

オレキシニューロンの小胞体ストレスと生活習慣病

熊本大学大学院 生命科学研究部 薬物活性学分野
香月 博志

1. はじめに

オレキシンは、視床下部に限局する少数の神経細胞集団により産生される神経ペプチドであり、睡眠・覚醒の調節において重要な役割を果たす他、摂食行動や自律神経機能の制御、薬物依存形成への関与など、さまざまな機能を担うことが明らかとなってきている。一方で、生理的老化や種々の神経変性疾患に伴い、オレキシニューロンが他の視床下部ニューロンと比較して選択的に減少することが報告されているが、その機序については明らかになっていない。

オレキシニン-Aは分子内の近接する部位に2箇所のジスルフィド結合を有しており、オレキシンの生合成の過程で生じるペプチドの折りたたみ不全が、オレキシニューロン特異的に小胞体ストレスをもたらす可能性が考えられる。また我々は最近、オレキシニューロンが他の視床下部ニューロンに比べて小胞体ストレスに対して脆弱であることを見出した¹⁾。脳内の小胞体ストレスは、加齢、高脂肪食摂取、睡眠不足などによって増大することが知られており、また睡眠・覚醒の調節機能は加齢や生活習慣病に伴って変調をきたす。したがって、加齢や種々の生活習慣要因が小胞体ストレス増大とオレキシニューロンの変性・機能異常を介して睡眠・覚醒調節異常を招き、これがさらに生活の質の低下と生活習慣病の病態悪化を招く、という図式が考えられる。そこで本研究では、「加齢や生活習慣の乱れなどの要因がオレキシニューロンの変性を招く過程において、一酸化窒素(NO)等の活性窒素種関連分子が共通項として関与する」との仮説を立て、その妥当性について検証した。特に、NOがプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)の不活性化を介してタンパク質・ペプチドの折りたたみ不全を増長するという点に着目し²⁾、NO産生→PDI不活性化→オレキシニューロンにおけるペプチド折りたたみ不全と小胞体ストレスの亢進→オレキシニューロンの変性、という病理形成メカニズムの存在を明らかにすることを目指した。

2. 方法

8～10週齢の雄性C57BL/6マウスをペントバルビタール麻酔下で脳定位固定装置に固定し、第三脳室内にカニューレを挿入してNOC18等の薬物を微量注入した。一部の実験では、PDIの発現阻害を目的として視床下部実質内にPDI siRNAを微量注入した。外科処置後、マウスを麻酔から回復させて一定期間飼育を継続した後に、パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行い、脳を摘出して組織学的検討に供した。視床下部組織について16 μm厚の冠状凍結切片を作成し、蛍光標識二次抗体を用いた免疫組織化学によりオレキシニューロンとメラニン凝集ホルモン(MCH)ニューロンを染色し、病

理組織観察を行った。一群のマウスに対しては、12時間毎の明暗サイクルの明期(8:00~20:00)に軽度のハンドリングを断続的に行うことで断眠負荷をかけ、その直後あるいは一定期間飼育継続後に上記と同様の組織学的検討を行った。

また、上記と同様の薬物処置や断眠負荷を行ったマウスについて、新鮮脳組織を回収し、視床下部組織中のPDI活性の測定、およびbiotin switch assayに基づく視床下部組織中のPDIの*S*-ニトロソ化レベルの定量評価も行った。老齢マウス(90週齢)の視床下部組織についても、同様の組織学的検討および生化学的検討を行った。

3. 結果

NOC18 (50 nmol)のマウス第三脳室への単回投与は、オレキシンニューロン数を有意に減少させた。その減少は時間依存的であり、投与7日後以降に統計学的に有意となった。一方、MCHニューロンについてもNOC18の投与によって細胞数が減少する傾向が認められたものの、その程度はオレキシンニューロンと比較して軽微なものであった。またNOC18は、残存するオレキシンニューロンの一部において細胞内にオレキシン免疫反応陽性の異常凝集物の形成を促進した。これに対して、MCHニューロンにおいてはMCH免疫反応陽性の異常凝集物の形成はほとんど認められなかった。異常凝集物を有するオレキシンニューロンの割合は、NOC18投与の3日後より認められ、14日後に最大に達し、28日後においても対照群よりも有意に高いレベルに維持されていた。NOC18によって誘導される凝集物の形成とオレキシンニューロン数の減少は、小胞体ストレス軽減作用の報告されているケミカルシャペロンであるタウロウルソデオキシコール酸(2 µg)をNOC18と同時に投与することによって有意に抑制された。

