

氏 名 田淵 紗和子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1732 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The role of orexin neurons in the regulation of sleep and
wakefulness

論文審査委員 主 査 教授 深田 正紀
教授 富永 真琴
教授 鍋倉 淳一
教授 勢井 宏義 徳島大学
教授 山中 章弘 名古屋大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Sleep is an essential phenomenon which occurs in the brain. It is important to maintain our lives since sleep deprivation for a few weeks leads mice to death. However, we are not still able to answer the question “why do we need to sleep?”. Recently, sleep disorders such as insomnia, sleep apnea syndrome and circadian rhythm syndrome became national diseases. Thus, to reveal the mechanism of sleep/wakefulness regulation and also sleep disorders has profound significance. I focused on the orexin neurons which have a critical role in the regulation of sleep/wakefulness. I studied following three topics using mouse models; local orexin neural network (Chapter I), the negative feedback circuit between orexin neurons and serotonergic neurons (Chapter II) and the mechanism of one of sleep disorders called “narcolepsy” (Chapter III).

Chapter I: Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor
Orexin neurons have an important role in the regulation of sleep/wakefulness, and especially in the maintenance of arousal. It has been reported that orexin neurons are activated by orexin not directly but indirectly. However, here I revealed that orexin neurons are directly and indirectly activated by orexin via orexin 2 receptor (OX2R). Both orexin A (1 μ M) and orexin B (1 μ M) induced depolarization in orexin neurons, which was still observed when neural networks were inhibited by tetrodotoxin (1 μ M). Orexin B application induced depolarization in orexin neurons of OX1R knockout mice at comparable levels to wild-type mice. Whereas orexin B failed to depolarize orexin neurons in the OX2R knockout mice. These results suggested that OX2R was a primary receptor for this response. Moreover, immunoelectron microscopic analyses revealed direct contacts among orexin neurons, which exhibited structural similarities to the glutamatergic synapses. Taken together, these results suggest that orexin neurons form a positive feedback circuit through indirect and direct pathways, which results in the maintenance of the orexin neuron network at a high activity level and/or for a longer period. Therefore, the activation of orexin neurons through OX2R might have an important role in the maintenance of arousal.

Chapter II: Influence of inhibitory serotonergic inputs to orexin neurons on the diurnal rhythm of sleep and wakefulness

Serotonergic (5HT) neurons of the dorsal raphe nuclei receive excitatory input from orexin neurons and are activated by orexin through both OX1R and OX2R. On the other hand, orexin neurons are inhibited by 5HT through the 5HT1A receptor. Thus the existence of the negative feedback circuit between orexin neurons and 5HT

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

neurons has been speculated. However, the physiological significance of this circuit for sleep/wakefulness regulation is little understood. To reveal this role, 5HT1A receptor expression level was specifically and reversibly controlled in the orexin neurons using the Tet-off system. Under the 5HT1A receptor overexpression condition, *orexin-tTA; TetO Htr1a* mice exhibited severe fragmentation of sleep/wakefulness during the first half of the dark period, the time of maximal activity in nocturnal rodents. On the other hand, sleep/wakefulness during the light period was unchanged. However, when the 5HT1A receptor in orexin neurons was reduced to basal expression levels, sleep/wakefulness patterns in *orexin-tTA; TetO Htr1a* mice were indistinguishable from those of littermate *TetO Htr1a* mice. These results strongly suggest that inhibitory serotonergic input functions as negative feedback to orexin neurons in the early dark period and to help stabilize wakefulness bouts, thereby contributing to the diurnal rhythm of sleep and wakefulness.

Chapter III: Conditional ablation of orexin neurons: A new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function

It is reported that one in six hundred people develops narcolepsy in Japan. There are four main symptoms; excessive daytime sleepiness, fragmentation of sleep/wakefulness, sleep paralysis and cataplexy. The pathoetiology of narcolepsy is a loss of orexin neurons in human. For the narcolepsy study, *prepro-orexin* knockout mice, orexin receptor knockout mice and *orexin/ataxin-3* mice were used as narcolepsy model mice. However, these mice were not perfect mouse models for narcolepsy since they lose orexin functions before or soon after birth not in adolescence or early adulthood. I introduced a novel narcolepsy mouse model “*orexin-tTA; TetO diphtheria toxin A fragment (DTA)* mice” to address this problem. In this mouse, we can control the DTA expression with or without doxycycline (DOX). About 86% and 95% of orexin neurons were ablated at 1 and 2 weeks of DOX removal, respectively. 86% loss of orexin neurons induced fragmentation of wakefulness during the dark period which is an active period for mice. 95% loss of orexin neurons induced much severe fragmentation of wakefulness and cataplexy. As further death of orexin neurons, each symptom became severer. These results suggest that the progress of symptoms is highly related with the number of orexin neurons.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

