

オレキシンニューロンによる覚醒安定化機構

第50回 函館臨床動脈硬化診断フォーラム

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 櫻井 武

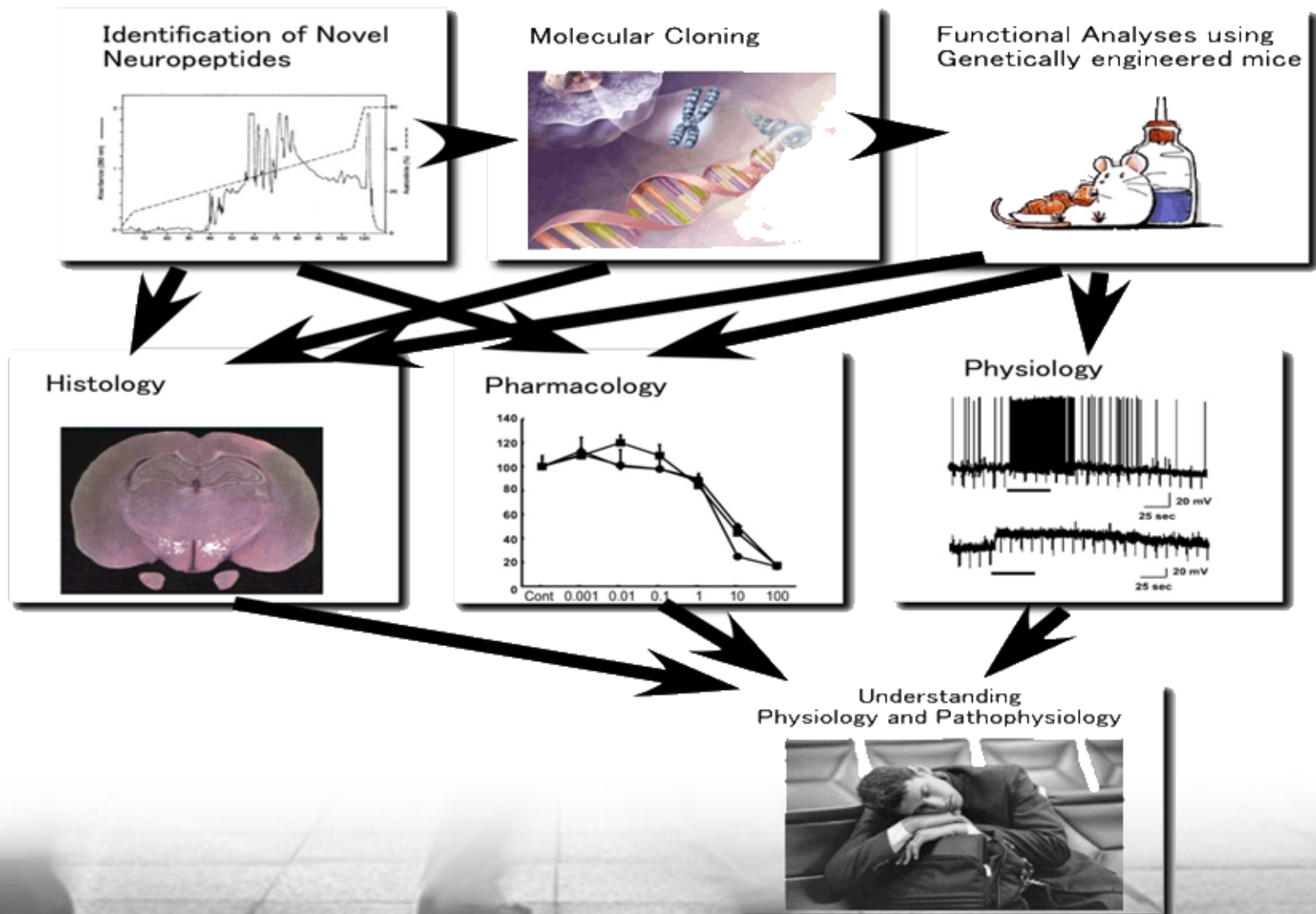


Takeshi Sakurai, M.D., Ph.D.

Dept of Molecular Neuroscience & Integrative Physiology

Faculty of Medicine, Kanazawa University

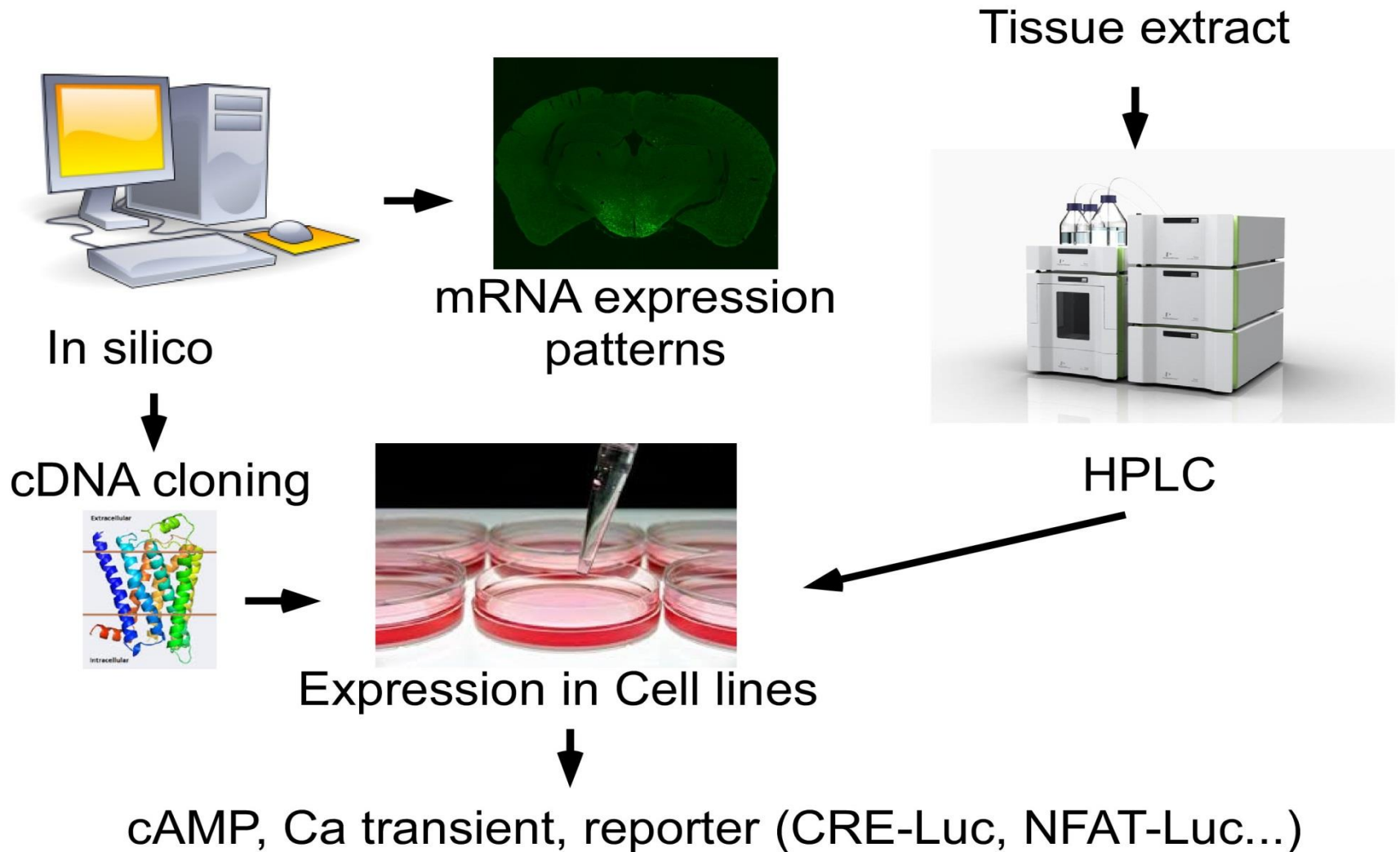
Identification and Characterization of Novel Neuropeptides



逆薬理学

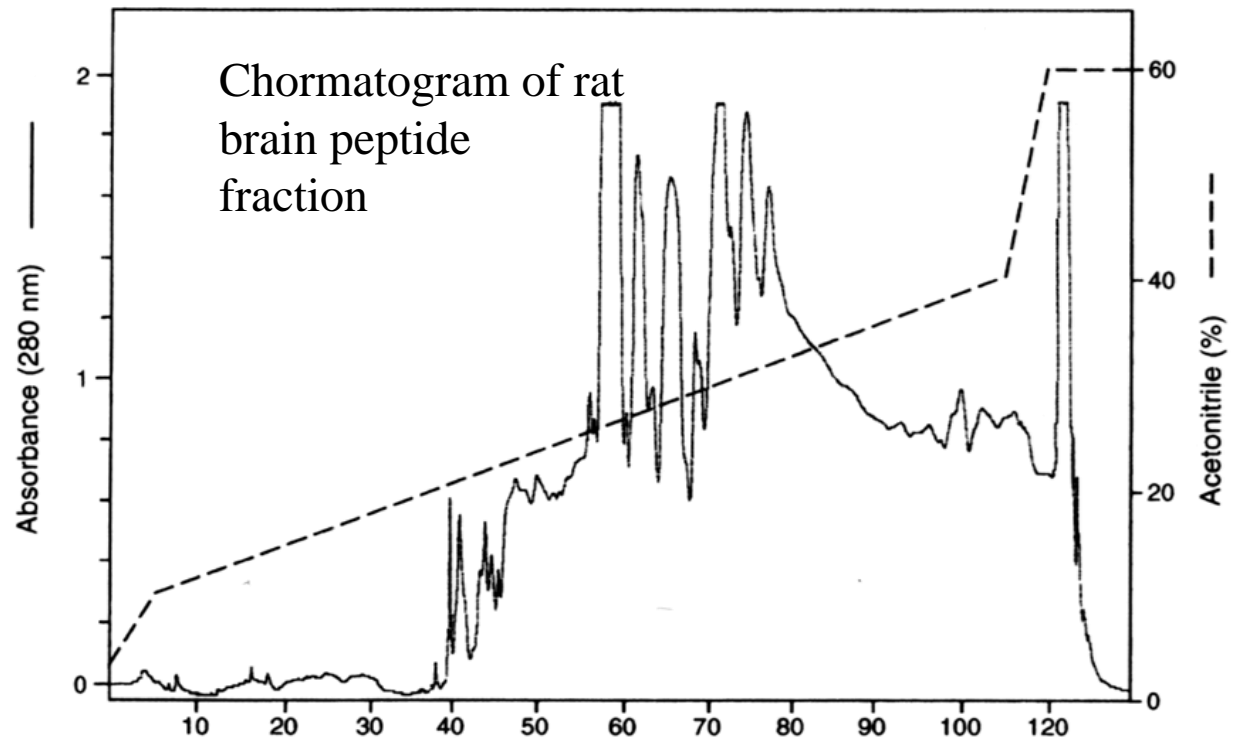
Reverse Pharmacology

Deorphaning of GPCR



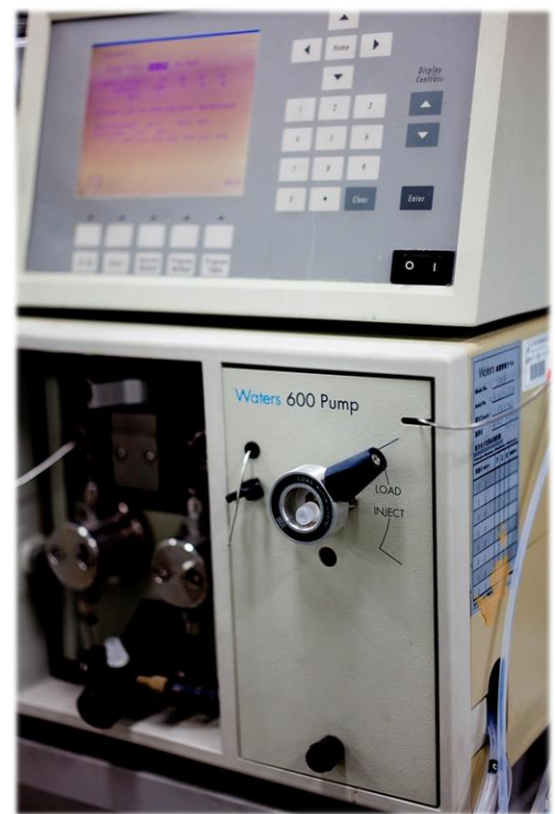
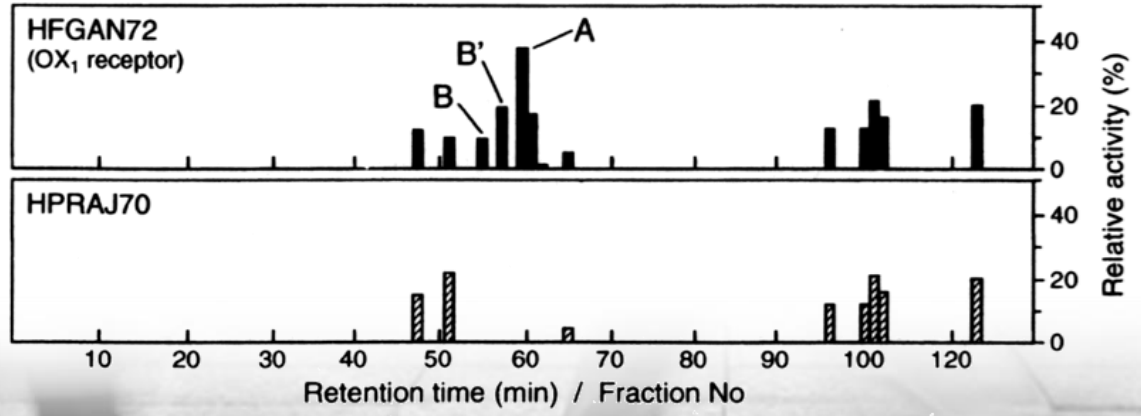


Identification and Purification of the HFGAN-72 Ligands

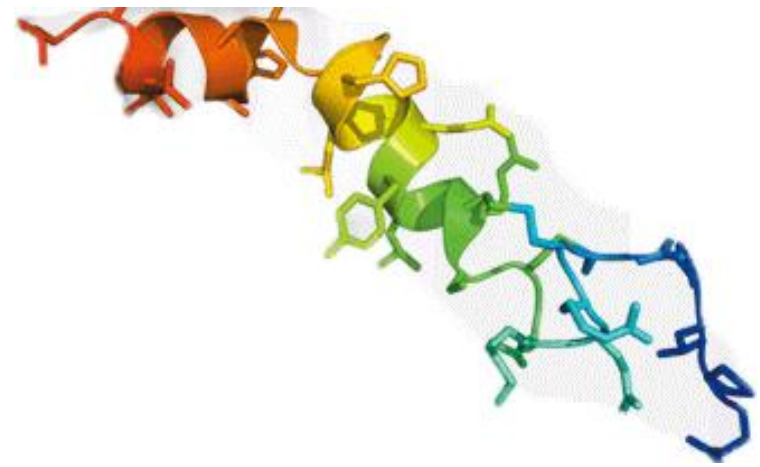


OX1R

Relative values of Peak increments in $[Ca^{2+}]_i$



オレキシンの構造



Orexin-A

<EPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL - NH₂

rat mouse orexin-B

RPGPPGLQGRLQRLQANGNHAAGILTM - NH₂

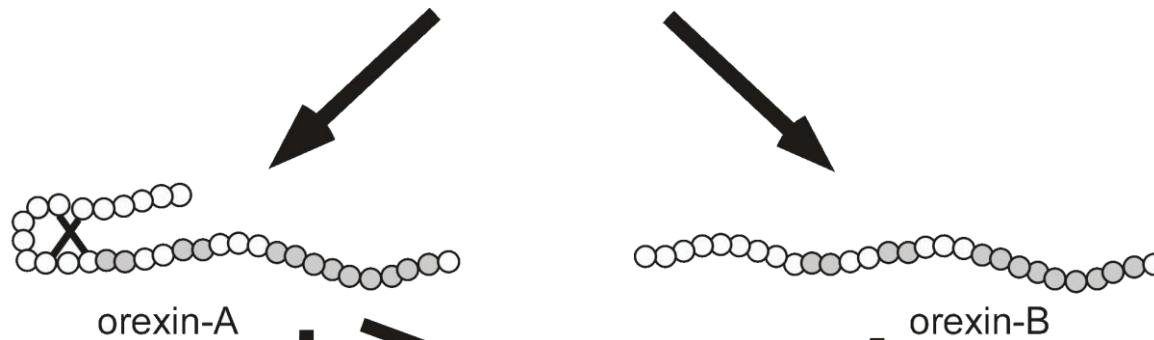
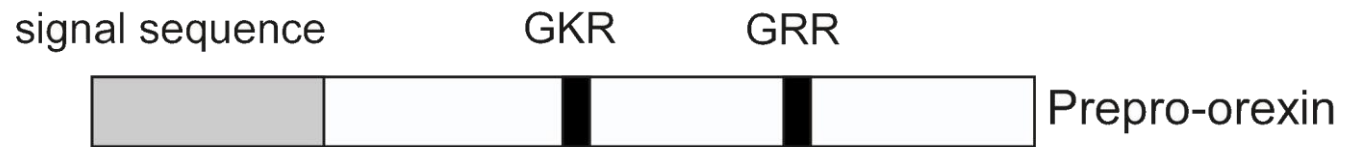
human orexin-B

