

## 論文要旨

### 視床下部オレキシンニューロンの機能維持に影響を及ぼす要因の解析

道永昌太郎

ナルコレプシーは、睡眠・覚醒の破綻をきたす神経疾患である。近年、視床下部のニューロペプチドであるオレキシンが本疾患の病態に深く関与することが明らかとなった。すなわち、ナルコレプシー患者ではオレキシンニューロンの選択的減少が認められ、オレキシン欠損マウスやオレキシンニューロン変性マウスではナルコレプシー様の症状が現れることから、オレキシンニューロンの減少がナルコレプシーの本態であることが示唆されている。しかし、オレキシンニューロンの選択的減少に至る原因や機序についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、オレキシンニューロンの病態生理学的性質に着目し、ラット視床下部培養組織切片を用いて以下の検討を行った。

#### 1. 神経活動に依存した視床下部オレキシンニューロンの機能維持

これまでの研究により、ニューロンの脱分極を引き起こすような興奮性刺激を持続的に与えると、視床下部組織切片中のオレキシンが選択的に枯渇するという結果が得られており、神経活動レベルがオレキシンニューロンの機能維持に重要であることが推察される。そこで、神経活動の持続的な遮断がオレキシンニューロンの生存および機能維持に与える影響について検討した。神経活動を強く抑制するテトロドトキシン(TTX)や $Mg^{2+}$ を処置すると、切片中のオレキシン陽性細胞は顕著に減少し、その一方で近傍に存在するメラニン凝集ホルモン(MCH)陽性細胞の減少はほとんど認められなかった。TTX や  $Mg^{2+}$ の処置後の切片中で細胞死の兆候はみられず、またオレキシン陽性細胞の減少は可逆的であったことから、オレキシンの消失はオレキシンニューロンの細胞死や脱落によるものではなく、細胞内のオレキシンの枯渇によることが示唆された。また、種々の  $Ca^{2+}$ チャネル遮断薬や NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬を処置した場合においても、切片中のオレキシンは選択的に減少した。さらに、TTX によるオレキシンの減少は NMDA の共処置により著明に抑制された。これらの結果より、オレキシンニューロンは視床下部に局在する他のニューロンよりも神経活動の遮断による影響を受けやすく、オレキシンの発現は NMDA 受容体刺激および細胞内への  $Ca^{2+}$ 流入により維持されていることが示唆された。

#### 2. パーキンソン病治療薬ロピニロールによるオレキシンの選択的な減少

パーキンソン病治療薬として頻用されるロピニロールなどの非麦角系ドパミン  $D_2$  受容体アゴニストは、重大な副作用として突発性睡眠を生じる場合があるが、その詳細な原因は解明されていない。そこで、覚醒の維持において重要な役割を担うオレキシンニ

ニューロンに対するロピニロールの作用を検討した。ロピニロール(100  $\mu$ M~1 mM)を処置すると、視床下部組織切片中のオレキシン陽性細胞は顕著に減少し、MCH 陽性細胞の減少はほとんど認められなかった。ロピニロール処置後の切片中に細胞死の兆候はみられず、オレキシンの減少も可逆的であったことから、ロピニロールはオレキシンニューロンの細胞死を誘導せず、オレキシンを枯渇させることが示唆された。また、ロピニロールによるオレキシンの減少はドパミン D<sub>2</sub> 受容体およびセロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の遮断薬を処置することで抑制され、これらの受容体の関与が明らかとなった。さらに NMDA の共処置は、ニューロンの興奮マーカーである c-Fos の発現を増加させるとともに、ロピニロールによるオレキシンの減少を抑制した。これらの結果より、オレキシンニューロンは非麦角系ドパミン D<sub>2</sub> 受容体アゴニストの影響を受けやすく、これら薬物は神経活動の抑制を介してオレキシンの発現を減少させることが示唆された。

### 3. 視床下部オレキシンニューロンの小胞体ストレス感受性の解析

小胞体ストレスは、パーキンソン病など特定のニューロンの変性・脱落が認められる神経変性疾患の病態形成に関与することが示唆されている。そこで、小胞体ストレスがオレキシンニューロンに与える影響について検討した。小胞体ストレスを誘導する tunicamycin あるいは thapsigargin を処置すると、視床下部組織切片中のオレキシン陽性細胞は MCH 陽性細胞よりも著明に減少した。この細胞数の減少がアポトーシスによるかを調べたところ、活性型カスパーゼ-3 の発現は tunicamycin の 24 時間処置では誘導されず、72 時間処置では著明に増加した。つまり、小胞体ストレスが生じると細胞内のオレキシンは速やかに枯渇し、小胞体ストレスが持続するとオレキシンニューロンのアポトーシスが誘導されることが示唆された。また、小胞体ストレスによりオレキシンが枯渇する原因について調べたところ、翻訳の抑制およびプロテアソーム系による分解に関与することが示唆された。さらに、tunicamycin 処置による小胞体ストレス応答関連分子の発現変化を調べたところ、翻訳抑制に関与するリン酸化 PERK および細胞傷害性の転写因子である CHOP の発現は、オレキシンニューロンの方が MCH ニューロンよりも顕著であった。オレキシンニューロンにおける CHOP の発現は、小胞体ストレスを誘導する一酸化窒素ドナーやプロテアソーム阻害薬の適用、細胞内のグルコース枯渇によっても誘導された。これらの結果より、オレキシンニューロンは視床下部に局在する他のニューロンよりも小胞体ストレスに対する感受性が高く、小胞体ストレスによる傷害を受けやすいことが示唆された。

以上、本研究により、オレキシンニューロンは他のニューロンよりも様々な刺激による影響を受けやすく、オレキシンの発現は変動しやすいことが示唆された。このようなオレキシンニューロンの特性は、ナルコレプシーにおいて認められるオレキシンニューロンの選択的減少に関与する可能性があり、本疾患の病理形成機序を解明する上で重要な示唆を与えるものである。