

平成16年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		ごとう かつとし			所属研究機関・部局・職		筑波大学・基礎医学系・教授	
研究代表者氏名		後藤 勝年						
研究課題名	和文	オレキシンによる摂食および睡眠・覚醒の制御機構の解明						
	英文	The role of orexin in feeding behavior, sleep and wake regulation						
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計	
16年度以降は内約額 金額単位：千円		27,400	25,800	17,200	8,600	8,200	87,200	
研究組織（研究代表者及び研究分担者）								
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）		
後藤 勝年		筑波大学・基礎医学系・教授		薬理学		研究の統括を行う		
桜井 武		筑波大学・基礎医学系・助教授		分子生物学		分子生物学的解析を行う、行動薬理学的解析を行う		
三輪 佳宏		筑波大学・基礎医学系・講師		分子生物学		分子生物学的解析を行う		
山中 章弘		筑波大学・基礎医学系・講師		神経電気生理学		神経細胞の電気生理学的解析を行う		
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）								
<p>オレキシンは1998年に申請者らによって、2つの orphan receptor に対する内因性リガンドとして同定された神経ペプチドである。オレキシンを産生する神経細胞すなわちオレキシン神経細胞は古くから摂食中枢として知られている視床下部外側野とその周辺にのみ局在している。また、オレキシンを動物の脳室内に投与すると摂食量が上昇することなどから、食欲の生理的な制御因子として注目されている。一方、オレキシン遺伝子欠損動物や、オレキシン受容体のサブタイプのひとつであるOX2受容体の遺伝子欠損動物が睡眠障害のひとつであるナルコレプシー特有の脱力発作（カタプレキシー）と睡眠覚醒の分断化を呈することや、ナルコレプシー患者の脳においてオレキシン神経細胞のみが脱落していることが判明し、オレキシンが摂食行動のみならず、睡眠覚醒調節にも重要な作用を持つことが明らかとなった。本研究では、これまでに我々が種々の遺伝子操作動物や薬理学実験によって得たオレキシンの生理的役割に関する知見をさらに追及するとともに、ヒトにおける摂食障害、睡眠障害におけるオレキシン系の関与を明らかにし、オレキシンシステムに影響を与えることによる治療法の開発につなげることを目的としている。</p>								

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

<オレキシン遺伝子の解析>

オレキシンの発現調節のメカニズムを調べるためにオレキシン遺伝子の解析を行った。これまでにヒトオレキシン遺伝子上流域 3.2 kbp（オレキシンプロモーター）が極めて特異的に外来遺伝子を発現できることを、大腸菌のガラクトシダーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いて証明しているため、この遺伝子断片に含まれる cis-element を詳細に解析した。様々な長さの遺伝子断片を用いてトランスジェニックマウスを作成し、オレキシンの発現制御に重要な領域 OE1 と OE2 を同定した（*J Biol Chem.* 277(19): 16985-92, 2002）。このプロモーター解析によって、オレキシン神経に特異的に様々な遺伝子を発現させることが可能になり、以後の解析に役立てることが出来た。

<オレキシン受容体（OX₁R, OX₂R）のシグナル伝達系の解析>

オレキシン受容体のシグナル伝達経路を神経系培養細胞における強制発現系を用いて解析した。OX₁R が百日咳毒素(PTX)非感受性経路を介し、一方 OX₂R は PTX 非感受性および感受性の両方の経路を有することを明らかにした（*J Pharmacol Sci.* 92(3): 259-66, 2003）。

<オレキシン神経の投射先における作用の解析>

オレキシン神経が密に投射している神経核の中で特に OX₂R を強く発現している TMN（結節乳頭体核）におけるオレキシンの作用を明らかにした。オレキシンが OX₂R を介して TMN のヒスタミン神経細胞を活性化させることをパッチクランプ法を用いて証明した。またラットを用いた脳波筋電図解析によってオレキシンの覚醒促進作用にはヒスタミン系が重要であることを示した（*Biochem Biophys Res Commun.* 290(4): 1237-45, 2002）。