RSGPPGLQGRLQRLQASGNHAAGILTM - NH₂



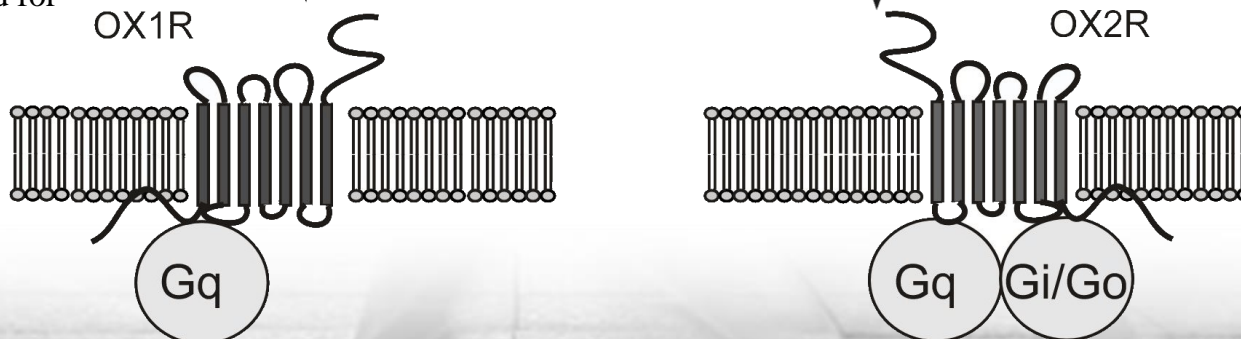
オレキシンとオレキシン受容体

Prepro-orexin



original receptor we used for identification of orexins (HFGAN72)

Orexin Receptors



オレキシンの生理作用

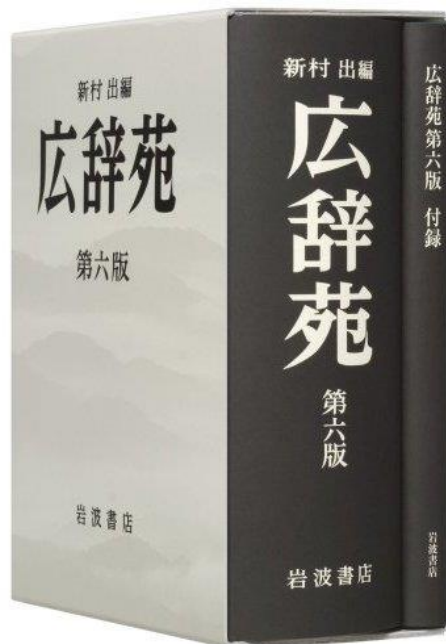
- 食欲の制御 = 摂食行動の亢進
- 睡眠と覚醒の制御 = 安定した覚醒の維持
- 自律神経系の制御 = 交感神経系の亢奮
- 内分泌系の調節 = HPAaxisを刺激
- 報酬系への関与 = 報酬系をサポート
- etc

> 覚醒の安定性

睡眠とは

「動物の体の動きが静止し、外的刺激に対する反応が低下して意識も失われているが、容易に目覚める状態。周期的にくりかえし起こる。脳波の変化を伴い、生命維持に不可欠な現象」

(岩波書店『広辞苑』第六版)



睡眠覚醒ステージと脳波のパターン



眠りの効用

推測されている睡眠の機能

現代人がかかえる睡眠の問題点

- 現在、睡眠に問題を抱える人は5人に一人に上る。
- 労働者の睡眠不足による眠気からくる生産性の低下が日本経済に及ぼす損失は年間3兆5000億円にのぼる。
- 睡眠不足は注意力の低下だけでなく、メタボリックシンドローム、気分障害、アルツハイマー病との関連が示唆されている。

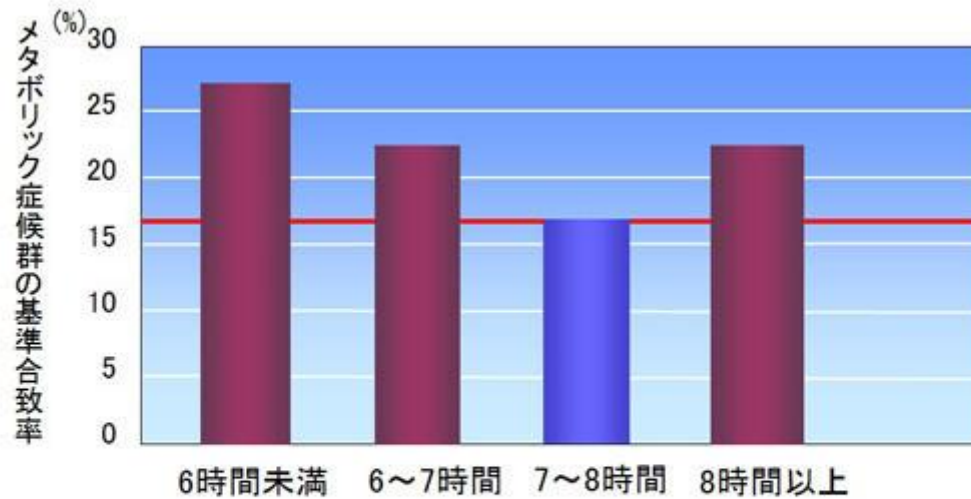
記憶(陳述記憶、手続き的記憶)

免疫機能

エネルギー恒常性

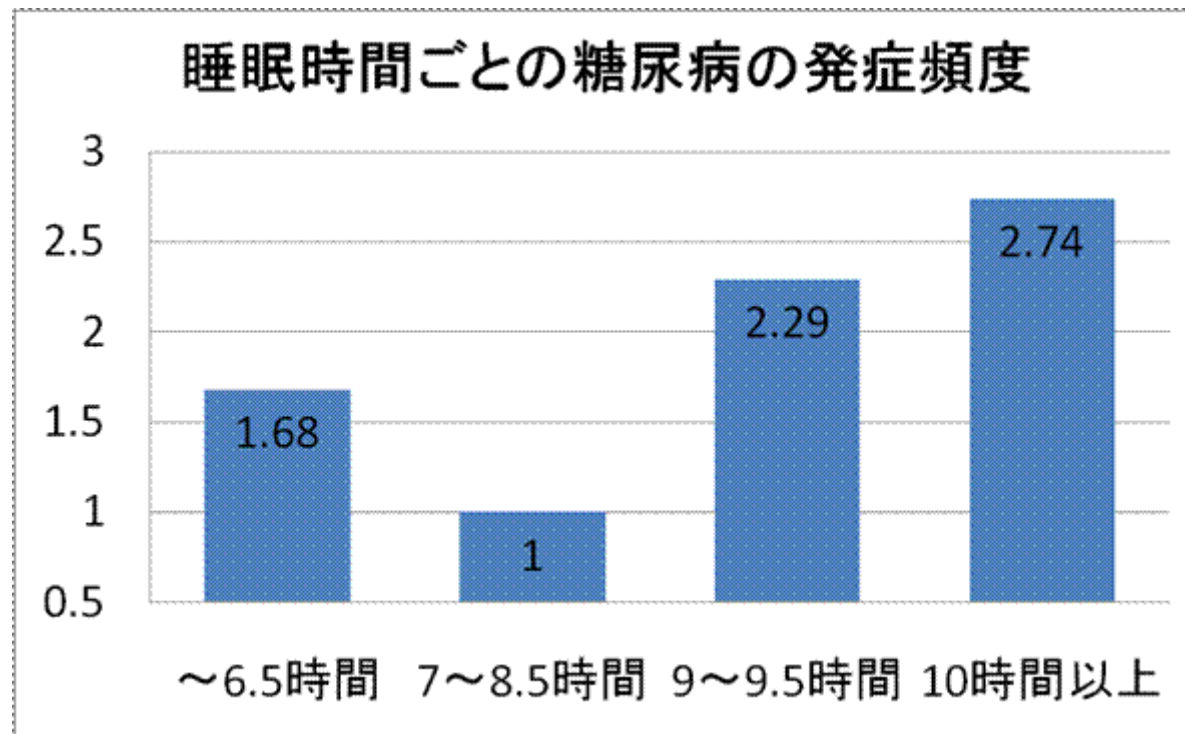
健全な精神機能の維持

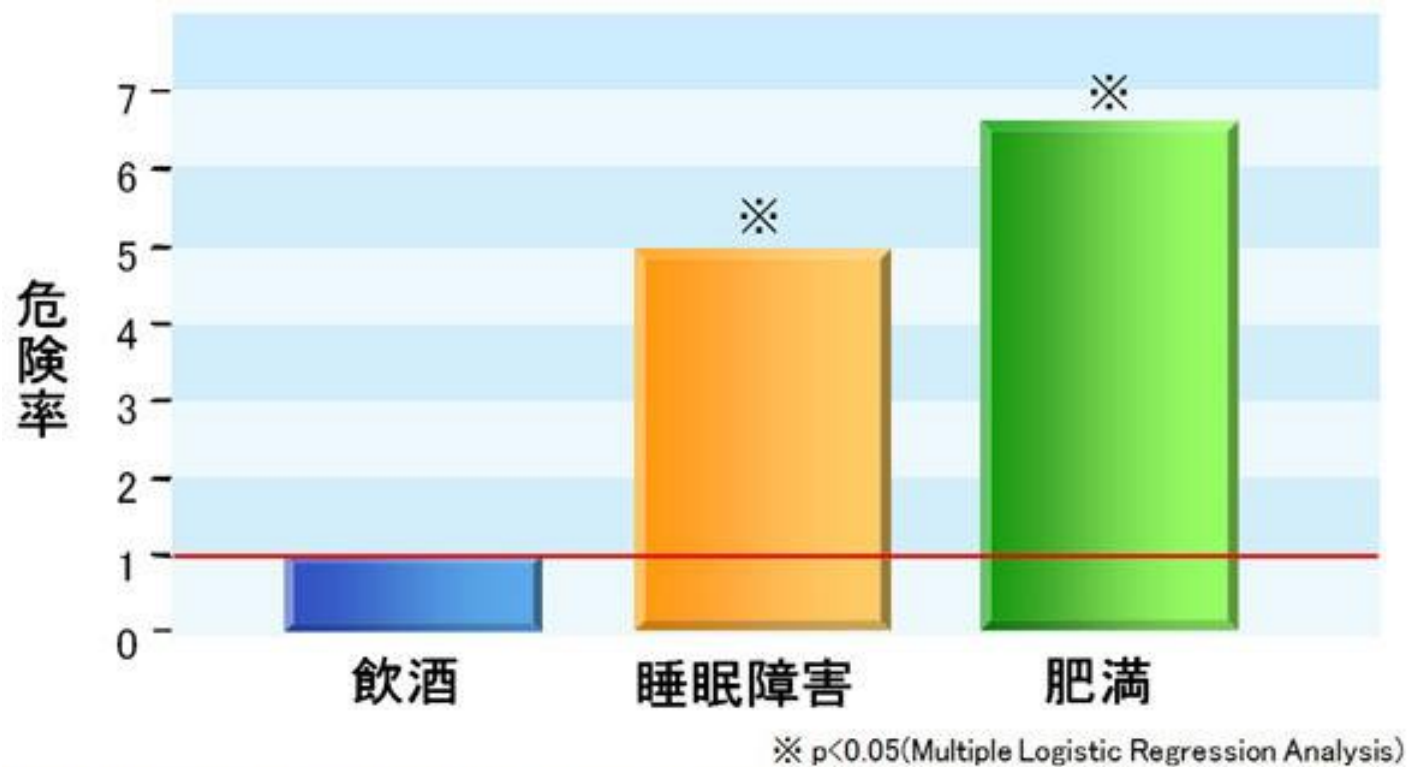




成人1240名(30-54歳)対象の横断的コホート研究。
 週の平均睡眠時間により、超短時間睡眠(<6)、短時間睡眠(6-6.99)、標準(7-8)、長時間睡眠(>8)の4群に分け、標準に対するリスク増加を評価。

Martica HH et al:Sleep 31(5), 635-643, 2008





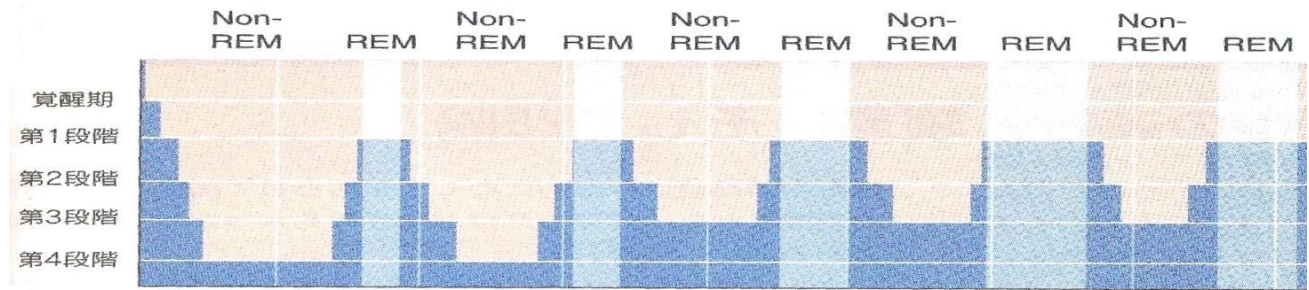
【対象】スウェーデン在住の45～65歳 男性550名
 【方法】1983年および1995年に睡眠状況、考えられる糖尿病の危険因子10項目について質問票を送付し、新規に糖尿病を発症する相対的危険率を求めた。

