

オレキシンニューロンが情動記憶の成立および固定に関わる機構の解明

櫻井 武

金沢大学医薬保健研究域医学系 分子神経科学・統合生理学分野

【研究の背景】

オレキシン産生ニューロン(オレキシンニューロン)は視床下部外側野に存在し、脳幹のモノアミン神経核を含む脳の広範囲に投射しており睡眠・覚醒、摂食、報酬系の制御において重要な働きを担っている(Sakurai, 2007、2014)。申請者らは、近年オレキシンが情動記憶の形成に関与することを明らかにした(Soya et al. 2013)。近年、さまざまなオレキシン受容体拮抗薬がすでに開発されており、オレキシンが情動記憶の固定化や情動表出に果たす神経科学的メカニズムが詳細に明らかになればオレキシンを標的とした薬物治療により PTSD の治療法などに応用できる可能性は高い。

【目 的】

申請者らはオレキシン1受容体(OX1R)、オレキシン2受容体(OX2R)遺伝子欠損マウスを用いて、手がかり(音)および文脈(空間)に対する恐怖記憶形成を検討した結果、オレキシンがこれらの恐怖記憶の形成と固定に重要な役割を担うことを見いだしている(Soya et al. 2013)。恐怖記憶の形成は動物の生存に関わる重要な生理機能の一つであるが、適切に制御されない場合、身体的・精神的に有害になる。OX1R 欠損マウスは手がかりおよび文脈依存的恐怖記憶の形成に異常がみられ、さらに手がかり依存的な恐怖行動の発現には OX1R を介した青斑核(LC)のノルアドレナリンニューロン(LC-NA ニューロン)の興奮が重要であることを確認した。すくみ行動の減弱は、テストのみではなく、条件付けの過程においても認められたことから、恐怖行動の発現そのものにも関わっている可能性があった。そこで本研究では、まず、オレキシンが恐怖記憶の想起自体にも関わることを検証し、そのメカニズムを検討することを目的とした。また、恐怖記憶は一度形成されると、形成された状況に関する様々な情報(場所、匂い、音などを包括する情報=文脈)に暴露されることで想起され、過覚醒や動悸、不眠などのパニック症状をきたすが、類似の情報を含む別の文脈によっても恐怖記憶は想起されることが知られており(恐怖汎化)、PTSD や不安障害を抱える患者にとって深刻な問題となっている。申請者らは、本課題において、オレキシンの下流である LC-NA ニューロンの人工的な活性化が恐怖の汎化を増強する可能性を検証し、オレキシンが恐怖記憶の固定・想起のみならず、LC-NA ニューロンへの興奮性影響を介して恐怖の汎化にも関わる可能性を検討した。

【方 法】

- 1 マウスに手がかりおよび文脈依存的恐怖条件付けを行い、24時間後に施行したテストセッションの 30 分前に OX1 受容体拮抗薬(SB-334867)を腹腔内投与し、すくみ行動の発現に対する影響を調べた。すくみ行動は、行動解析ソフトによって判定した。
- 2 NAT-Cre マウス(ノルアドレナリン神経特異的に Cre が発現するマウス)に AAV ベクターを用いて Cre 依存的に抑制型 DREADD 受容体(hM4Di)を発現する AAV-EF1a-DIO-hM4Di を LC に両側性に投与した。手がかりおよび文脈依存的恐怖条件付けテストを行い hM4Di に対する人工リガンドである CNO(Clozapine-N-Oxide)を想起テスト 40 分前に腹腔内投与し、標的神経を抑制し、すくみ行動の発現に対する影響を調べた。

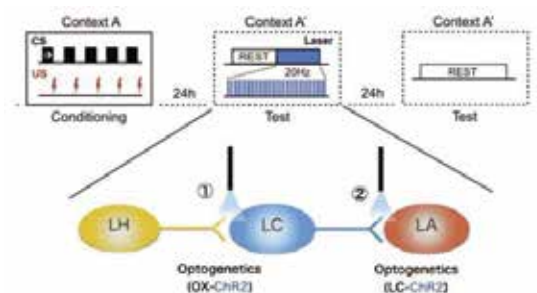


図1: 実験3、4のストラテジー

- NAT-Cre マウスに Cre 依存的に ChR2 を発現する AAV-EF1a-DIO-ChR2 を LC に局所投与後、LC-NA ニューロンの投射先である LA に光ファイバーを留置し、手がかりおよび文脈依存的恐怖条件付けを行い、テストセッション中、150 秒の REST 時間を置いて、留置した光ファイバーから 150 秒間光刺激を行って、影響を観察した(図 1)。
- orexin-Cre マウス(オレキシン神経特異的に Cre が発現するマウス)に Cre 依存的に ChR2 を発現する AAV-EF1a-DIO-ChR2 を LC に局所投与後、LC に光ファイバーを留置し、手がかりおよび文脈依存的恐怖条件付けを行い、テストセッション中、150 秒の REST 時間を置いて、留置した光ファイバーから 150 秒間光刺激を行って、影響を観察した。