<オレキシン神経細胞の電気生理学的解析>

オレキシン神経細胞がどのような電気的特徴をもった神経細胞なのかを、オレキシンプロモーターを用いてオレキシン神経細胞特異的に Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) を発現するトランスジェニックマウスを用いたパッチクランプにより解析した。オレキシン神経細胞の基礎的な膜の電気的性質を明らかにした。また、セロトニン、ノルアドレナリンによって神経活動が抑制され、アセチルコリンによって活性化されることを見いだした（*Biochem Biophys Res Commun.* 303(1): 120-9, 2003; *Neuron* 36(6): 1169-81, 2002）。セロトニン、ノルアドレナリンによる反応がそれぞれ、セロトニン 1A 受容体、2 受容体を介していることを薬理的に同定した（投稿準備中）。また、オレキシン神経細胞が細胞外グルコース濃度に依存して活動レベルを変化させることを明らかにしてグルコース感受性神経細胞であることを同定した。また、摂食調節因子であるレプチンやグレリンによっても調節を受けることを示した。オレキシンプロモーターを用いて、オレキシン神経細胞のみを脱落させた *orexin/ataxin-3* トランスジェニックマウスでは絶食後の覚醒時間の増加が観察されなかったことから、オレキシン神経細胞に末梢の栄養状態を感知して覚醒レベルを変化させる役割があることを証明した（*Neuron* 38(5): 701-13, 2003）。

<ナルコレプシーモデル動物の開発>

これまでにナルコレプシーモデル動物として *orexin/ataxin-3* マウス（生後まもなくオレキシン神経細胞の脱落が始まる）を作成した（*Neuron* 30(2): 345-54, 2001）が、ナルコレプシーが思春期に多く発症することなどから、任意の時期にオレキシン神経細胞のみを脱落させることの出来るトランスジェニックマウス（*orexin/hIL-2R:EGFP*）を作成した。オレキシンプロモーターを用いてヒト IL-2 受容体のサブユニットをオレキシン神経細胞特異的に発現させ、任意の時期に免疫毒素である anti-tac(Fv)-PE38 を投与することによって、オレキシン神経特異的な脱落を生じさせることが出来る。約 70% のオレキシン神経細胞の消失によって睡眠覚醒の分断化が生じ始めるが、脱力発作は生じないことを見いだした（投稿準備中）。このことにより、オレキシン神経の消失が成熟個体におこってもナルコレプシーになること、また、病態の重症度とオレキシン神経の変性の程度の相関性をあきらかにした。

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

1. 神経ペプチドは脳内の特定の神経細胞に特異的に発現されなければならないが、その発現制御メカニズムは大変興味深いものであるが、よく分かっていない。我々は視床下部外側野とその周辺に限局して発現するオレキシンの発現制御メカニズムに迫った。様々な長さの遺伝子断片を用いて何種類ものトランスジェニックマウスを作成しアッセイするという他に例がない、独創的であるが大変労力を必要とする手法によって、発現制御に重要な領域を同定し、OE1 と OE2 と命名した。この成果は視床下部における遺伝子発現メカニズムの解明に貢献した。またこのプロモーターは以後のマウスにおける解析において、大変有用な情報となった。
2. 睡眠覚醒制御機構については未知な部分が多い。特にオレキシン神経細胞は近年同定されたため、これまで既に分かっていた睡眠覚醒に関わる系との関連が全く不明であった。これを明らかにするには、オレキシン神経細胞がどのような性質を有しているのか、また、どのような神経によってどのような調節を受けるのかについて調べる必要がある。それにはオレキシン神経細胞の電気生理学的な解析が不可欠であるが、オレキシン神経細胞が視床下部外側野に少数がまばらに存在するため従来の手法では限りがあった。本研究ではオレキシン神経細胞特異的に EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作成し、オレキシン神経細胞の同定を容易にすることによって電気生理学的手法の適用を可能にした。これによって、初めてオレキシン神経細胞の電氣的性質が明らかとなり、オレキシン神経細胞がセロトニンやノルアドレナリンによって抑制を受け、アセチルコリンによって活性化することを報告した。手法は全く独創的であり、得られた成果は睡眠覚醒に関わる神経回路網の一端を明らかにし、この分野における進歩に格段の貢献があった。
3. 野生の動物などは食べるために覚醒し、栄養状態の良いときは出来るだけ安全なところで寝て消耗を最小にしている。実際、現代社会に生きる我々も食後に眠気を生じたり、ダイエット中は夜中に目が覚めたりすることを身近に体験することによって、摂食行動と睡眠覚醒は密接に関係していることを本能的に認識している。しかしながら、この二つを繋ぐメカニズムはよく分かっていなかった。本研究において、覚醒に重要な作用を持つオレキシン神経細胞が細胞外グルコース濃度や、レプチン、グレリンなどの摂食調節因子によって活動レベルを変化させることの発見は、摂食行動と睡眠覚醒が密接に関係していることを初めて科学的に説明する結果となり、学問的、学術的インパクトだけでなく社会的インパクトも大きく、様々なメディアからの取材があった。
4. ナルコレプシーは日中の堪え難い眠気、入眠時幻覚、脱力発作などを主徴とする睡眠障害であり、本邦での有病率は世界で最も高く約 600 人に 1 人とされている。これまで原因不明とされてきたが、オレキシン神経細胞の後天的特異的脱落が病気の原因であることがほぼ確定的となっている。その治療薬の開発にはナルコレプシーモデルマウス開発が欠かせない。我々が作成した orexin/ataxin-3 マウスおよび orexin/hIL-2R:EGFP マウスはナルコレプシーモデルマウスとして大変適切であり、今後の治療薬の開発、薬効評価には不可欠な動物となっている。これらマウスを用いたナルコレプシー治療薬の開発を製薬企業と共同で行っている。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

1. Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(13):4649-54, 2004 .
2. Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, Shibahara M, Kuramochi M, Takigawa M, Yanagisawa M, Sakurai T, Shioda S, Yada T. Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 19(6):1524-34, 2004.
3. Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci.* 92(3): 259-66, 2003.
4. Sakurai T. Orexin: a link between energy homeostasis and adaptive behaviour. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 6(4): 353-60, 2003.
5. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron.* 38(5): 701-13, 2003.
6. Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 303(1): 120-9, 2003.
7. Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology.* 144(4): 1506-12, 2003.
8. Sakurai T. Roles of orexins in the regulation of feeding and arousal. *Sleep Med.* 2002.
9. Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN. Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron.* 36(6): 1169-81, 2002.
10. Guan JL, Uehara K, Lu S, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S. Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26(12): 1523-32, 2002.
11. Zhu Y, Yamanaka A, Kunii K, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol Behav.* 77(2-3): 251-7, 2002.
12. Zhu L, Onaka T, Sakurai T, Yada T. Activation of orexin neurones after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *Neuroreport.* 13(10): 1351-3, 2002.
13. Sakurai T. Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness. *Neuroreport.* 13(8): 987-95. Review, 2002.
14. Moriguchi T, Sakurai T, Takahashi S, Goto K, Yamamoto M. The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus. *J Biol Chem.* 277(19): 16985-92, 2002.
15. Higuchi S, Usui A, Murasaki M, Matsushita S, Nishioka N, Yoshino A, Matsui T, Muraoka H, Ishizuka Y, Kanba S, Sakurai T. Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy. *Neurosci Lett.* 318(2): 61-4, 2002.
16. Nanmoku T, Isobe K, Sakurai T, Yamanaka A, Takekoshi K, Kawakami Y, Goto K, Nakai T. Effects of orexin on cultured porcine adrenal medullary and cortex cells. *Regul Pept.* 104(1-3): 125-30, 2002.
17. Matsuzaki I, Sakurai T, Kunii K, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K. Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats. *Regul Pept.* 104(1-3): 119-23, 2002.
18. Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T. Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(4): 1237-45, 2002.

国際学会における発表 (下記以外に 2 件)

Yamanaka A, Tsujino N, Muraki Y, Hirashima N, Hara J, Beuckmann CT, Yanagisawa M, Sakurai T, Goto K Regulation of Orexin Neurons by Peripheral Nutritional Signals: Roles of Leptin, Ghrelin and Glucose Society for Neuroscience (SFN), Dates: Nov. 3-7, 2002, Location: Orlando, FL.

Sakurai T, OREXIN NEURONS ACT AS A LINK BETWEEN PERIPHERAL METABOLISM AND CENTRAL MECHANISMS COORDINATING AROUSAL AND FOOD INTAKE. 4th International Congress of Pathophysiology Butapest, Hungary, June 29 - July 5, 2002.