ヒトは眠るために眠るのではない。活動するために眠るのだ。
ーゲオルク クリストフリ ヒテンベルク

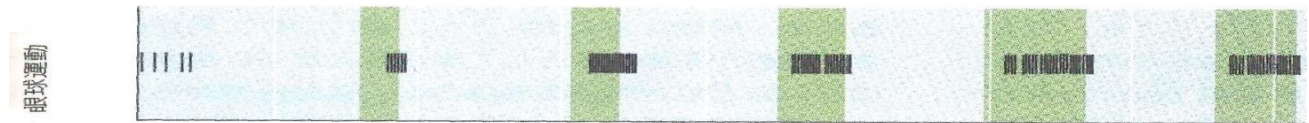


Physiological Parameters during Sleep

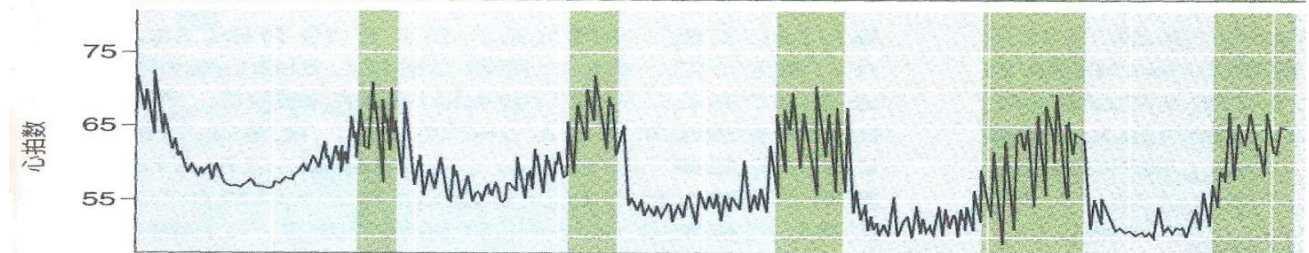
睡眠時の生理的変化



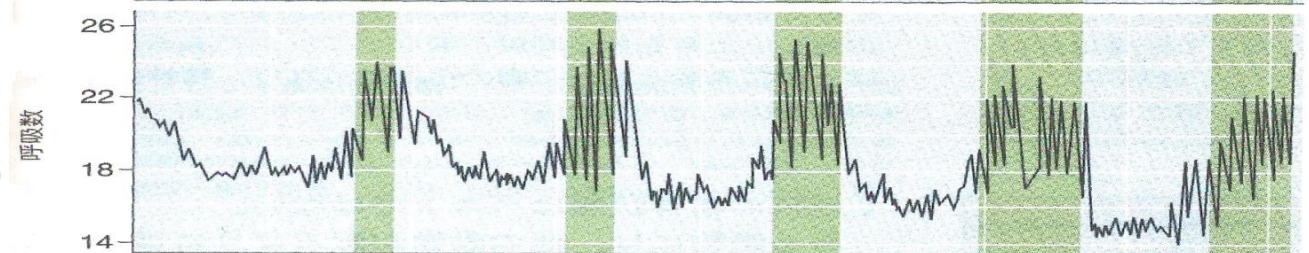
眼球運動
Eye movement



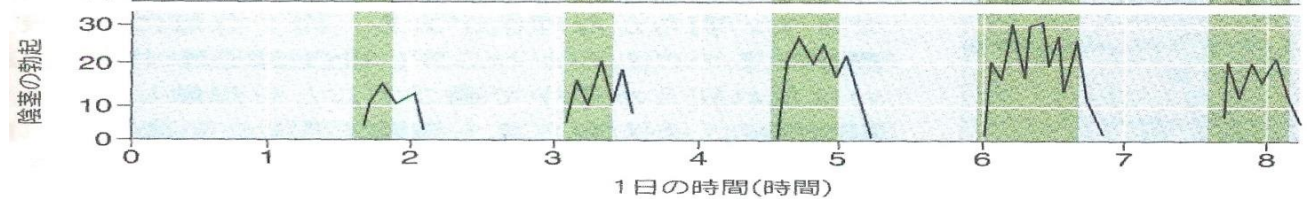
心拍数
Heart Rates



呼吸数
Respiratory Rates



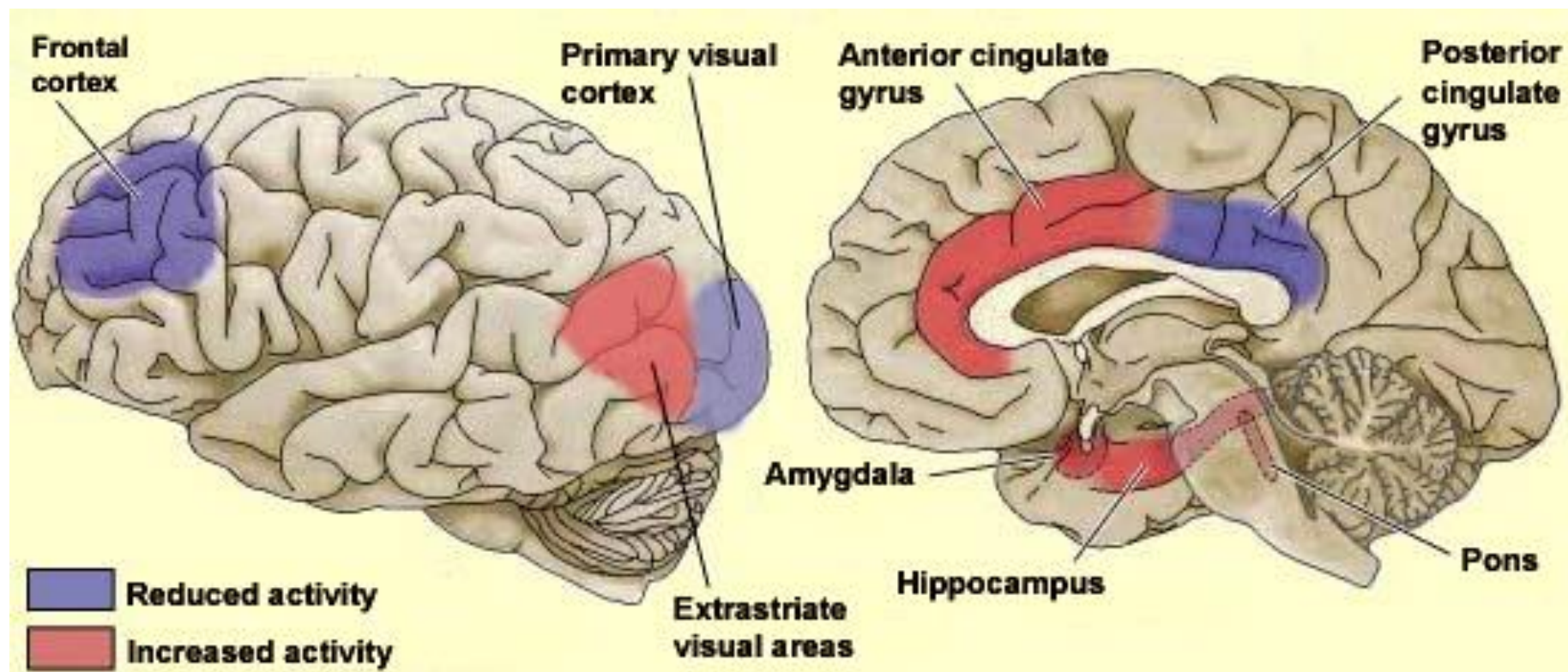
陰茎の勃起
Penile Erection



1日の時間(時間)

Brain Activity during REM sleep

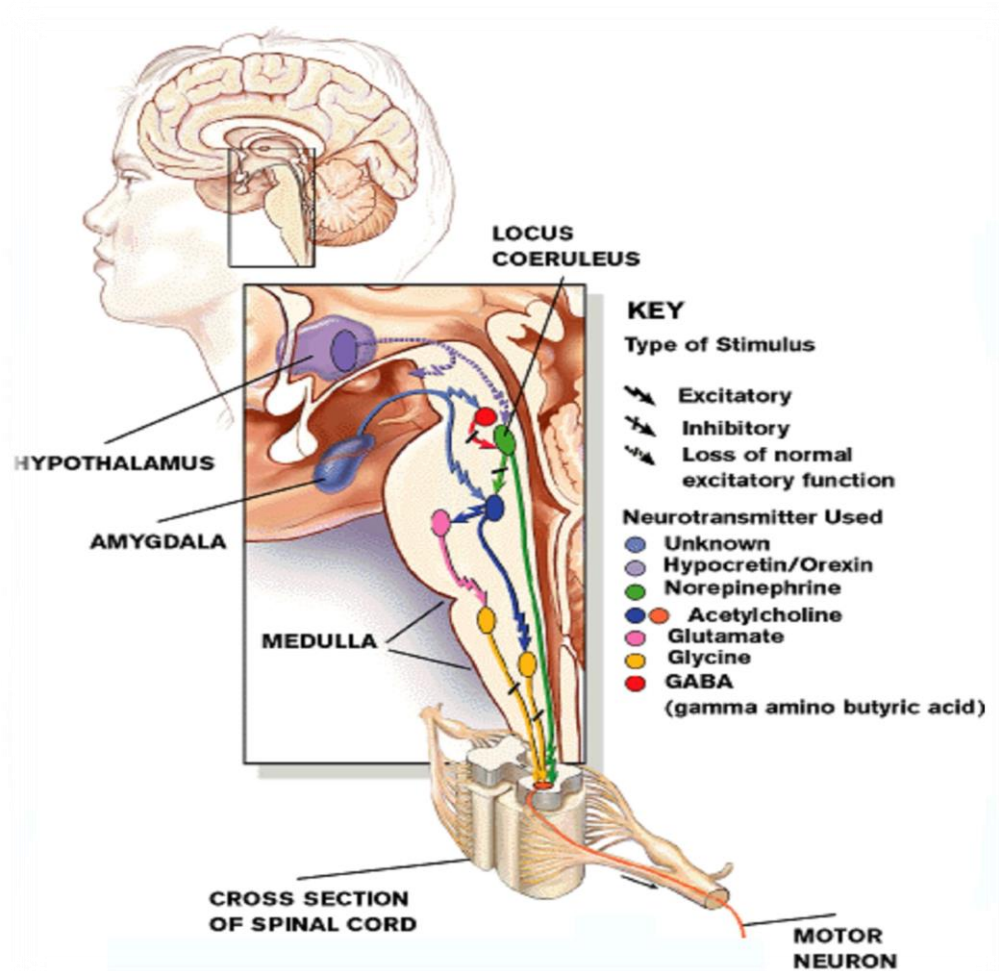
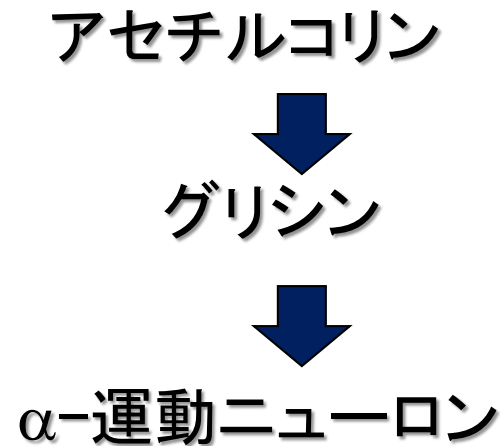
レム睡眠時の脳活動の賦活マップ



大脳辺縁系：扁桃体・海馬・帯状回前部⇒活動上昇
一次視覚野⇒活動低下
高次視覚野⇒活動上昇
前頭葉外背側前頭前野⇒活動低下

REM睡眠時の筋弛緩の発生機序

Mechanism of REM atonia

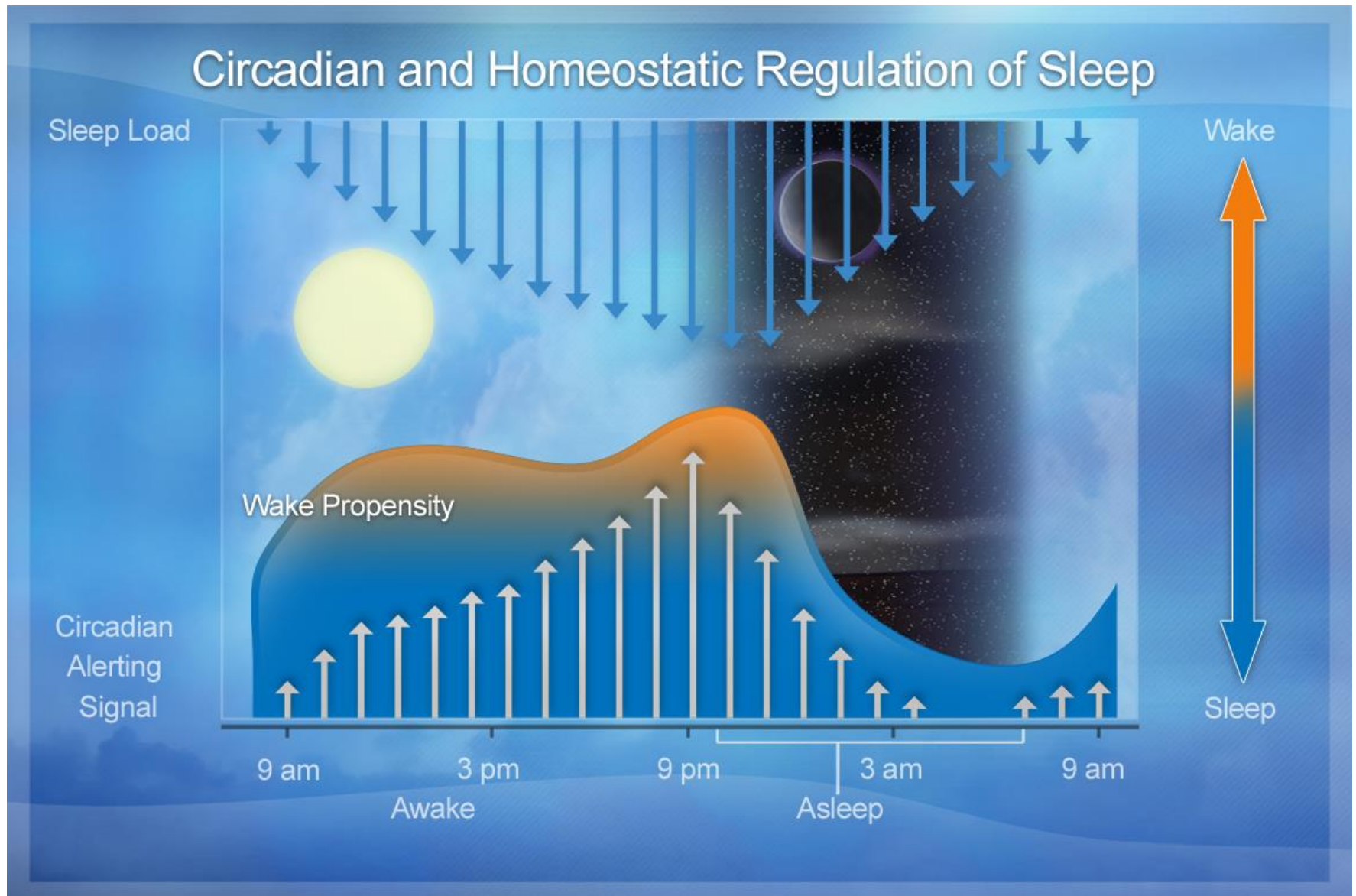


レム睡眠行動障害

REM Behavior Disorder



ツー・プロセスモデル

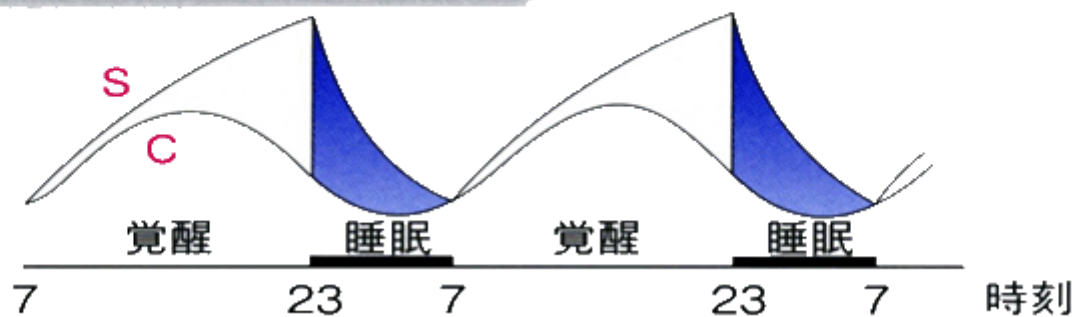


ツー・プロセスモデル

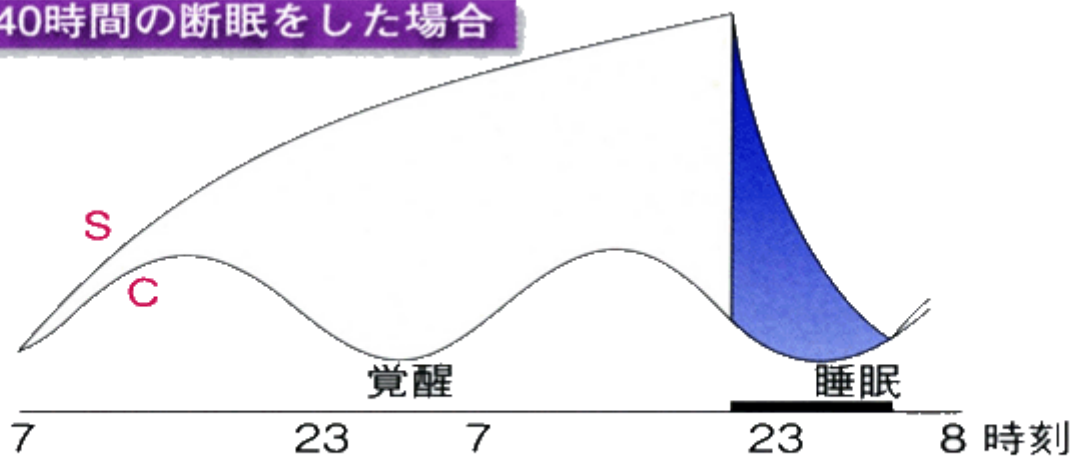
S=睡眠負債(睡眠圧)