【結 果】

- SB-334867 の投与は対照群に比べ優位にすくみ行動を抑制した(not shown)。
- CNO 投与は、対照群に比べ優位にすくみ行動を抑制した(not shown)。
- マウスを条件付けとは別の文脈に暴露したところ、すくみ行動は全く惹起されないが、LA において NA 線維を光刺激することによって強いすくみ行動の発現が見られた(図 2)。
- 同様に、マウスを条件付けとは別の文脈に暴露したところ、すくみ行動は全く惹起されないが、LC においてオレキシン線維を光刺激することによって強いすくみ行動の発現が見られた(図 3)。

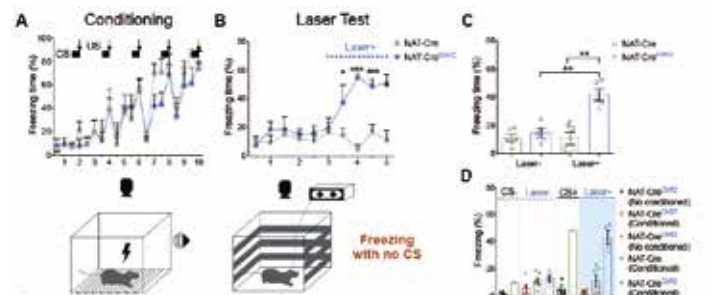


図2:実験3の結果。A. 条件付けのプロトコル。B、C 条件付けと別の文脈においてマウスはすくみ行動をしないが、LA において光刺激すると LC-NA ニューロンに ChR2 を発現させたマウスでは明確なすくみ現象が観察された。D. この現象は条件付けを行ったマウスのみで見られた。

【考 察】

オレキシンニューロンの軸索を LC で、あるいは、LC-NA ニューロンの軸索を扁桃体外側核(LA)で光刺激すると、中立の文脈でもすくみ行動をきたし、恐怖行動の汎化、増強がみられることが明らかになった。このことより、オレキシン⇒LC-NA⇒LAという経路が恐怖応答の変容に関与していることが明らかになった。オレキシンニューロンは、顕著な情動刺激により興奮することがすでに示されており、研究により、情動による強いオレキシンニューロンの興奮は LC-NA ニューロンを介して恐怖行動の発現を修飾し、恐怖汎化にかかわる可能性が示された。

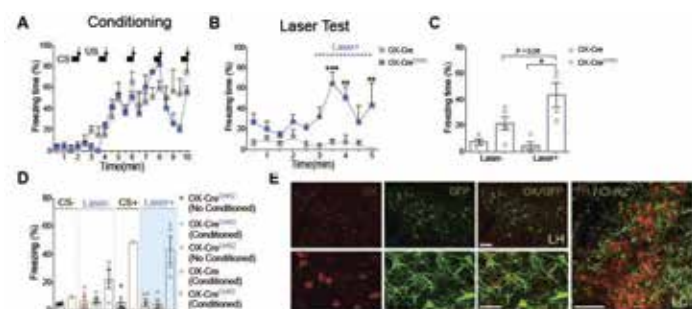


図3:実験4の結果。A. 条件付けのプロトコル。B、C.条件付けと別の文脈においてマウスはすくみ行動をしないが、LC において光刺激するとオレキシンニューロンに ChR2 を発現させたマウスでは明確なすくみ現象が観察された。D. この現象は条件付けを行ったマウスのみで見られた。E.オレキシン(赤)とChR2-GFP(緑)の二重染色像。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

オレキシンニューロンは、顕著な情動刺激により興奮することがすでに示されている(Sakurai, 2014)。本研究により、情動により興奮したオレキシンニューロンは、OX1R を介して、LC-NA ニューロンを興奮させ、LC-NA ニューロンが扁桃体外側核にノルアドレナリンを放出することが、恐怖関連行動を強く修飾することを示した。この過程は恐怖汎化にかかわる可能性が高く、OX1R 拮抗薬が PTSD やパニック障害など恐怖関連症状を中心とした疾患の治療に役立つ可能性が示唆された。また、既に不眠症治療薬として上市されている、オレキシン受容体非選択的阻害薬であるスボレキサントの作用機序を考える上でも非常に重要な知見である。

【参考・引用文献】

- Sakurai T. Neural Circuit of Orexin (Hypocretin):Maintaining Sleep and Wakefulness. **Nat Rev Neurosci.** 2007 8, 171-181.
- Soya S, Shoji H, Hasegawa E, Miyakawa T, Hondo M, Mieda M, Sakurai T Orexin Receptor-1 in Locus Coeruleus plays an Important Role in Cue-Dependent Fear Memory Consolidation **J Neurosci.** 2013 Sep 4;33(36):14549-57.
- Sakurai T. The role of orexin in motivated behaviours.**Nat Rev Neurosci.** 2014 Nov;15(11):719-31. doi: 10.1038/nrn3837.