NOによって*S*-ニトロソ化修飾を受けたタンパク質を検出するbiotin switch assayの結果、NOC18 (50 nmol)投与3時間後~3日後の視床下部組織においてはPDIの*S*-ニトロソ化レベルが有意に増大していることが明らかとなった。また同時に、視床下部組織中のPDIの酵素活性は著明に低下していた。さらに、PDI阻害作用を有するcystamine (50 µg)あるいはsecurinine (50 µg)を第三脳室に投与した場合にも、NOC18を投与した場合と同様にオレキシンニューロンの有意かつ選択的な減少と、オレキシン免疫反応陽性異常凝集物の形成が観察された。siRNAによってオレキシンニューロンにおけるPDIの発現を抑制した場合にも、オレキシン免疫反応陽性の異常凝集物の形成が亢進していることが確認された。

次に、マウスに断眠負荷を課したところ、12時間の断眠負荷によって異常凝集物を含有するオレキシンニューロンの割合が有意に増加することが明らかとなった。また、12時間の断眠負荷を7日間連続で与えたマウスでは、断眠負荷終了の7日後においてオレキシンニューロン数の有意な減少が認められた。さらに12時間の断眠負荷直後のマウスの視床下部組織では、PDIの*S*-ニトロソ化レベルの増大が確認された。

また、老齢(90週齢)C57BL/6マウスでは、若齢(8~10週齢)マウスと比較して視床下部でのPDIの*S*-ニトロソ化レベルの増大とPDI活性の著明な低下が認められた。また、老齢マウスの視床下部組織ではオレキシン陽性凝集物を含有するニューロンの割合が若齢マウスと比較して著明に増加しており、オレキシンニューロン数については若齢

マウスと比較して有意な減少が認められた。その一方でMCHニューロンでは、異常凝集物を含有するニューロンの割合およびニューロンの数のいずれについても若齢マウスと老齢マウスとの間で差異は認められなかった。これらの結果から老齢マウスの視床下部では、NOドナーを投与した場合や断眠負荷を課した場合と同様の機序によってオレキシンニューロンの病理変化が誘導されている可能性が示された。

4. まとめ

本研究は、視床下部内におけるNO過剰産生とそれに伴うPDIのS-ニトロソ化と活性低下がオレキシンニューロンに選択的な病理変化をもたらす、という新たなメカニズムの存在を明らかにした。また、このような経路を介したオレキシンニューロンの変性が断眠負荷や老化によって誘導されることが示された。このことは、オレキシンニューロンの変性が生活の質の低下と生活習慣病の病態悪化を招く悪循環の構成要素であることを示唆している。一方で、NOによるオレキシンニューロンの変性が低分子量化合物であるケミカルシャペロンによって抑制されたことは、この経路に対して薬物による治療介入が可能であることを示唆している。今後、オレキシンニューロンの病理形成機序についてさらに解析を進めることにより、老化等に伴う生活の質の低下に対する適切な治療・長期管理の手段の構築に貢献する基礎知見が集積できるものと期待される。

5. 参考文献、発表論文

参考文献

- 1) Michinaga S, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. Orexin neurons in hypothalamic slice cultures are vulnerable to endoplasmic reticulum stress. *Neuroscience*. 190:289-300, 2011.
- 2) Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*. 441:513-517, 2006.

発表論文

Obukuro K, Nobunaga M, Takigawa M, Morioka H, Hisatsune A, Isohama Y, Shimokawa H, Tsutsui M, Katsuki H. Nitric oxide mediates selective degeneration of hypothalamic orexin neurons through dysfunction of protein disulfide isomerase. *J Neurosci*. 33:12557-12568, 2013.