

# 投射経路特異的な神経活動操作による情報統合機構解明

名古屋大学 環境医学研究所 神経系分野 2  
山中 章弘

## 1. はじめに

### 緒言

動物が生存にとって最適な行動を選択するためには、環境あるいは体内からの多様な情報を処理して複数の行動を統合的に調整する必要がある。本研究では視床下部のオレキシン産生神経に焦点を当てた解析を行う。オレキシン神経は、概日リズムやストレスといった様々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統合的に調節している。こうした複雑な入出力を統合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できなければその正確な動作原理に迫ることは不可能であった。

### 目的

オレキシン神経による様々な情報統合機構を明らかにするために、投射経路特異的に遺伝子発現を誘導する技術の開発が必要である。本研究では、遺伝子改変マウスに併せてウイルスベクターを用いることで、オレキシン神経の活動を操作し、また、投射経路を個別に活動制御することを試みた。こうした研究手法上の革新により、多様な行動・生理現象の統合調節を担う神経回路の動作原理についてはじめて迫ることが可能となった。本研究は、これらの手法を駆使してオレキシン神経活動操作によって情報統合機構を解明することを目的としている。

### 背景

神経ペプチド「オレキシン」は視床下部外側野に存在する神経細胞によって産生される(1)。オレキシン神経は脳内のほぼ全領域にわたって軸索を投射しており、同時に扁桃体や青斑核を含む脳内の多くの領域から神経投射を受けている。オレキシン神経の活動は睡眠・覚醒の調節に極めて重要である。睡眠・覚醒に関わりの深いモノアミン神経起始核にはオレキシン神経の密な投射が認められている。また、これらの神経核はオレキシン受容体を発現しており、オレキシンによって活性化される。オレキシンやその受容体に異常がある動物は、短時間に睡眠・覚醒を繰り返すナルコレプシーと呼ばれる睡眠障害に酷似した症状を示し、ナルコレプシー患者の脳においてはオレキシン神経の特異的脱落が認められる(2)。オレキシン神経は摂食・代謝や依存・報酬系といった睡眠・覚醒以外の行動にも重要な役割を果たしていることが報告されている。オレキシンの脳室内投与は摂食行動を引き起こし、オレキシンを選択的に脱落させた遺伝子改変マウスでは体重の変化が観察される(3)。また、オレキシンは腹側被蓋野のドーパミンニューロン

を直接興奮させ、オレキシンの腹側被蓋野への局所投与は薬物報酬に対する嗜好性を増強する。こうした個別の行動・生理応答へのオレキシン神経の関与は、これまで主に遺伝学的手法によって明らかにされてきた。

## 2. 方法

オレキシン神経特異的にCreリコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスにアデノ随伴ウイルスベクターを投与して、オレキシン神経特異的に遺伝子発現を誘導した。組織化学的解析、電気生理学的解析によって、遺伝子発現とその機能を確認した。経時的に摂食行動、飲水行動、自発行動量、代謝量を測定出来る装置 (GLAMS) を用いてオレキシン神経細胞を持続的に活性化させたときのそれらのパラメーター変化を同時に解析した。また、オレキシン神経特異的にジフテリア毒素A断片を発現させて、脱落させたときの各パラメーターについても解析した。

## 3. 結果 研究成果

オレキシン神経特異的に遺伝子発現を誘導するために、ヒトプレプロオレキシン遺伝子上流域3.2kbを用いてオレキシン神経特異的にCreリコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウス作成した(4)。組織化学的解析によって、オレキシン神経特異的にCreが発現していることを確認した。Cre依存的に遺伝子発現が開始するAAVを視床下部に感染させ、オレキシン神経特異的に遺伝子発現を誘導出来ることを確認した。オレキシン神経特異的に改変型GPCR (hM3Dq) を発現させ、そのリガンドであるクロザピン-N-オキサイド (CNO) を投与してオレキシン神経を持続的に活性化させたときの反応について解析した。CNOを腹腔内投与後(1 mg/kg)、オレキシン神経を活性化させたところ、摂食量、飲水量、自発行動量、代謝量が約3時間持続的に増加した。しかし、摂食行動、飲水行動は自発行動増加と同時に増加しているため、行動量増加の結果として二次性に生じたものではなく、オレキシン神経の活性化が摂食行動、飲水行動を直接惹起したものと考えられた。一方、呼吸交換率の上昇はCNO投与後約6時間持続した。

次に、ジフテリア毒素A断片をオレキシン神経特異的に発現させてオレキシン神経を脱落させた。オレキシン神経の約70%–85%を脱落させることが出来ることを組織化学的解析によって明らかにした。オレキシン神経が脱落したときの摂食量、飲水量、自発行動量、呼吸交換率についても解析した。オレキシン神経の脱落に伴い、摂食量、飲水量、自発行動量の低下、代謝量の低下を認めた。

## 4. 考察 まとめ

これらの結果から、オレキシン神経細胞が覚醒を持続させる結果として二次的にエネルギー恒常性に影響を与えている訳ではなく、摂食量、飲水量、自発行動量、代謝量のそれぞれのパラメーターを直接調節していることが分かってきた。これまでに経シナプス逆行性Creを用いた投射経路別の遺伝子発現制御ツールの開発に成功しており、hM3Dqなどを用いた神経活動操作と組み合わせることで、投射経路別の活動操作が可能になる

と予想される。今後は個別の投射経路ごとの操作によってオレキシン神経が睡眠覚醒だけでなく、エネルギー恒常性を調節するメカニズムについて明らかにする予定である。

#### 5. 発表論文、参考文献

1. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998;92(4):573-85.
2. Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*. 2000;6(9):991-7.
3. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 2001;30(2):345-54.
4. Inutsuka A, Inui A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Lazarus M, and Yamanaka A. Concurrent and robust regulation of feeding behaviors and metabolism by orexin neurons. *Neuropharmacology*. 2014;85(451-60).