

中脳水道周囲灰白質腹外側部 GABA 作動性ニューロンのカタプレキシー表出における役割

JEONG SOL (筑波大学 生物学類)

指導教員：櫻井 武 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

外側視床下部に局在し、オレキシンを産生する「オレキシンニューロン」は覚醒の維持に重要である。オレキシンの欠損は過眠症の一つである「ナルコレプシー」を引き起こす。ナルコレプシーの主要な症状の一つである「カタプレキシー」は、強いポジティブな情動が発動した時にθ波優位の脳波を示すとともに全身の筋肉から力が抜ける発作を指す。この症状はレム睡眠時の状態と類似しており、カタプレキシーは覚醒状態からレム睡眠様の状態への移行（通常はノンレム睡眠を挟む）によるものだと考えられている。しかし、その表出の詳細な神経回路は未だ不明な点が多い。

当研究室における先行研究により「橋の下背外側被蓋核 (SLD) のグルタミン酸作動性ニューロン→延髄腹内側 (VMM) のグリシン作動性ニューロン→脊髄の運動ニューロン」という神経回路がカタプレキシーとレム睡眠時筋脱力の共通回路であると示唆されている (Uchida et al., 2021)。また、その上流だと推測されている「中脳水道周囲灰白質腹外側部 (vlPAG) の GABA 作動性ニューロン (GABA^{vlPAG})」はレム睡眠時の筋脱力を抑制的に制御すると示されている (Weber et al., 2018)。

本研究では、①SLD から VMM に投射するグルタミン作動性ニューロン (Glu^{SLD-VMM}) の上流の同定と②ナルコレプシーモデルマウスにおいて GABA^{vlPAG} を特異的に興奮させることで、カタプレキシーの表出に関わる神経回路を探索する。本研究は情動の高まりに誘発される末梢の筋脱力のメカニズムのみならず、レム睡眠の制御に関わる神経回路の解明に貢献できると期待される。

【方法】

実験動物の作製

グルタミン酸作動性ニューロン特異的に Cre を発現する *vGlut2-ires-Cre* マウスおよび *Vgat-ires-Cre; orexin-ataxin3* マウスを用いた作製した。*Vgat-ires-Cre; orexin-ataxin3* マウスは、GABA 作動性ニューロンに特異的に Cre を発現する *Vgat-ires-Cre* ホモマウスとオレキシンニューロンを後天的に脱落したナルコレプシーモデルマウス (*orexin-ataxin3* マウス) の交配により作製した。これらのマウスは 12/12 h 明暗サイクルの飲水・摂餌が自由な環境下で管理された。

逆行性トレーシング (cTRIO)

偽狂犬病ウイルスを用いた cTRIO 法により、Glu^{SLD-VMM} ヘシナプス入力する一段階のみ上流のニューロンを標識した。*vGlut2-ires-Cre* マウスの SLD に TVA-mCherry、RG を発現する FLP 依存性アデノ随伴ウイルス (AAV) を、VMM に Cre 依存的に FLP を発現する逆行性ウイルスを注入した。2週間後、EGFP を発現する偽狂犬病ウイルス (*SADΔG-EGFP(EnvA)*) を SLD に注入した。このウイルスは TVA・RG 発現細胞に感染し、逆行性経シナプス移動により入力ニューロンに EGFP を発現する。

厚さ 80 μm (全体の 1/3) の冠状脳切片の免疫組織化学染色により、mCherry+ GFP+細胞 (開始ニューロン) の数・分布と GFP+

細胞 (入力ニューロン) の数・分布を数え、Glu^{SLD-VMM} の上流の領域を探索した。

薬理遺伝学的手法及び睡眠の解析

生後 12~20 週齢の *Vgat-ires-Cre; orexin-ataxin3* マウスの vlPAG に Cre 依存的に hM3Dq-mCherry を発現する AAV を注入した。hM3Dq は人工リガンド CNO (Clozapine-N-Oxide) に反応して神経を興奮する受容体の一種である。さらに、脳波 (EEG) 及び筋電図 (EMG) 測定のため、脳表に電極、僧帽筋にステンレス鋼線を取り付けた。1週間以上の回復期間の後、ケージおよび睡眠測定機器 (1週間)、腹腔内注射 (3回) 及びチョコレート (1回) の馴化を行った。情動の高まりによるカタプレキシーの多発条件を誘導し、その量の変化を容易に可視化するため、チョコレートを用いた (Oishi et al., 2013)。

暗期 30 分前にチョコレートをケージに入れ、CNO (1.5mg/kg) または Saline (対照群) の腹腔内注射を行い、暗期 12 h の EEG・EMG を記録した。睡眠解析ソフト SleepSign を用いて、データを 10 秒ごとのエポックで区切り、暗期 12 h の睡眠覚醒状態 (覚醒・NREM、REM、カタプレキシー) を判定した。

【結果】

Glu^{SLD-VMM} の上流の同定

vGlut2-ires-Cre マウスで逆行性トレーシング (cTRIO) を行った結果、広範な領域で入力ニューロンが観察できた。特に、vlPAG、mRt、PnO、LDTg、Zi、等で多く観察され、これらの領域のニューロンが Glu^{SLD-VMM} に多くの投射を送っていることが示された。

GABA^{vlPAG} の興奮によるカタプレキシーの変化

Vgat-ires-Cre; orexin-ataxin3 マウスで GABA^{vlPAG} を興奮させた結果、暗期におけるカタプレキシーの量が減少した。一方、覚醒、NREM、REM の総量には有意差がみられなかった。

【考察】

Glu^{SLD-VMM} の上流領域は同定できたが、それらがどのような特性のニューロン (例えば、GABA 作動性等) であるかは同定できてない。また、各々の上流領域がカタプレキシーのメカニズムにどのような役割を果たすかについてはこれまで報告されておらず、今後検討すべき課題である。

GABA^{vlPAG} の人為的な興奮によってカタプレキシーが抑制されたことから、これらのニューロンはカタプレキシーの表出時に抑制されていることが示唆される。これらのニューロンは SLD の他にも様々な領域に投射しており、GABA^{vlPAG} の興奮によるカタプレキシーの抑制効果が SLD を介するかは不明である。したがって、光遺伝学や逆行性ウイルスを用いて投射先選択的に神経活動を操作することで、詳細な神経回路の同定を行う予定である。さらに、今回 hM3Dq-mCherry の発現が vlPAG 近傍の mRt で顕著に観察されたため、本実験の結果が mRt の GABA ニューロンの興奮によって生じた可能性が考えられる。今後、より正確なウイルス注入を工夫するとともに mRt の GABA ニューロンの活動がカタプレキシーに与える影響を検証する必要がある。