

# 睡眠障害ナルコレプシーを抑制する神経回路の解明

金沢大学 医薬保健研究域医学系 統合神経生理学講座  
三枝 理博

## 1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

神経ペプチド・オレキシンを産生する神経細胞の変性・脱落により、日中の非常に強い眠気や睡眠発作（突然眠り込んでしまう）、情動脱力発作（レム睡眠時の筋弛緩が覚醒中に病的に現れる）等の睡眠障害を主徴とする疾患「ナルコレプシー」が生じる。したがってオレキシン神経細胞は、覚醒状態を安定的に維持する役割を持つと考えられている。オレキシン神経細胞は視床下部外側野に局限して存在し、脳の広範な領域に投射を送る。特に、覚醒を亢進する脳幹や視床下部のモノアミン（ノルアドレナリン、セロトニン、ヒスタミン）神経細胞やアセチルコリン神経細胞に密に投射している。また、オレキシン投与によりこれらの神経細胞が興奮することも知られている。しかしながら、オレキシンを薬理投与して活性化するからと言って、実際に生体内でオレキシン神経細胞の下流で覚醒を調節しているかどうかは必ずしも定かではない。in vivoの生理的な睡眠・覚醒調節においてオレキシン神経細胞により活性化され覚醒を亢進する神経細胞、言い換えれば、オレキシン神経細胞の下流でナルコレプシーを抑えている神経細胞については明らかになっていなかった。我々は以前、背側縫線核のセロトニン神経細胞、青斑核のノルアドレナリン神経細胞がオレキシン神経細胞によって直接活性化され、前者は情動脱力発作、後者は睡眠発作を抑制することを示した (Hasegawa et al, J Clin Invest 2014)。本研究では光遺伝学的・化学遺伝学的手法を駆使し、背側縫線核セロトニン神経細胞のさらに下流で情動脱力発作を抑制する神経細胞を同定し、オレキシン神経細胞の下流でナルコレプシーを抑制する神経回路網の全貌を理解することを目的とした。

本研究により、睡眠・覚醒を制御する神経メカニズムに関して多くの情報が得られ、その成果は、ナルコレプシーの病態の理解に繋がるだけでなく、不眠症など他の様々な睡眠障害への対処に応用できる。

## 2. 方法

ナルコレプシーモデルマウスとしては、神経変性を引き起こす変異型ataxin-3をオレキシン神経細胞特異的に過剰発現したマウス（オレキシン神経細胞欠損マウス）を主に用い、その他にはオレキシン受容体OX1R;OX2R二重欠損マウスも一部用いた。セロトニン神経細胞に特異的にCre recombinaseを発現するマウスはSert-Creマウスを用いた。

組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを、定位脳手術により、マウスの特定の領域に感染させた。Cre発現細胞に特異的に外来遺伝子を発現させるためには、FLEX (Flip excision)/DIO (double-flxed inverted ORF) を含むAAVベクターを作成し用いた。

光遺伝学による神経活動操作には、AAVベクターによりセロトニン神経細胞にChR2 (Channelrhodopsin2)/EYFPを発現させた。ChR2は青色光に反応して開口する陽イオンチャンネルで、神経細胞を興奮させる。ここでは、チャンネル開口時間が長いSSFO (stabilized step-function opsin) 型のChR2を用い、脳に埋め込まれた光ファイバーを通して、30分に一度光照射を行った。神経終末を抑制する光遺伝学プローブとしては、マウス短波長感受型オプシン (vSWO: vertebrate short-wave length opsin) を用いた。vSWOは異所的に神経細胞に発現させると、光照射によりGiに共役して膜電位を過分極させる。化学遺伝学的手法による神経活動操作には、DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) を用いた。DREADDは人工的に改変したM3ムスカリン受容体で、合成化合物 clozapine-N-oxide (CNO) のみに反応し、神経細胞を興奮させる。Gqに共役し神経を興奮させるhM3Dqと、Giに共役し神経を抑制するhM4Diがある。CNOを腹腔内投与することによって、DREADD発現神経細胞の活動を人為的に操作できる。

### 3. 結果 研究成果 (Hasegawa et al, PNAS 2017)

#### ① 情動脱力発作抑制における背側縫線核セロトニン神経細胞の作用部位の同定

ナルコレプシーモデルマウスのおレキシン神経細胞欠損マウスの背側縫線核セロトニン神経細胞に特異的にChR2(Channelrhodopsin2)/EYFPを発現させ、背側縫線核(セロトニン神経細胞細胞体)を青色光刺激することで、情動脱力発作が抑制され、平均覚醒持続時間に変化しないことを確認した。次に、背側縫線核セロトニン神経細胞の投射が密で(EYFP陽性神経線維が多い)、かつREM睡眠や情動の制御に関わる脳領域を個別に光刺激して、情動脱力発作が抑制される領域を検索した。検討したのは、中脳水道周囲灰白質腹外側部(レム睡眠抑制)、外背側被蓋核(レム睡眠促進)、下外側背側核(レム睡眠誘発)、黒質緻密部(レム睡眠調節)、扁桃体(情動処理)である。その結果、レム睡眠調節領域の光刺激ではナルコレプシー症状に変化がなかったのに対し、扁桃体におけるセロトニン神経終末を刺激すると情動脱力発作がほぼ完全に抑制された。覚醒持続時間には変化がなかった。このことから、背側縫線核セロトニン神経細胞の扁桃体への投射が情動脱力発作を抑制していることが示唆された。