C=概日時計

通常の睡眠・覚醒のリズム



40時間の断眠をした場合



Two process model

LTPの分子機構

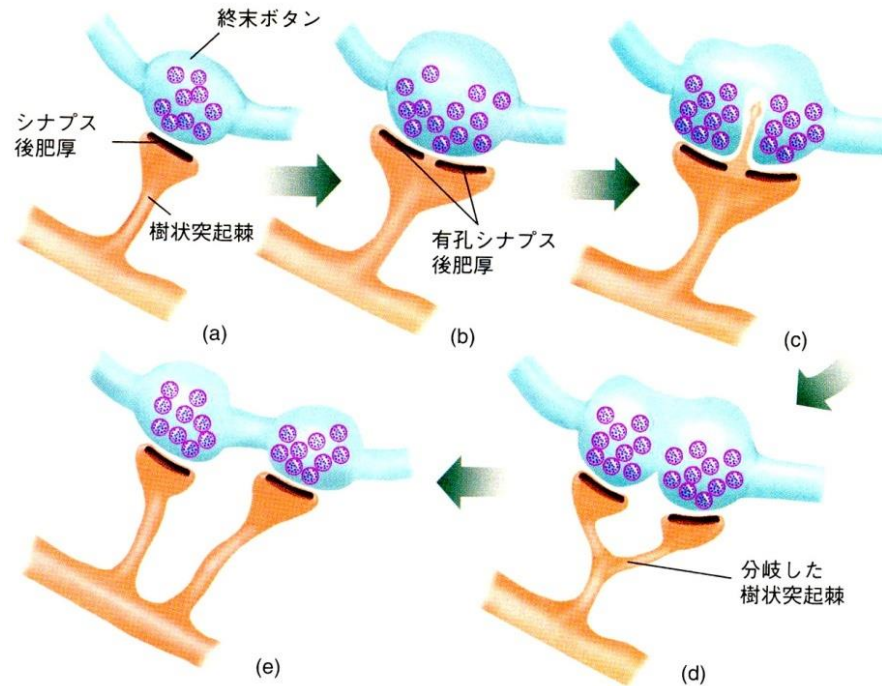
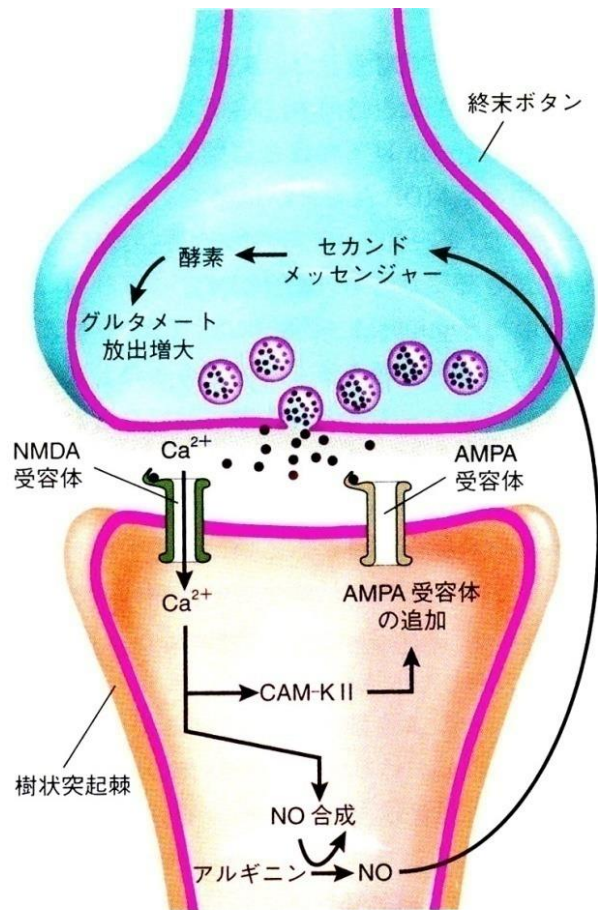
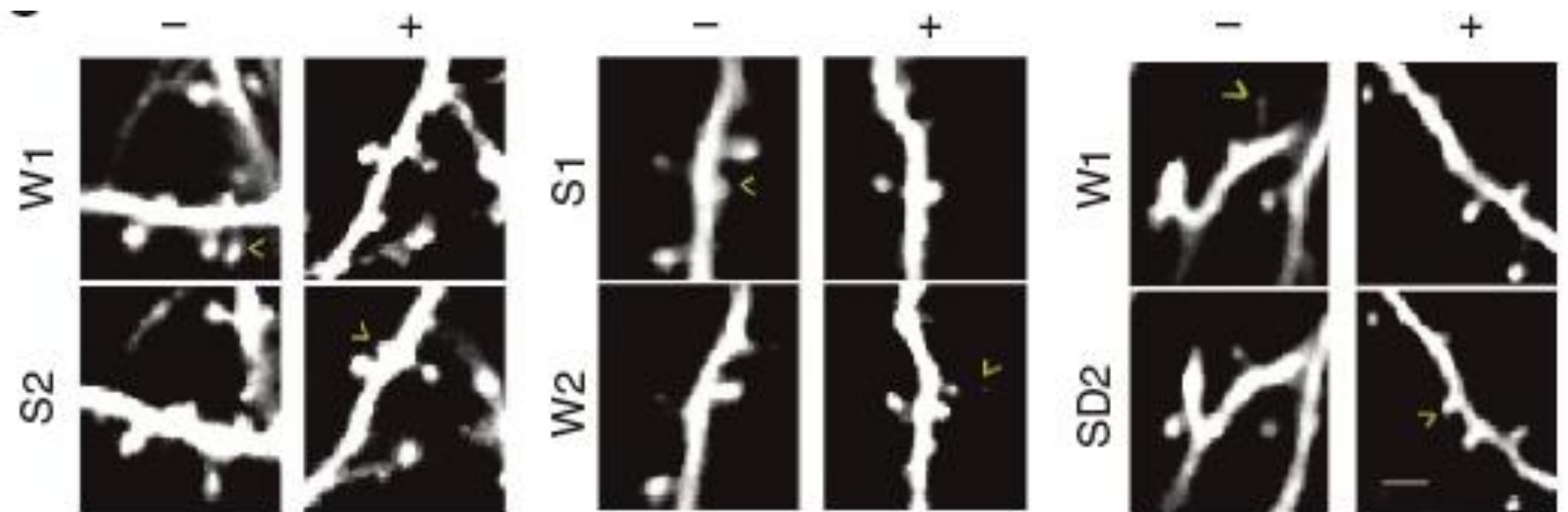


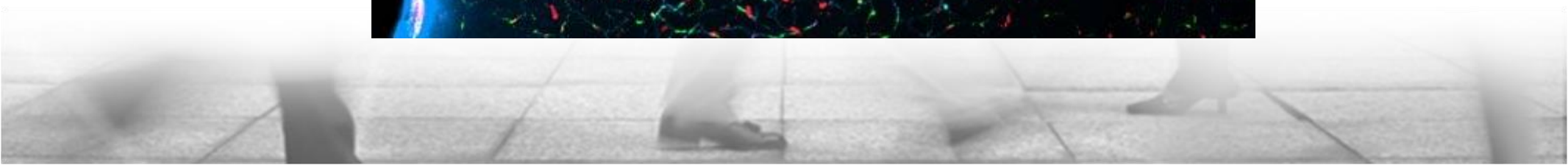
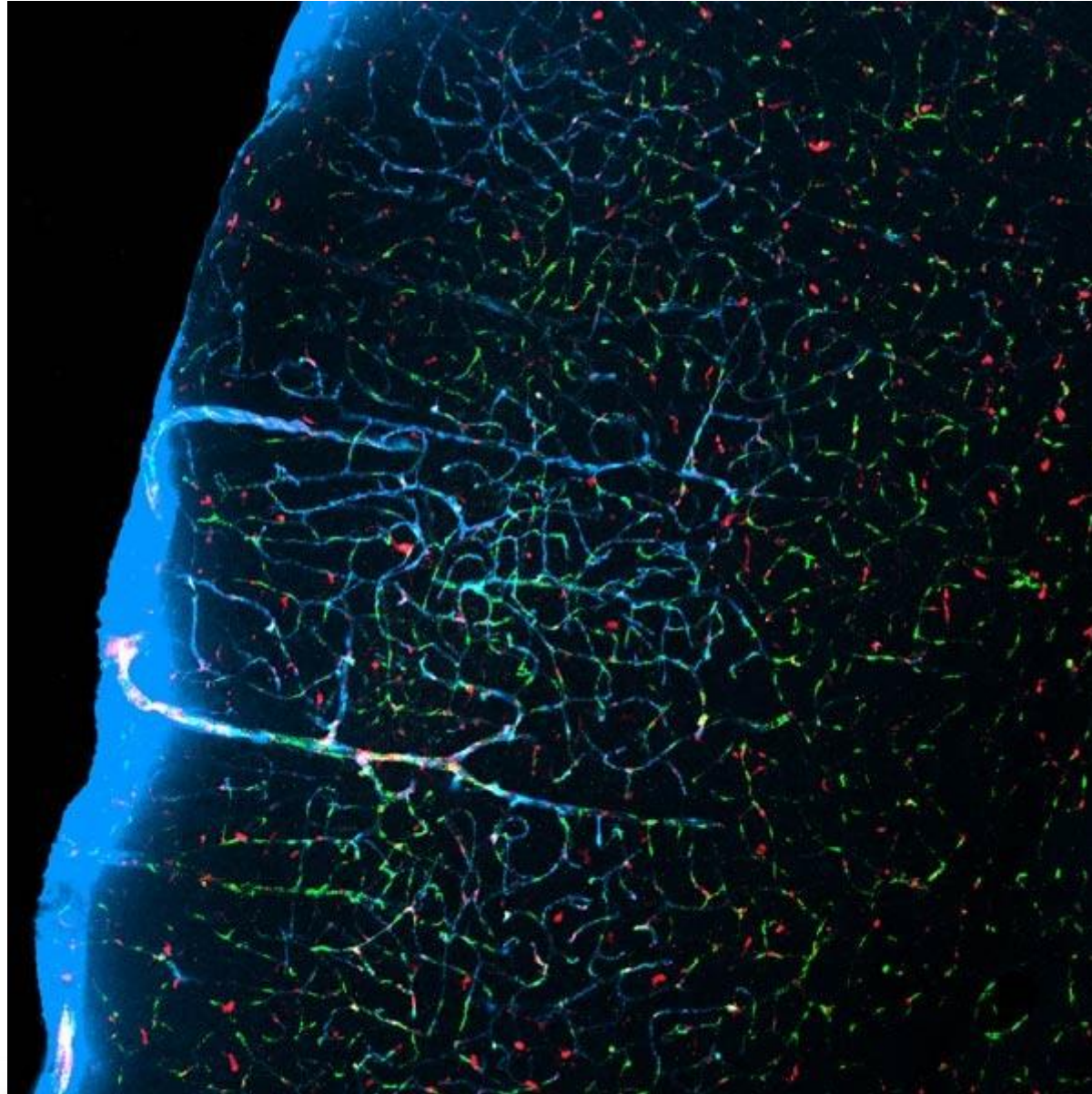
図 13.23

長期増強。樹状突起棘から流入する十分な量の Ca^{2+} によって誘導されると考えられている化学変化のまとめ。

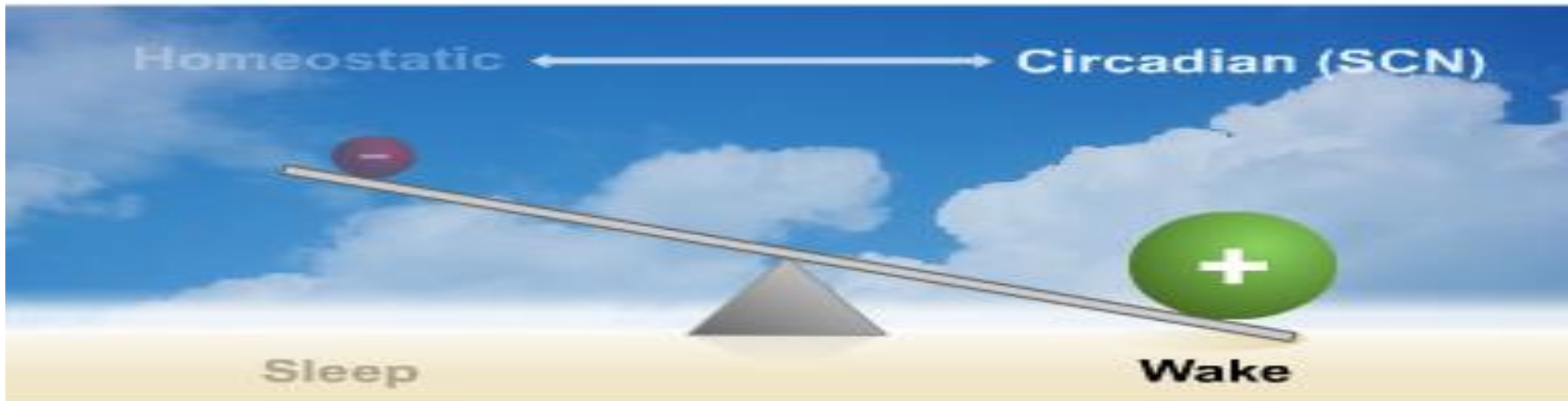
シナプス強度の恒常性維持にノンレム睡眠が重要？



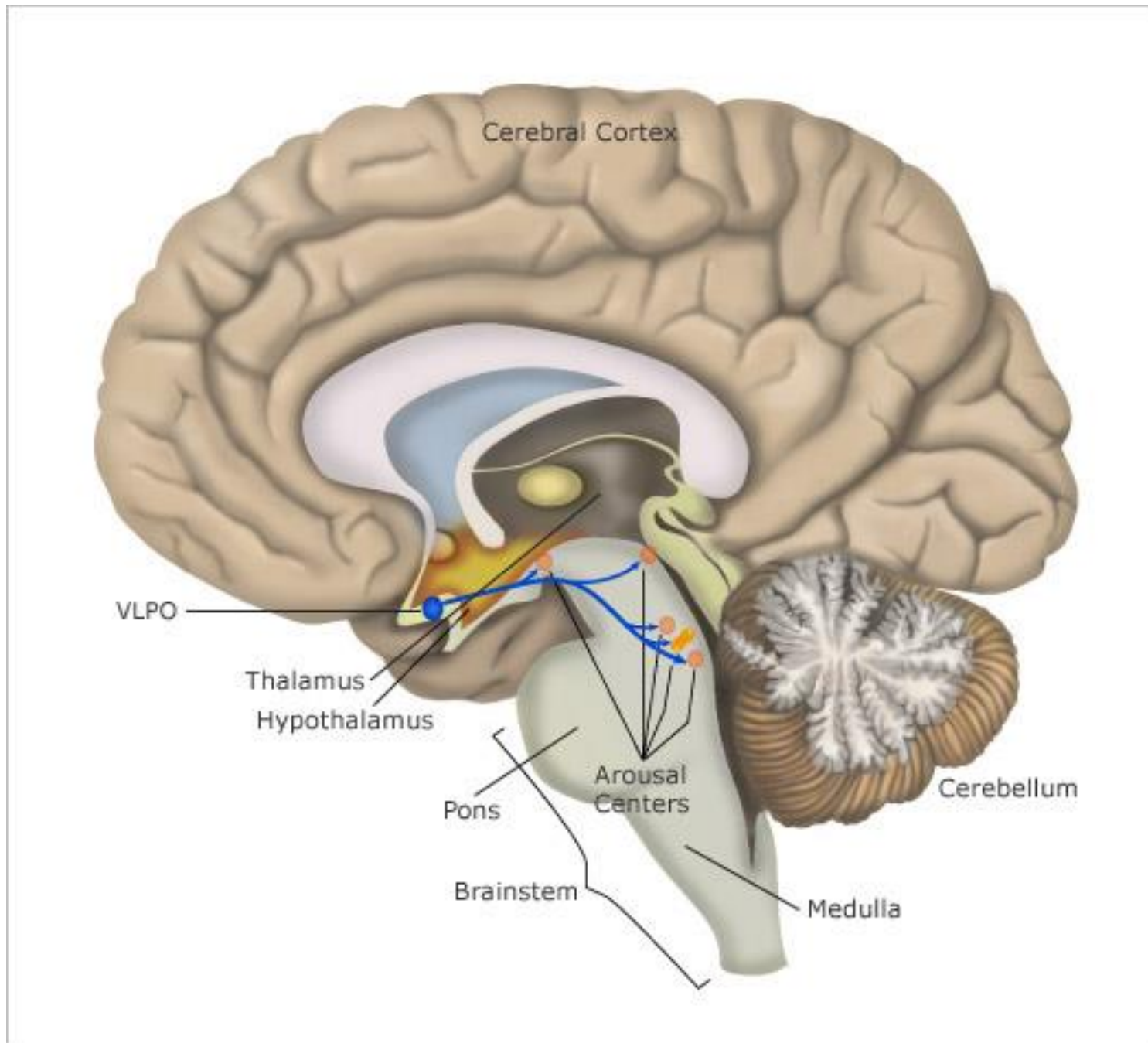
Sleep: The Ultimate Brainwasher?