睡眠・覚醒の規則正しい調節は心身の健康を維持するために必要不可欠である。ヒトは人生の約 3 分の 1 を睡眠に費やすにも関わらず、「ヒトはなぜ眠る必要があるのか？」という根源的な疑問に対し未だ明確な答えは得られていない。最近、不眠症や睡眠時無呼吸症候群、ナルコレプシーといった睡眠覚醒障害が社会問題となってきた。本研究では睡眠・覚醒調節機構と睡眠・覚醒障害の病態機構を明らかにするために種々のマウスモデルを樹立し、主にマウス脳スライス標本を用いた電気生理学的手法により以下の 3 つの研究を行い、睡眠・覚醒の調節を担うオレキシン産生神経（オレキシン神経）の役割を明らかにした。

1) 視床下部外側野に散在するオレキシン神経は、睡眠・覚醒調節（特に覚醒維持）に重要な役割を果たしていることが知られているが、オレキシン神経の活性化機構は十分に理解されていなかった。本研究では、オレキシン A、オレキシン B の局所投与によりオレキシン神経が脱分極すること、そしてこの脱分極が TTX や APV、CNQX といったシナプス伝達を阻害する薬剤存在下でも認められることを示した。また、オレキシン B 投与により誘導されるオレキシン神経の脱分極はオレキシン 1 受容体欠損マウスでは野生型マウスと同様に認められたが、オレキシン 2 受容体欠損マウスでは認められなかった。以上のことから、オレキシン神経はこれまで報告されていたグルタミン酸受容体を介したシナプス伝達による活性化以外に、オレキシン神経から分泌されたオレキシンによってオレキシン 2 受容体を介して直接活性化されることが明らかになった。したがって、オレキシン神経同士は positive feedback 機構を形成し、互いに活性化しあうことで覚醒維持に貢献していることが示された。

2) 背側縫線核に存在するセロトニン作動性神経はオレキシン神経から入力を受け活性化されるが、一方セロトニン作動性神経はオレキシン神経に投射し、5HT1A 受容体を介してオレキシン神経を抑制することが知られており、両者間には negative feedback 機構が存在することが示唆されていた。本研究ではこの神経回路の生理機能を明らかにするために、Tet-off システムを用いてオレキシン神経に任意のタイミングで 5HT1A 受容体を可逆的に過剰発現可能なマウスを樹立し、その解析を行った。5HT1A 受容体を過剰発現状態にすると、暗期初期特異的に重篤な睡眠・覚醒の分断化が認められた。この症状は 5HT1A 受容体の発現量を正常レベルに戻すことにより消失した。したがって、セロトニン作動性神経はオレキシン神経に対し暗期初期特異的に負の調節を担っていることが明らかになった。

3) ナルコレプシーはオレキシン神経が何らかの原因で脱落することにより、日中の耐え難い眠気、睡眠覚醒の分断化、入眠時幻覚、情動脱力発作を呈する疾患である。これまでナルコレプシーのモデルマウスがいくつか作製されてきたが、これらモデルでは生後間もなくオレキシン神経が消失するため、思春期以降に発症するヒトのナルコレプシーの完全なモデルとは言えなかった。また、オレキシン神経の残存数と症状の連関に関しても解析することはできなかった。本研究では、Tet-off システム下でジフテリア毒素 A 断片の発現を制御することにより、任意のタイミングでオレキシン神経の脱落を誘導することが可能なモデルマウスを樹立した。その結果、細胞死誘導後 1 週間で 86% のオレキシン神経が消失し睡眠覚醒の分断化が現れ、細胞死誘導後 2 週間で 95% のオレキシン神経が死滅して重篤な睡眠覚醒の分断化と情動脱力発作が認められた。これらの結果より、ナルコレプシ

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

一の症状の進行とオレキシン神経数減少との間に高い相関があることがはじめて明らかとなった。

これら研究内容は 3 報の筆頭論文として国際誌に発表されており、また関連した内容で 4 報の共著論文を発表している。以上のことに鑑みて、本研究が学位論文としてふさわしいものであることに、審査委員全員の意見が一致した。