。

### 4. 研究成果

本研究では、まずアデノ随伴ウイルスベクターと遺伝子組換えマウスとを組み合わせ、オレキシン神経特異的な遺伝子発現制御を達成した。免疫染色による確認ではオレキシン神経特異的に hM3Dq-mCherry の発現が確認され、CNO の腹腔内投与によって cFos 発現が上昇することも確認された。脳スライスを用いたパッチクランプでは、CNO 投与による hM3Dq-mCherry 発現細胞の発火頻度上昇が直接的に確認された。代謝ケージ CLAMS を用いた複数項目の同時モニタリングでは、運動量、摂食量、飲水量、呼吸交換率が CNO 投与直後から数時間にわたって同時並行的に上昇している様子が確認された。hM4Di による活動抑制では、こうした変化は観察されなかった。ジフテリア毒素 A 断片を発現させてオレキシン神経を選択的に脱落させた場合には、摂食量、飲水量の低下や体重の増加が観察された。オレキシン神経の選択的脱落によるこうした変化は 85% 程度の細胞が脱落した場合には観察されたが、70% 程度の細胞脱落では観察されなかった。以上の実験結果はオレキシン神経の多様な投射経路による同時並行的な生理応答の調節機構を示している(論文 5)。

申請者は次に、投射経路特異的な遺伝子発現ツールの開発を行った。その第一弾として、テタヌス毒素 C 断片の持つ経シナプス逆行性輸送される特徴を利用した、改変型 Cre リコンビナーゼを作成した(特許 1)。投射経路選択的な遺伝子発現を確認するため、既に投射経路の特異性が良く知られている腹側被蓋野から側坐核へ至る投射経路、および黒質緻密部から線条体へ至る投射経路を機能確認の対象とした。アデノ随伴ウイルスベクターを用いた機能確認では概ね良好な結果が得られたため、次にオレキシン神経から青斑核へ至る投射経路を対象として、実験を行った。その結果、青斑核に投射するオレキシン神経は、視床下部外側野において局在の偏りなく分布していることが示唆された。現在は、逆行性輸送の効率を上げるために各種機能ド

メインを付け加えた第二世代の分子群を開発中である。また、逆行性感染する特徴を持ったイヌアデノウイルスベクターを用いた投射経路選択的な遺伝子発現も平行して進めている。

投射経路選択的な活動操作については、残念ながら生理応答・行動上のロバストな変化を観察するに至っていない。投射経路選択的な遺伝子発現の効率を上げるべく、現在も検討中である。

#### 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 6 件)

Mizoguchi H\*, Katahira K\*, Inutsuka A\*, Fukumoto K, Nakamura A, Wang T, Nagai T, Sato J, Sawada M, Ohira H, Yamanaka A, Yamada K. Insular neural system controls decision-making in healthy and methamphetamine-treated rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jul 21;112(29):E3930-9. \*Equal contribution doi: 10.1073/pnas.1418014112. Epub 2015 Jul 6.

Manita S, Suzuki T, Homma C, Matsumoto T, Odagawa M, Yamada K, Ota K, Matsubara C, Inutsuka A, Sato M, Ohkura M, Yamanaka A, Yanagawa Y, Nakai J, Hayashi Y, Larkum ME, Murayama M. A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception. Neuron. 2015 Jun 3;86(5):1304-16. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.006. Epub 2015 May 21.

Kato HE, Kamiya M, Sugo S, Ito J, Taniguchi R, Orito A, Hirata K, Inutsuka A, Yamanaka A, Maturana AD, Ishitani R, Sudo Y, Hayashi S, Nureki O. Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools. Nat Commun. 2015 May 15;6:7177. doi: 10.1038/ncomms8177.

Nagaoka T, Inutsuka A, Begum K, Bin hafiz Km, Kishi M. Vangl2 regulates E-cadherin in epithelial cells. Sci Rep. 2014 Nov 6;4:6940. doi: 10.1038/srep06940.

Inutsuka A, Inui A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Lazarus M, Yamanaka A. Concurrent and robust regulation of feeding behaviors and metabolism by orexin neurons. Neuropharmacology. 2014 Oct;85:451-60. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.015. Epub 2014 Jun 18.

Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, Tanaka KF, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, Yamanaka A.

Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation.

J Neurosci. 2014 May 14;34(20):6896-909. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5344-13.2014.

##### [学会発表](計 7 件)

犬束歩、山下哲、田口徹、チョドリ・スリカンタ、山中章弘

Correlative activity and physiological role of orexin neurons in nociception

包括型脳科学研究推進支援ネットワーク平成 27 年度冬のシンポジウム

2015.12.18 (東京都・千代田区)

Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, Yamanaka A

The integrative role of orexin neurons in nociception and analgesia

The 12<sup>th</sup> Nikko International Symposium 2015

2015.11.20 (栃木県・下野市)

犬束歩、山下哲、田口徹、チョドリ・スリカンタ、山中章弘

オレキシン神経は痛み刺激に応じて活動し、侵害受容を調節する

第 38 回日本神経科学大会

2015.7.29 (兵庫県・神戸市)

Inutsuka A, Inui A, Tabuchi S, Lazarus M, Yamanaka A

The physiological role of orexin neurons in feeding and metabolism revealed by pharmacogenetics activation and chronic ablation

Neuroscience 2014 Annual Meeting

2014.11.19 (アメリカ合衆国・ワシントン D.C.)

##### 犬束歩

薬理遺伝学的手法を用いたオレキシン神経の機能解析

平成 26 年度生理学研究所研究会 グリア細胞機能から迫る脳機能解明

2014.10.24 (愛知県・岡崎市)

犬束歩、乾あずさ、田淵紗和子、常松友美、ミハエル・ラザルス、山中章弘

オレキシン神経特異的な活動操作・細胞死誘導による、摂食・代謝調節機構の解析

第 61 回中部日本生理学会

2014.11.8 (愛知県・名古屋市)

犬束歩、乾あずさ、田淵紗和子、ミハエル・ラザルス、山中章弘

Pharmacogenetic analysis of concurrent regulation of feeding and metabolism by orexin

neurons

第 37 回日本神経科学大会  
2014.9.13 (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 2 件)

三品昌美 (編集)  
分子脳科学：分子から脳機能と心に迫る  
化学同人 291(171-180)  
2015 年発行

米田悦啓、岡村康司、金井 好克、西田 幸  
二 (編集)  
プログレッシブ生命科学  
南山堂 116-118  
2014 年発行

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)  
名称：投射経路選択的な遺伝子発現制御  
発明者：山中 章弘、犬束 歩  
権利者：同上  
種類：組換え DNA 技術  
番号：P140011095  
出願年月日：平成 26 年 4 月 30 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

犬束 歩 (INUTSUKA Ayumu)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30584776

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

山中 章弘 (YAMANAKA Akihiro)  
名古屋大学・環境医学研究所・教授  
研究者番号：60323292