The Sleep Switch



POA (視索前野) と睡眠

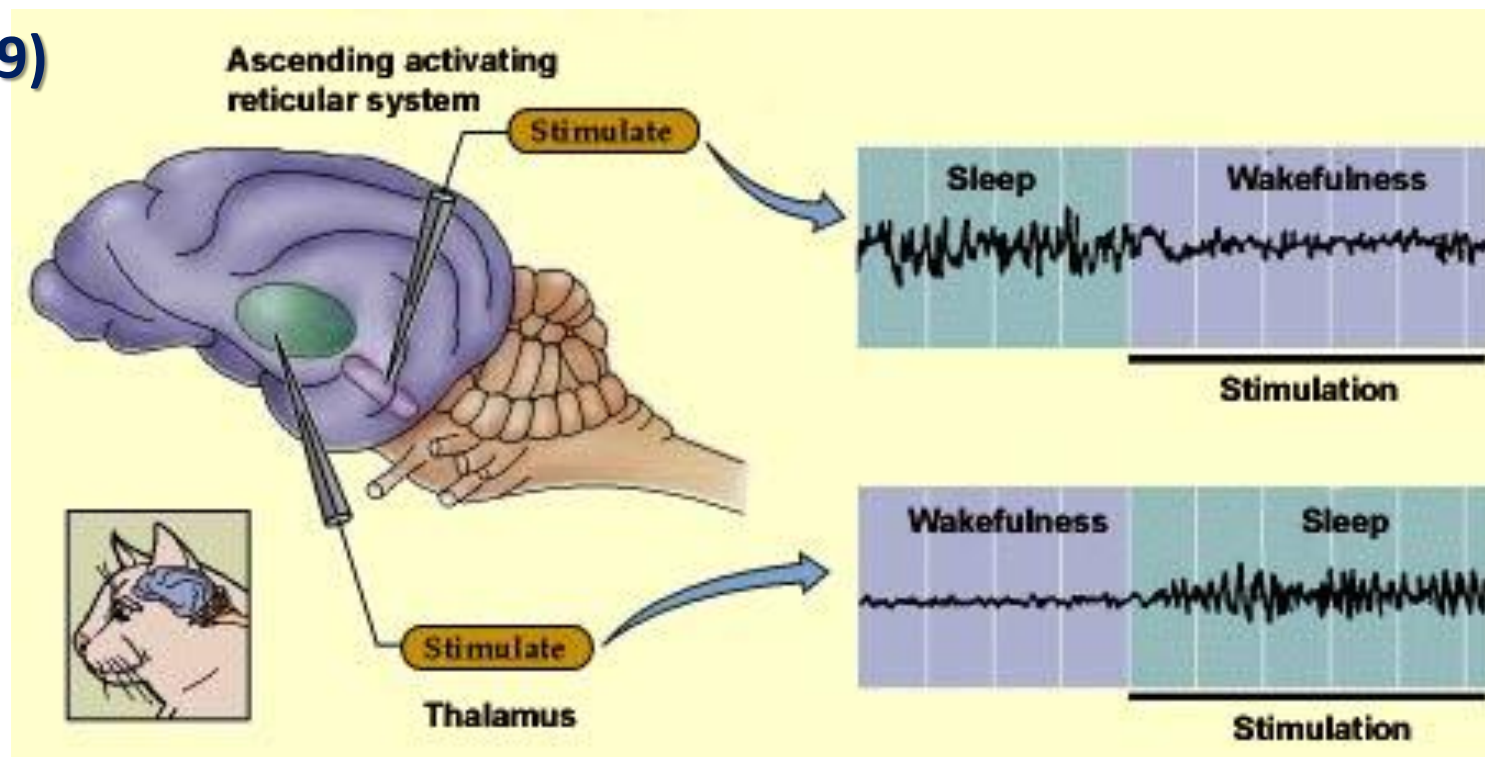


Moruzzi と Magoun : 脳幹の重要性

上行性脳幹網様体賦活系説

Ascending reticular activating system (ARAS) theory

Moruzzi and
Magoun (1949)



スリープステージに対応したモノアミン・コリン作動性ニューロンの発火パターン

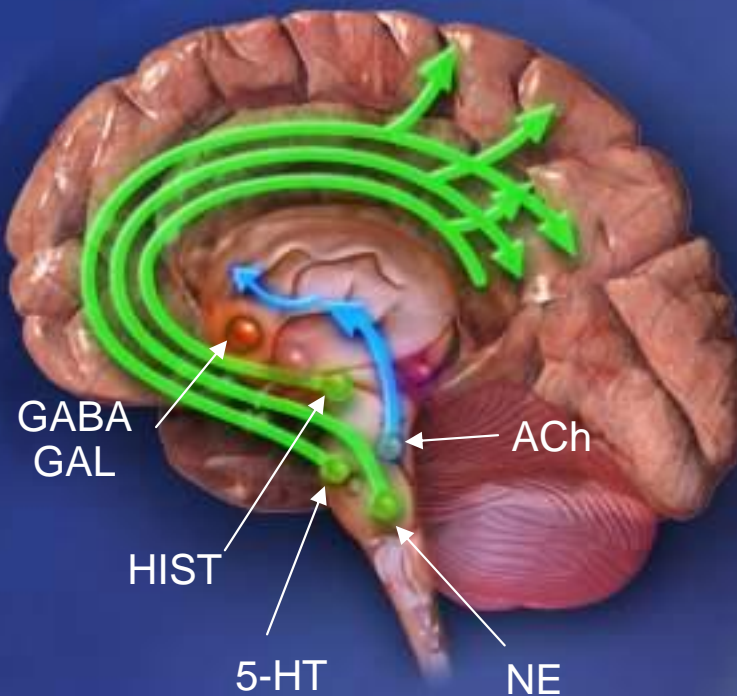
睡眠・覚醒 ステージ	モノアミン作動性 ニューロン	コリン作動性 ニューロン①	コリン作動性 ニューロン②
覚醒	◎	◎	×
ノンレム睡眠	△	△	×
レム睡眠	×	◎	◎

◎…活発に発火(数 Hz)、△…活動低下(< 1Hz)、×…停止

覚醒を制御するシステム

SLEEP

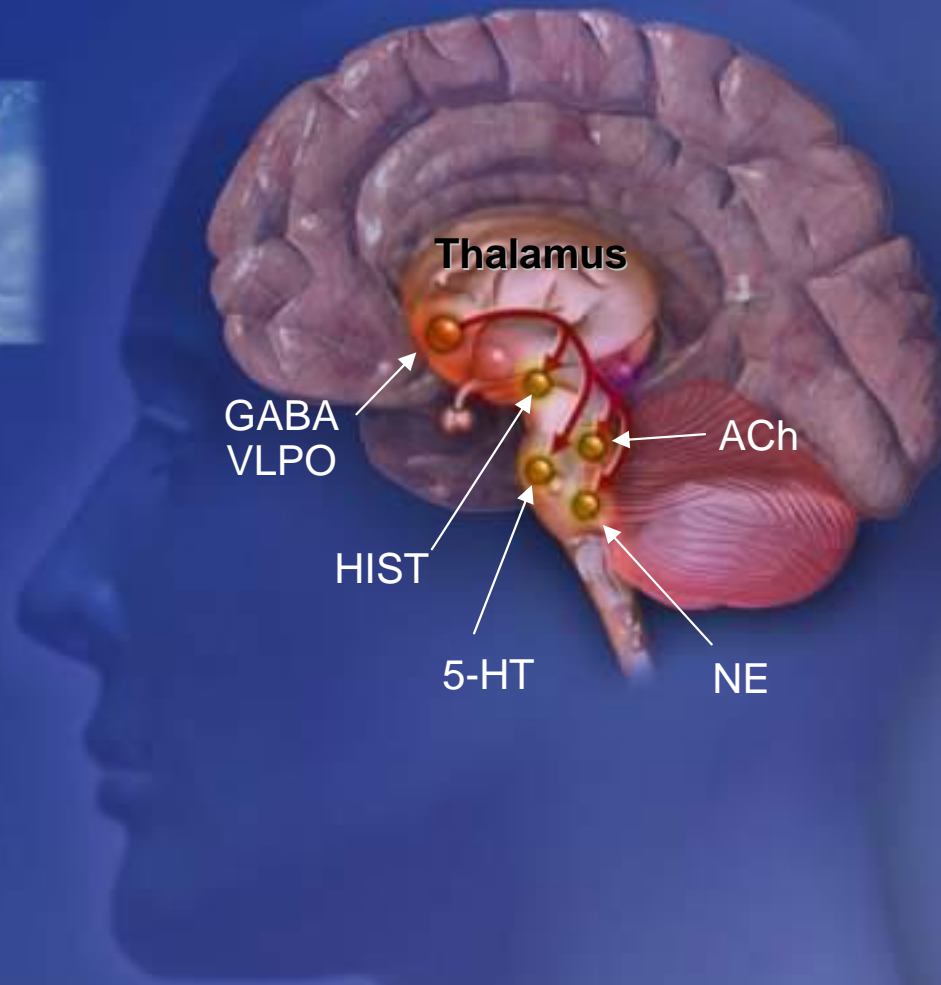
WAKE



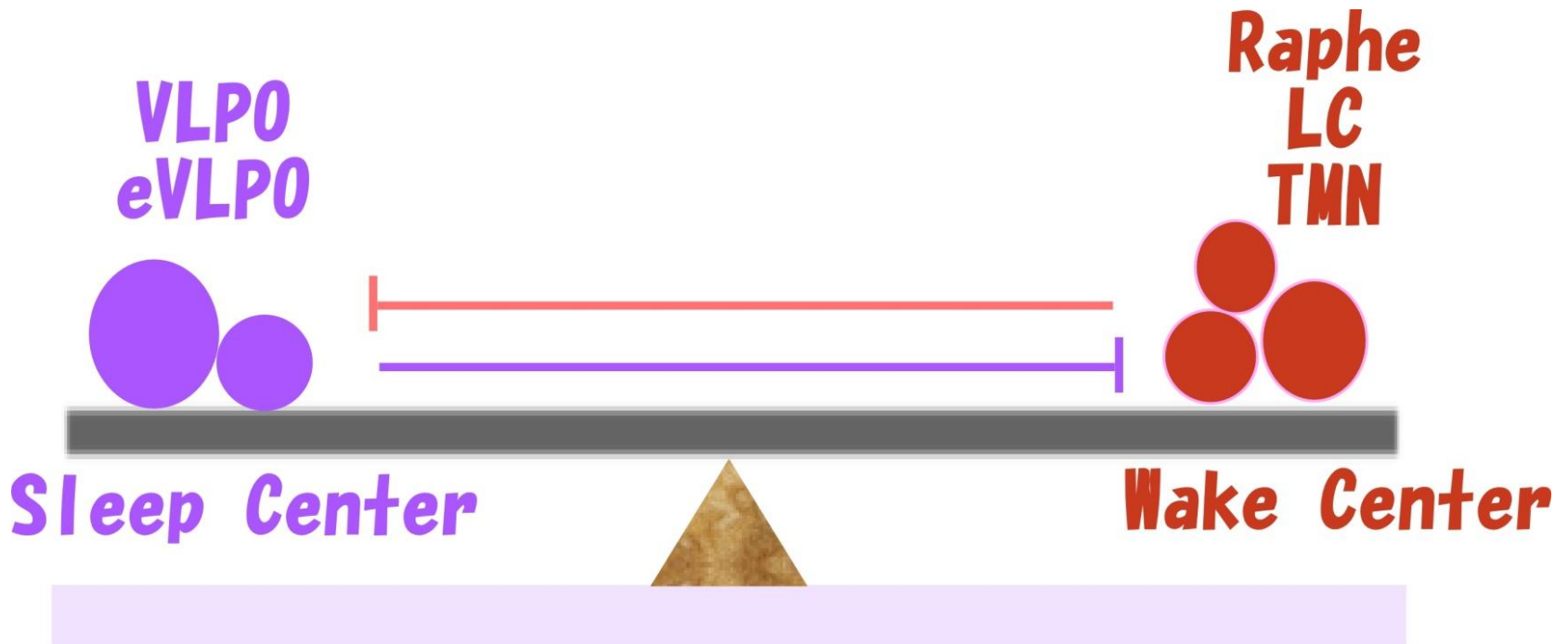
睡眠を制御するシステム

SLEEP

WAKE



睡眠システムと覚醒システムは相互抑制系

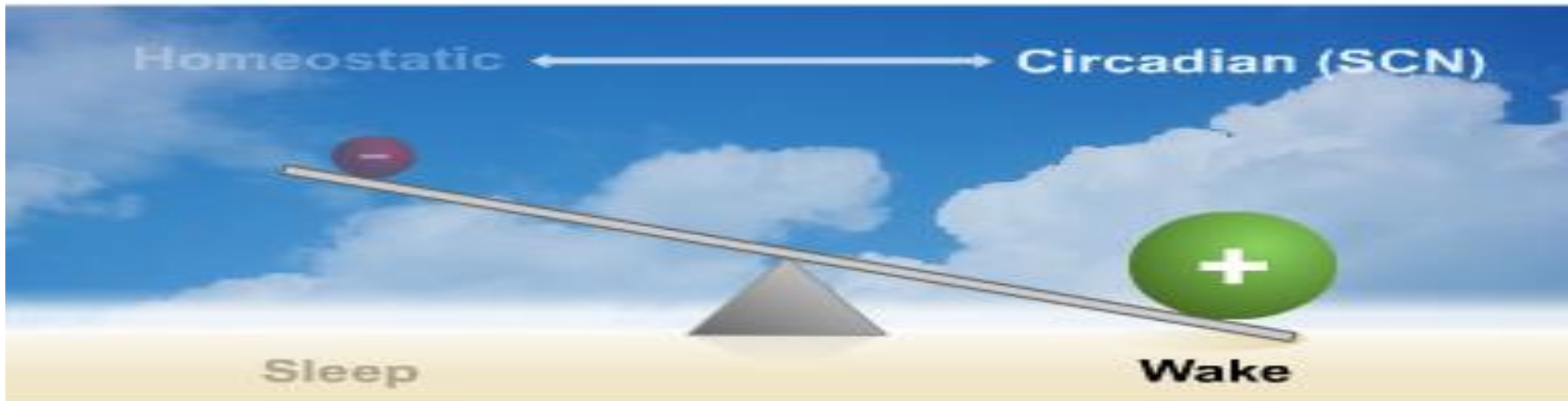



オレキシンの生理作用

- 食欲の制御 = 摂食行動の亢進
- 睡眠と覚醒の制御 = 安定した覚醒の維持
- 自律神経系の制御 = 交感神経系の亢奮
- 内分泌系の調節 = HPAaxisを刺激
- 報酬系への関与 = 報酬系をサポート
- etc

> 覚醒の安定性

The Sleep Switch

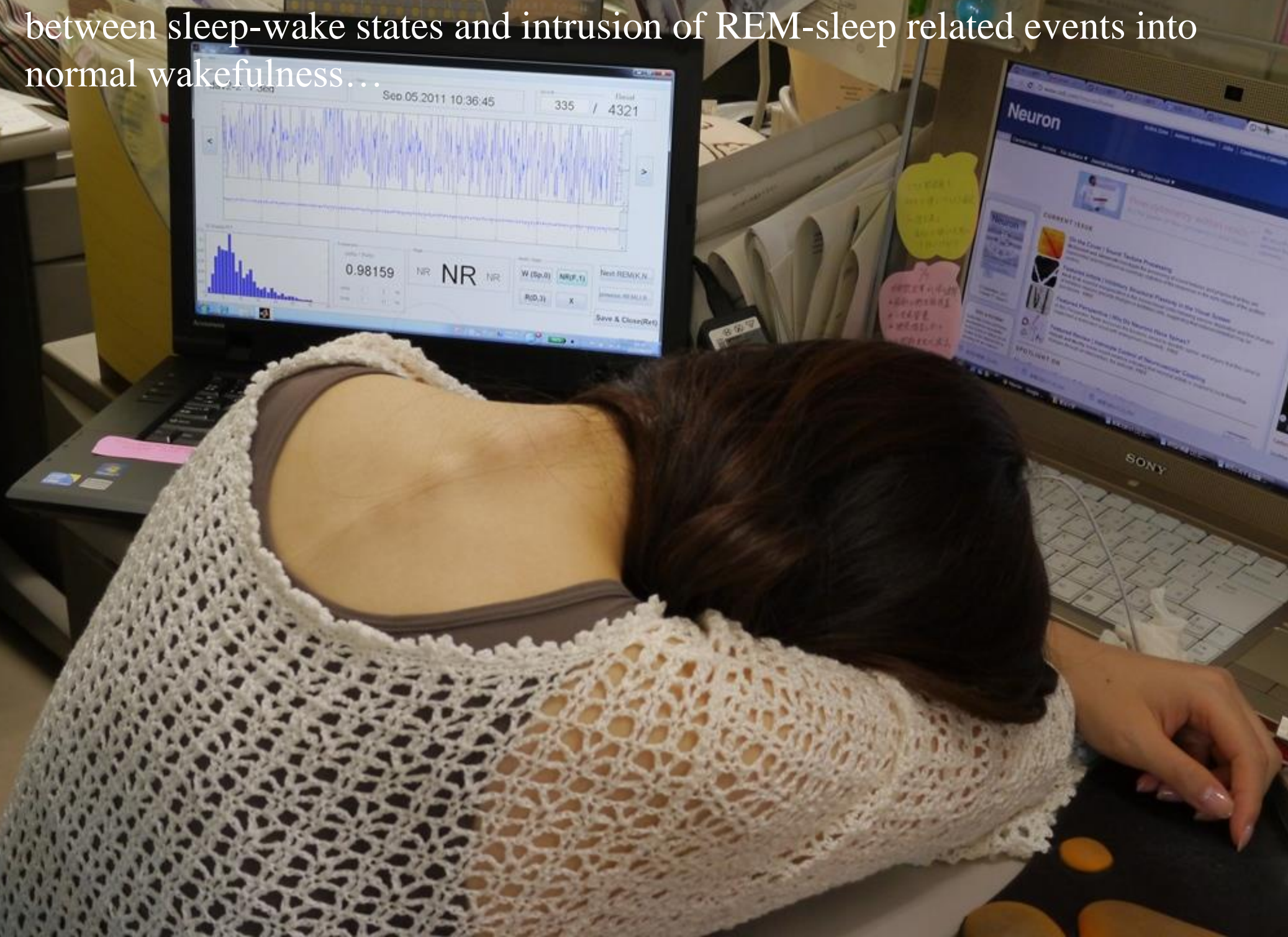




オレキシンは覚醒の“安定性”の維持
に重要な物質

Orexin plays an important role in the
stability of wakefulness

Narcolepsy is characterized by loss of control of the timing of transitions between sleep-wake states and intrusion of REM-sleep related events into normal wakefulness...