#### ② セロトニン神経終末活性化による扁桃体神経活動の変化

背側縫線核セロトニン神経細胞を、扁桃体(神経終末)あるいは背側縫線核(細胞体)で光刺激し、扁桃体の神経活動をFosタンパク質の発現を指標に調べたところ、どちらの場合にも、扁桃体外側基底核、中心核共にFos発現が減少することが分かった。したがって、セロトニン放出は扁桃体の活動を弱めることが示唆された。

扁桃体スライスを用いたパッチクランプ解析でも、セロトニンにより膜電位が過分極することを確認した。

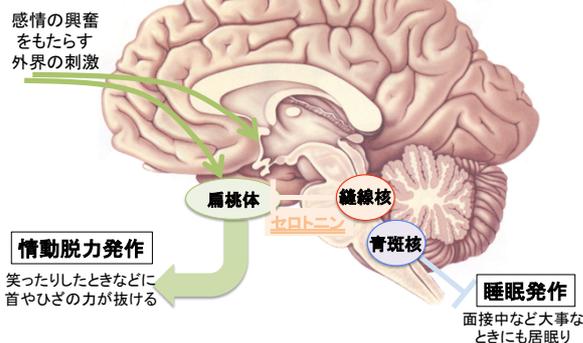
#### ③ 扁桃体神経活動の人為的操作による情動脱力発作頻度の変化

以上の実験で、扁桃体でのセロトニン放出が扁桃体の活動を弱めることで情動脱力発作が抑制されることが示唆された。そこで、抑制性のDREADDを扁桃体に発現させて扁桃体神経活動を人為的に抑制すると、情動脱力発作が抑えられた。逆に興奮性DREADDを発現させ扁桃体活動を人為的に高めると、情動脱力発作の頻度が上昇した。したがって、扁桃体の神経活動と情動脱力発作の頻度は逆相関することが示唆された。

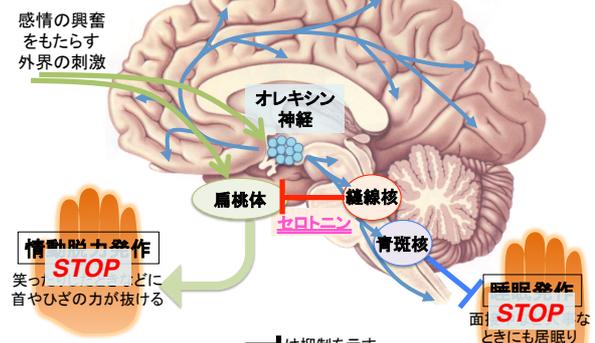
#### ④ オレキシン神経細胞⇒背側縫線核セロトニン神経細胞⇒扁桃体の経路が情動脱力発作を抑制する

最後に、背側縫線核セロトニン神経細胞が扁桃体を抑制して情動脱力発作を抑える経路が、オレキシン神経細胞の下流で機能しているのか、検証した。オレキシン受容体欠損マウスもナルコレプシー症状を示す。以前我々は、このマウスの背側縫線核セロトニン神経細胞のみでオレキシン受容体の発現を回復すると情動脱力発作が抑制されることから、背側縫線核セロトニン神経細胞がオレキシン神経細胞の直接の下流で情動脱力発作を抑制すると結論した(Hasegawa et al, 2014)。今回はさらに、オレキシン受容体と共に抑制性の光遺伝学プローブvSWOを背側縫線核セロトニン神経細胞に発現させ、扁桃体を光刺激することにより、扁桃体におけるセロトニン神経終末のみ抑制した。その結果、オレキシン受容体発現回復により抑えられていた情動脱力発作が光照射によって高頻度で見られるようになった。この結果は、オレキシン神経細胞が背側縫線核セロトニン神経細胞の活動を高めることによって情動脱力発作が抑制されるが、この抑制作用は背側縫線核セロトニン神経細胞の扁桃体への投射に依存することを示唆している。すなわち、オレキシン神経細胞⇒背側縫線核セロトニン神経細胞⇒扁桃体の経路が情動脱力発作を抑制することが明らかになった。

#### ナルコレプシー患者



#### 健常者



#### 4. 考察 まとめ

情動脱力発作は、急激な感情の動き、特に大笑いするなどの良い意味での感情的興奮が生じた時に起こる。今回の研究により、セロトニン神経細胞は骨格筋の脱力を直接抑えるのではなく、感情的興奮を伝える扁桃体の活動を弱めて適度に調節することで、情動脱力発作を防ぐことが分かった。実際に、オレキシン神経細胞を失っているナルコレプシー患者では、面白い写真を見た時に扁桃体が過剰に反応することが知られている。「オレキシン神経→背側縫線核・セロトニン神経→扁桃体」という、情動脱力発作を抑制する神経経路が明らかになったことで、ナルコレプシー発症メカニズムの全貌の理解に大きく近づいた。また、情動脱力発作の新たな治療法の開発にもつながると期待される。

#### 5. 発表論文、参考文献

Hasegawa E, Yanagisawa M, Sakurai T, Mieda M.

Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways.

J Clin Invest. 2014, 124:604-16. doi: 10.1172/JCI71017.

Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Maseck OA, Herlitze S, Yoshioka M, Sakurai T, Mieda M.

Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2017, 114:E3526-E3535. doi: 10.1073/pnas.1614552114.