ナルコレプシーとは？

- 睡眠・覚醒ステージの不安定性を特徴とする神経疾患
- 最初の記載以来130年以上まったく謎の睡眠障害であった。

疫学

- 性差はなし。アメリカでは1/2000、日本では1/600
- 13-14歳に発症することが多い。

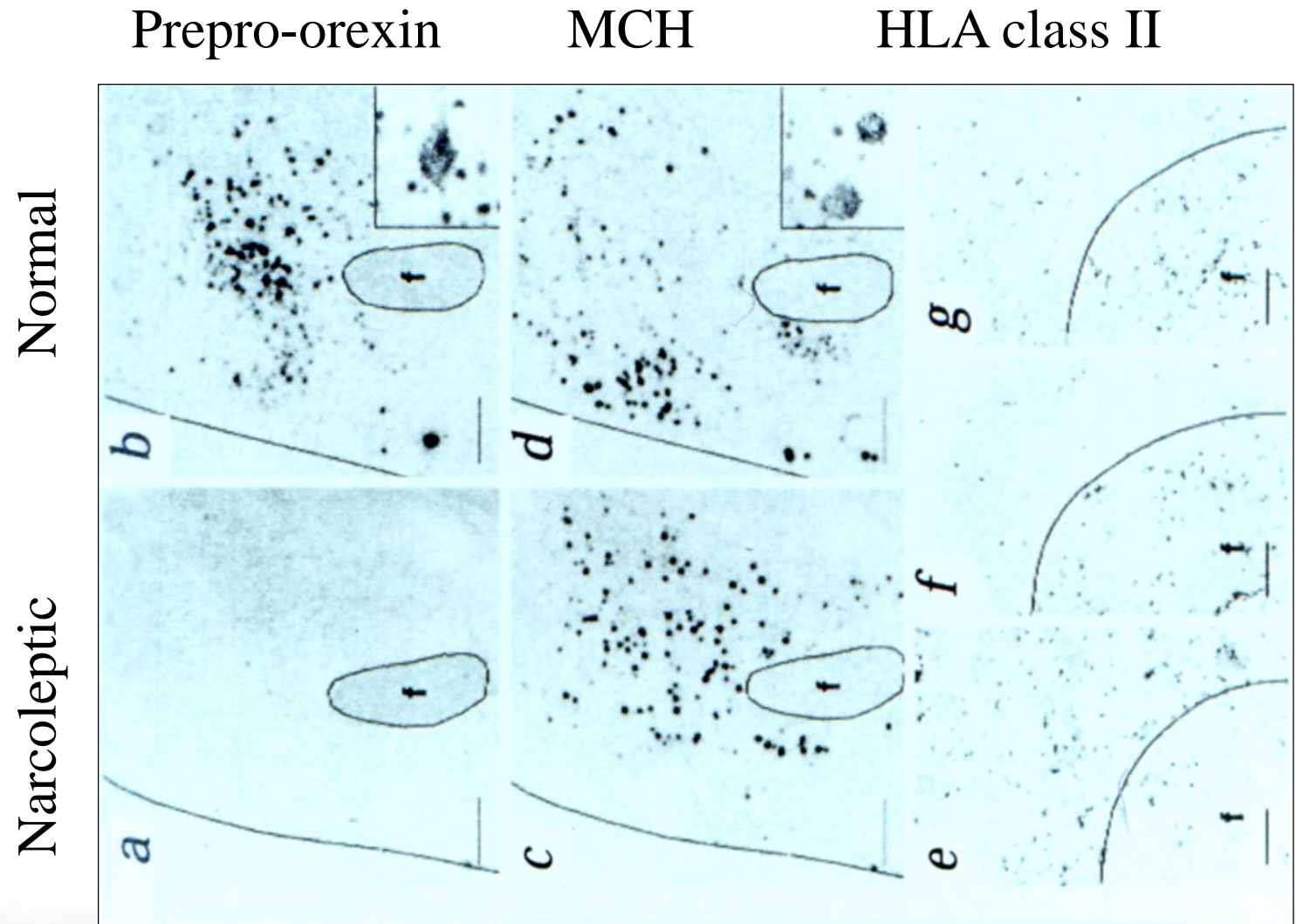
症状

- 日中の非常につよい眠気、
睡眠発作
- 入眠時幻覚
- 睡眠麻痺
- カタプレキシー(情動脱力発作)

診断

- ポリソムノグラフィー

ナルコレプシーはオレキシン欠損症



postmortem narcoleptic human brain

human narcolepsy is accompanied by a specific loss of orexin neurons in the perifornical region.

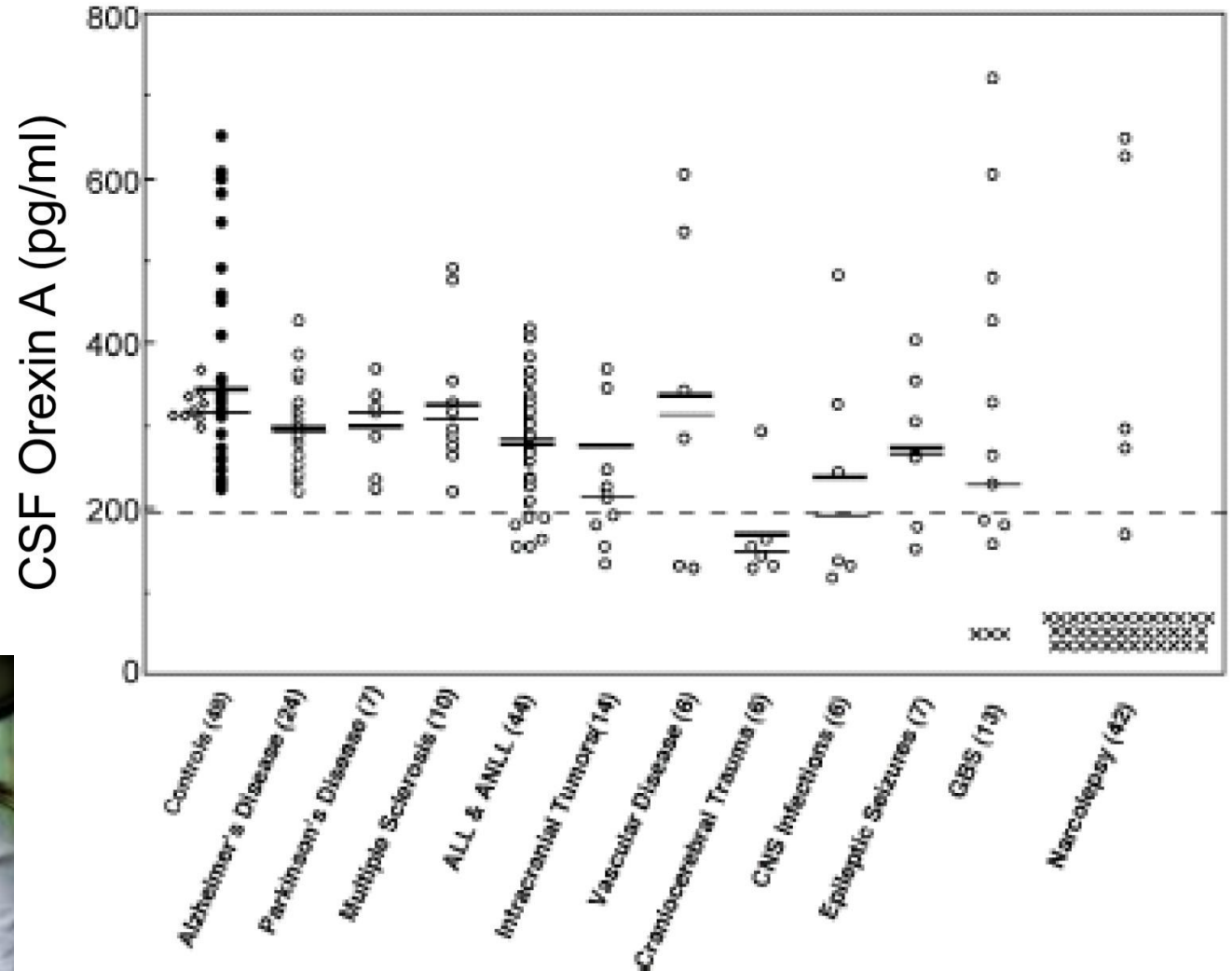
Peyron, C., et al. Nature Medicine 6: 991-997, 2000

神経疾患における髄液中オレキシン濃度

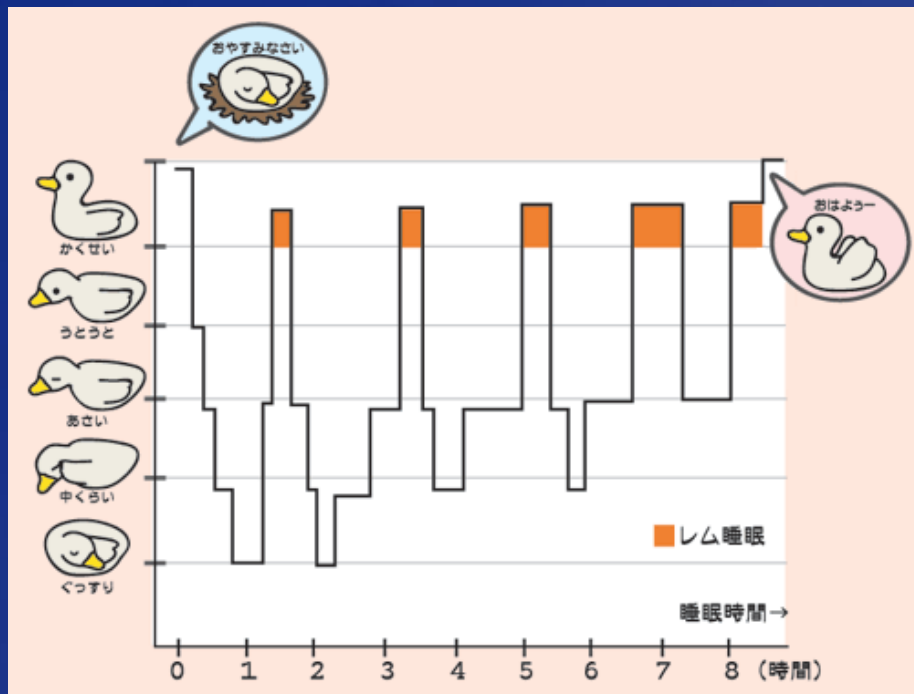
髄液中オレキシンA濃度が110 pg/ml



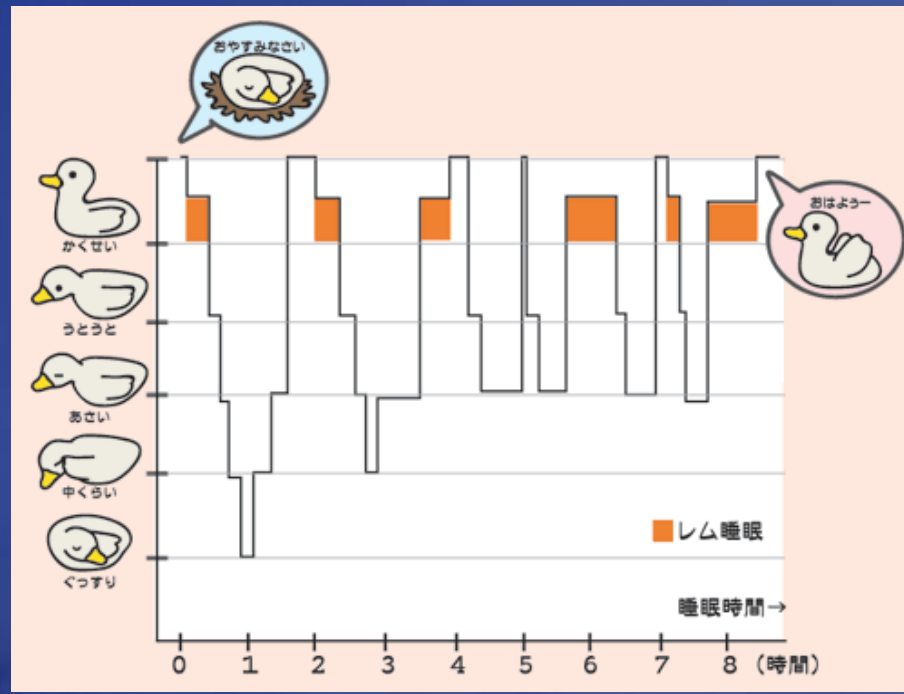
ナルコレプシー



ナルコレプシー患者にみられる睡眠異常

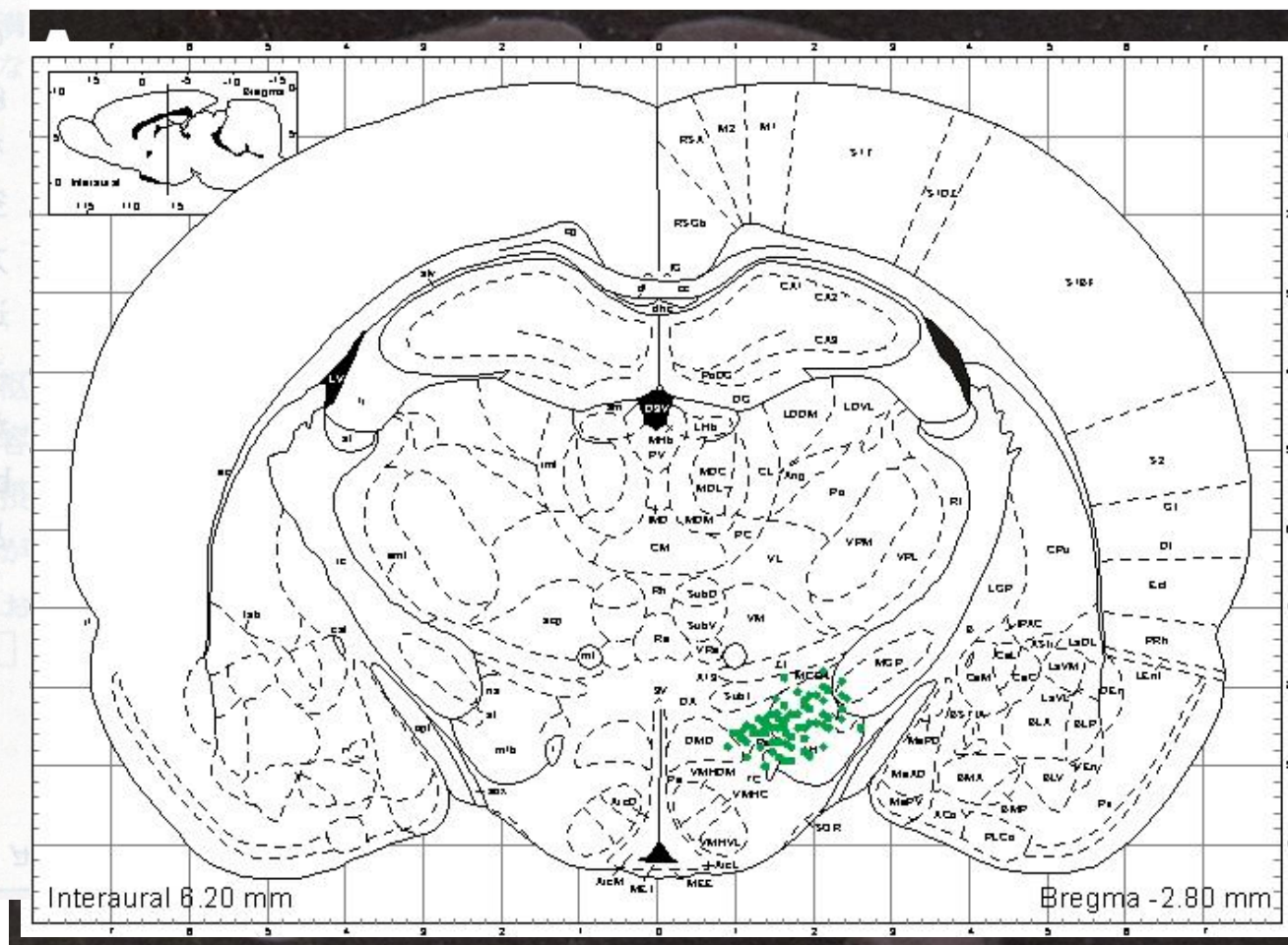
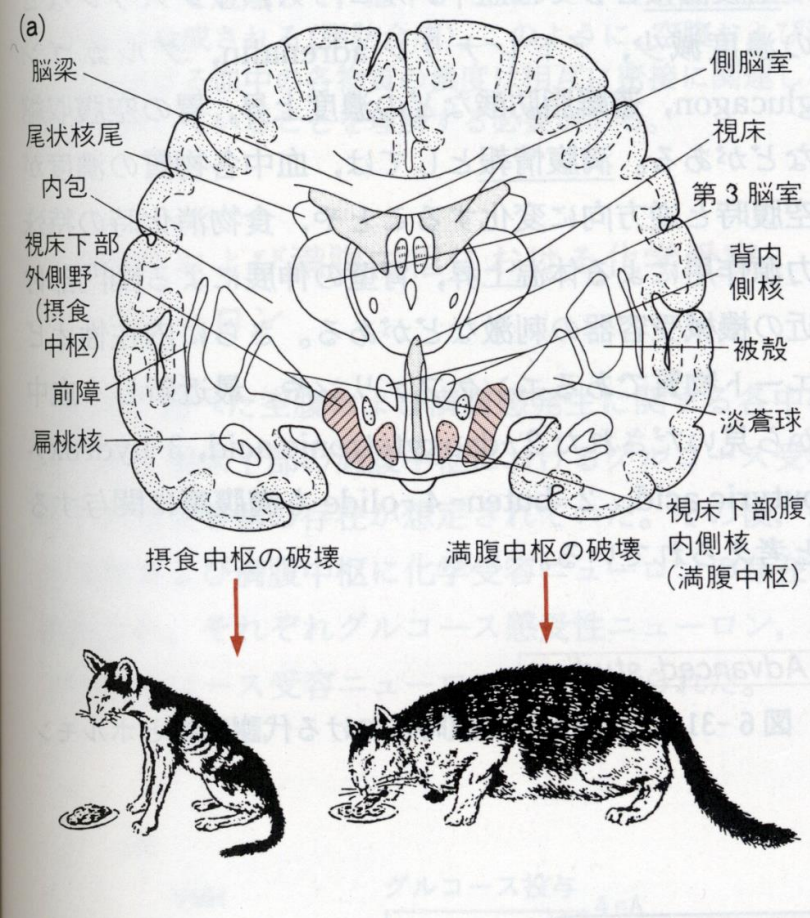


健常人

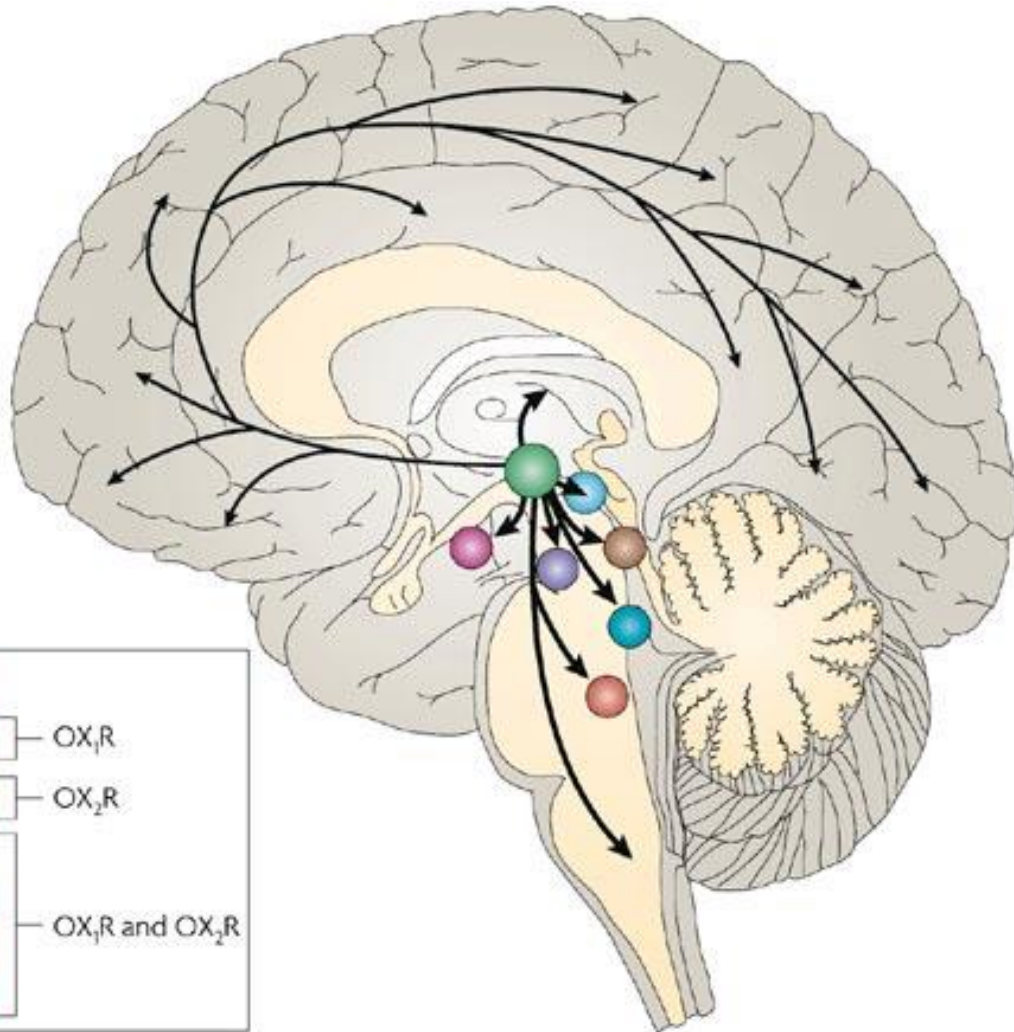


ナルコレプシー

オレキシン産生ニューロンは視床下部外側野に局在する

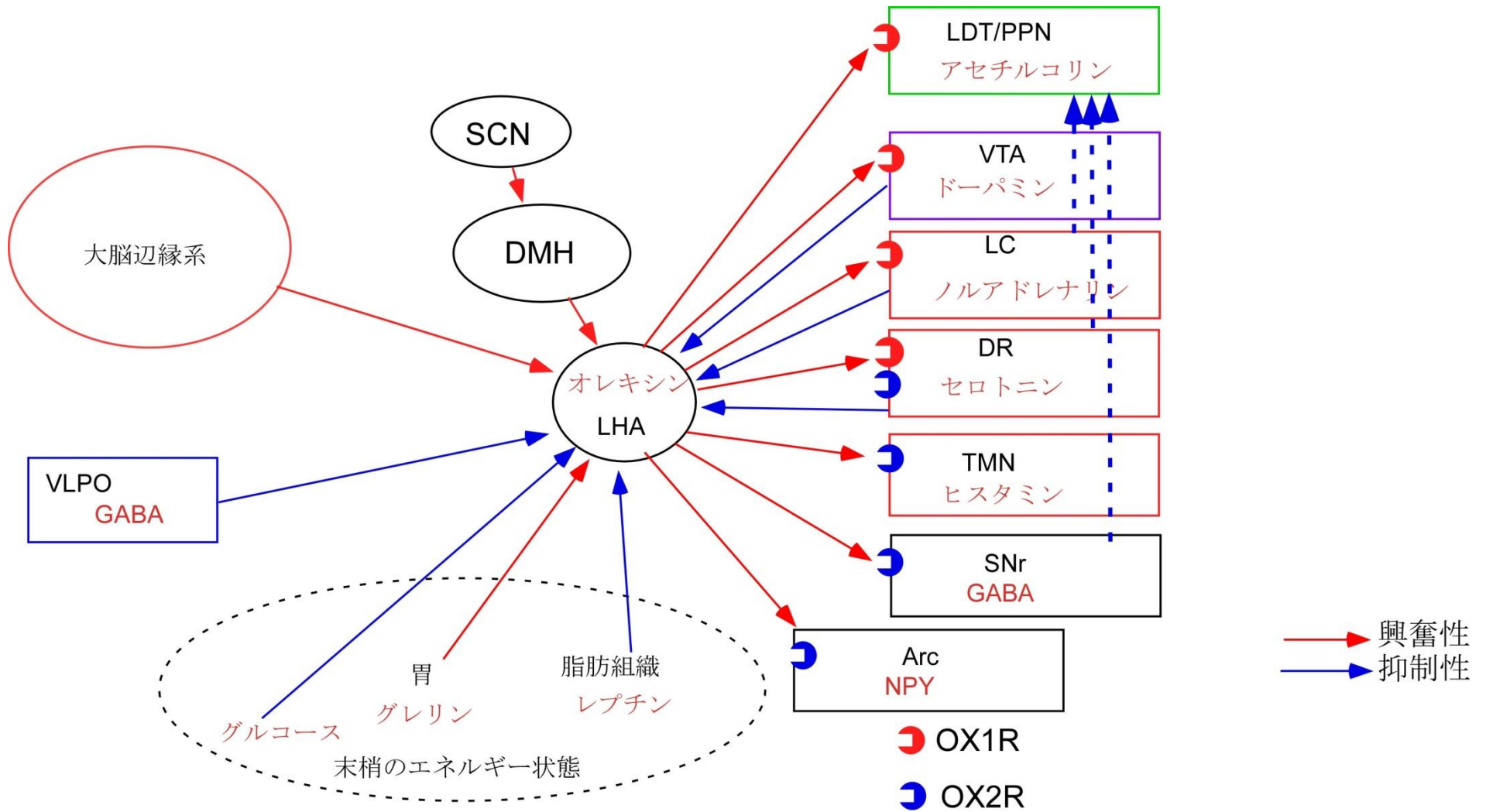


オレキシンニューロンの投射



Nature Reviews | Neuroscience

オレキシンニューロンの入出力系



オレキシンはモノアミンニューロンを興奮させる

5HT neurons (Raphé Nuc.)

Liu et al., 2002; Brown et al., 2002

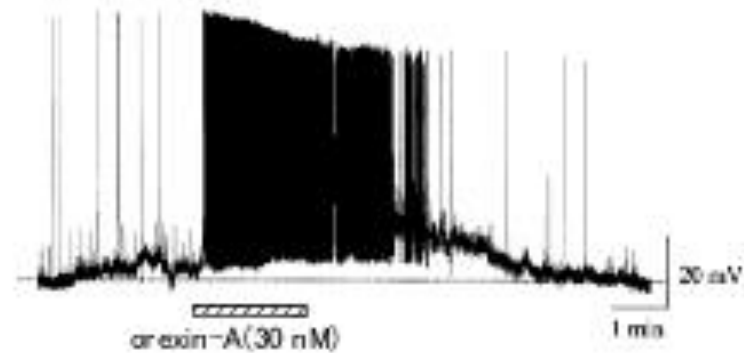
OX1R OX2R



Noradrenergic Neurons (LC)

Horvath et al., 1999; van den Pol et al.,

OX1R



Histamine Neurons (TMN)

Eriksson et al., 2001;

Bayer et al., 2001;

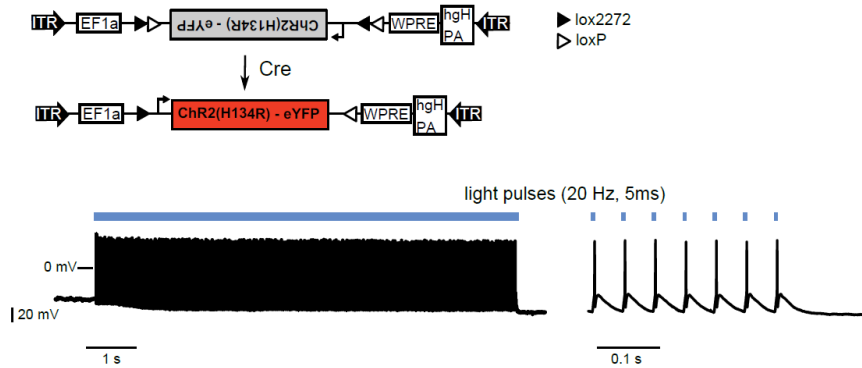
Yamanaka et al., 2002

OX2R



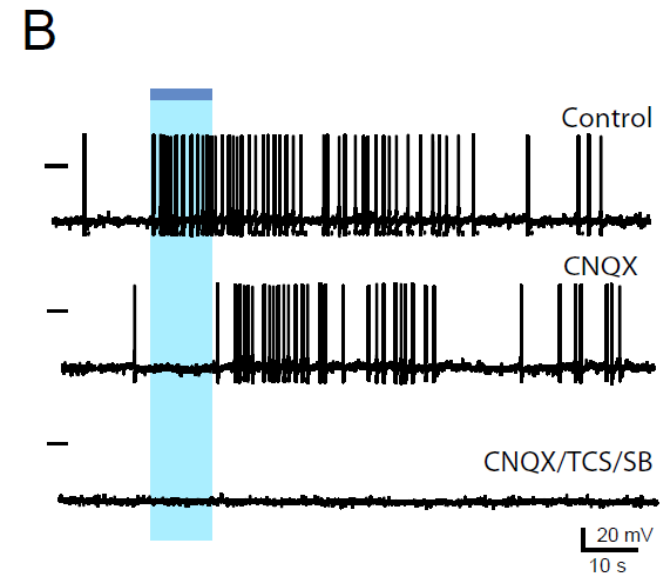
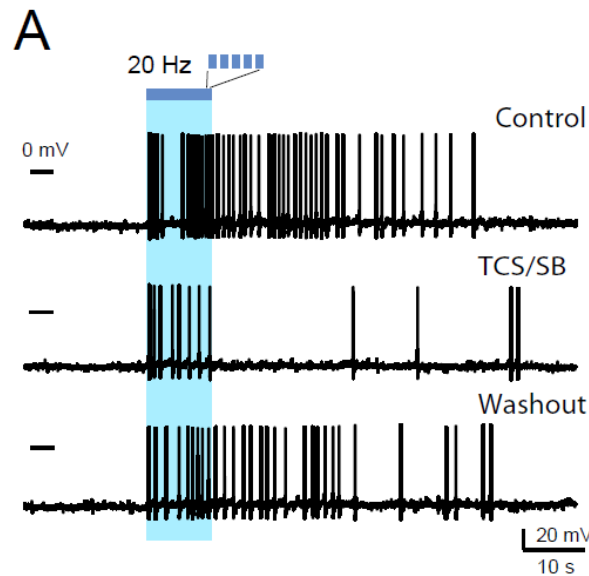
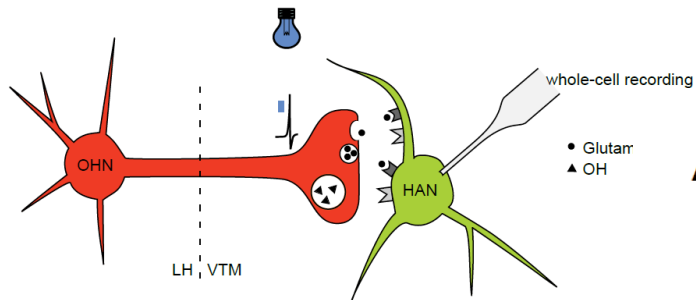
オレキシンニューロン軸索の光刺激

A controlling frequency of OHN activity

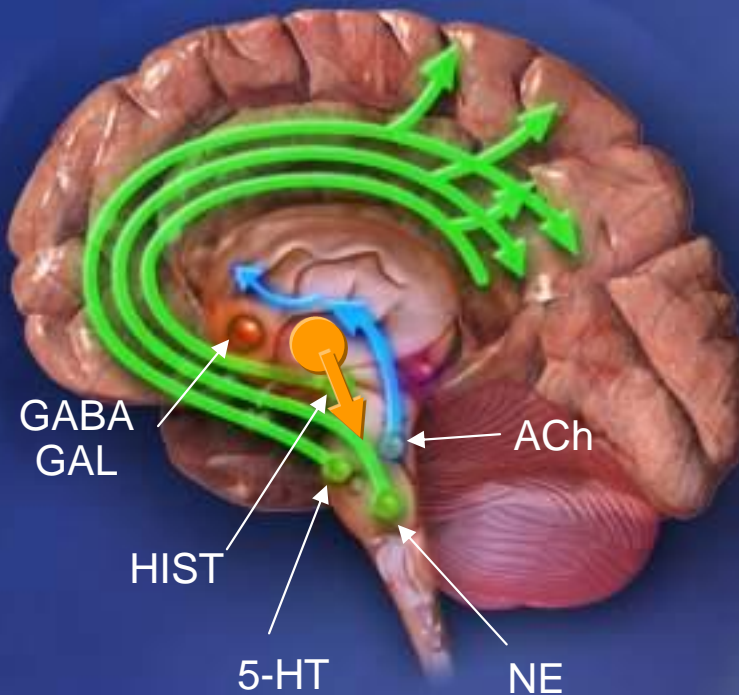


Cre-dependent AAV
(Flex switch)

B probing transmitted responses

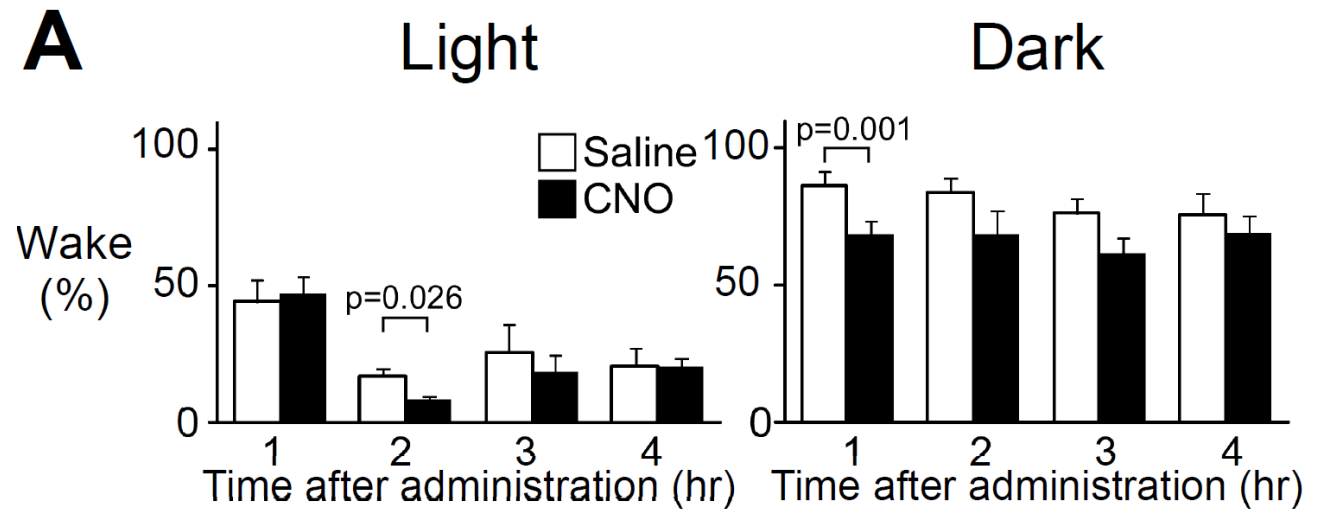
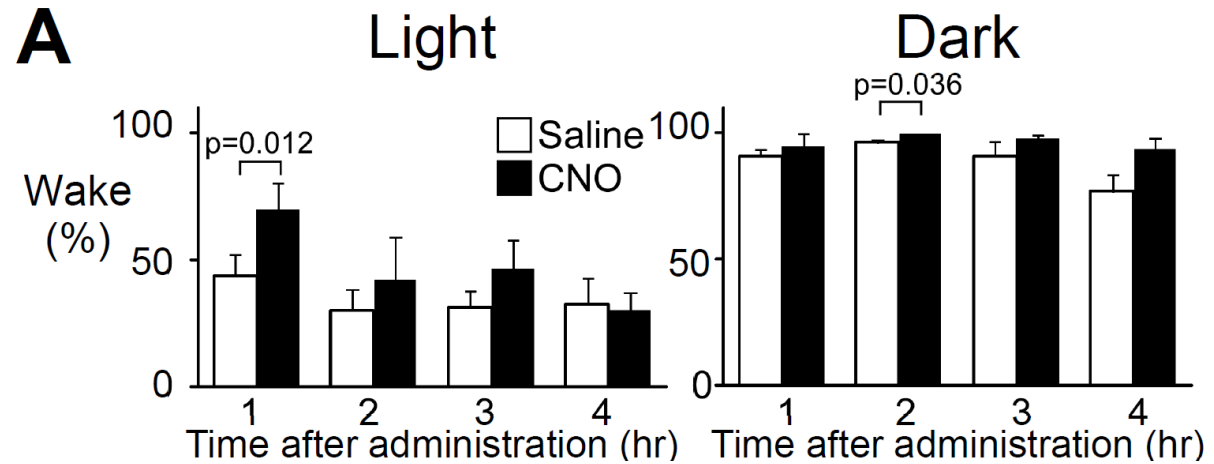
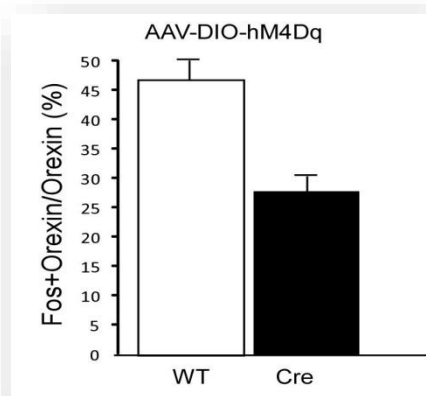
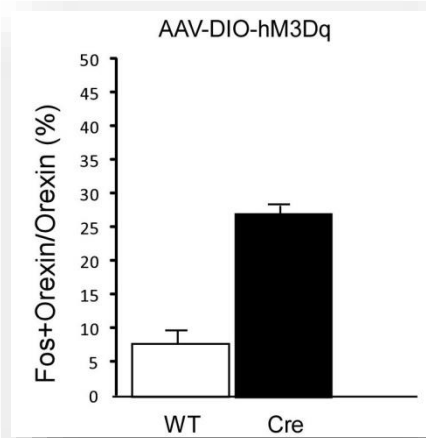


Wake System



orexin neurons exert excitatory effects on monoaminergic cells in the hypothalamus and brain stem regions to maintain wakefulness states.

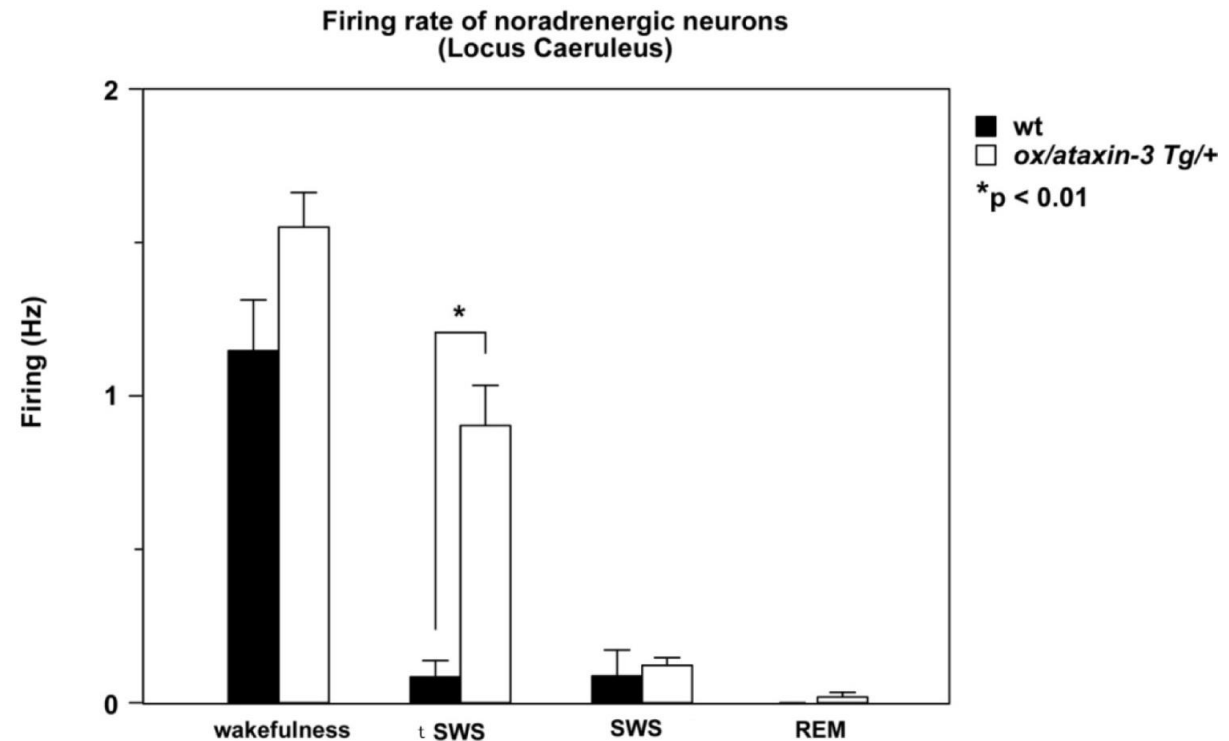
オレキシンニューロンの特異的な操作で睡眠覚醒状態を変化させることができる



Sasaki et al, Plos One 2011

Changes in the activity of orexin neurons can alter the behavioral state .

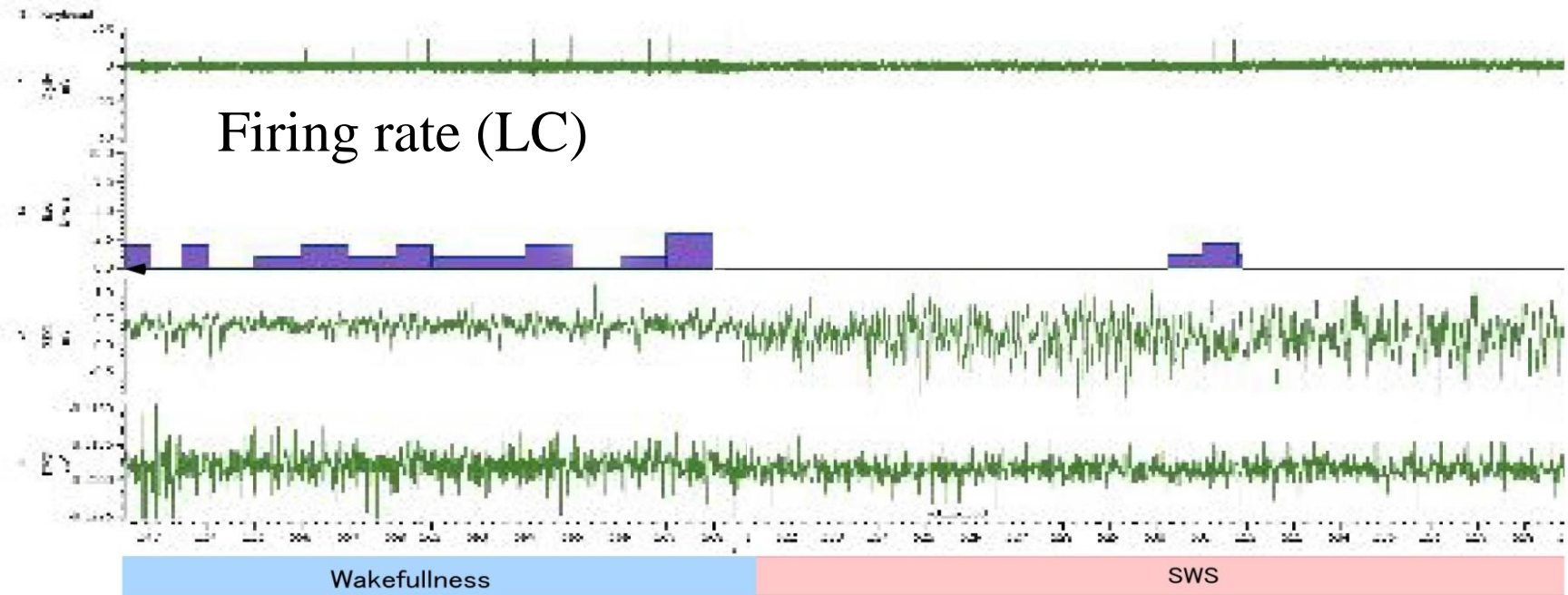
ナルコレプシーモデルマウス (orexin-ataxin 3マウス) に見られるモノアミンニューロンの異常



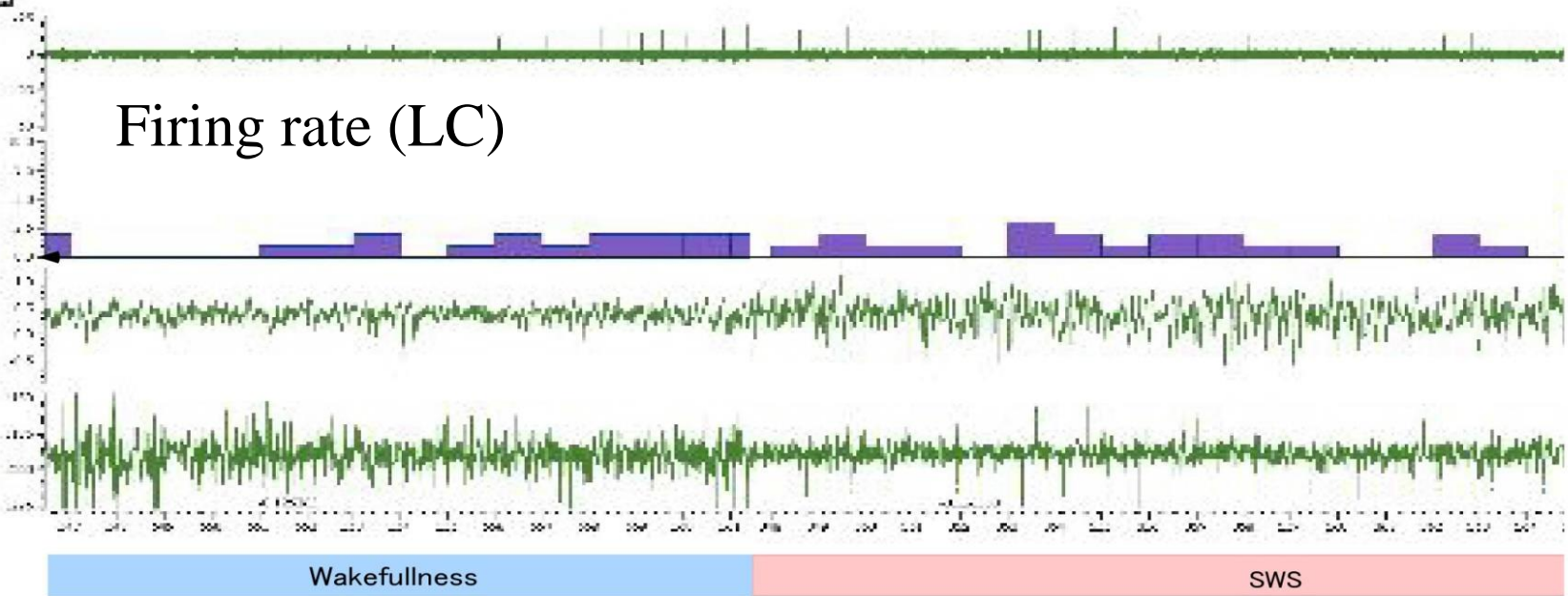
In the orexin/ataxin-3 mice, the firing rate during wakefulness was comparable to that of wild type mice, or rather higher than that despite lack of major excitatory transmitter.

The firing rates during tSWS was higher in orexin/ataxin-3 mice.

Wild type



Ataxin-3

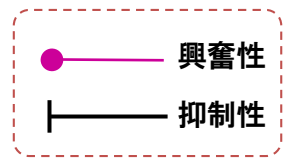
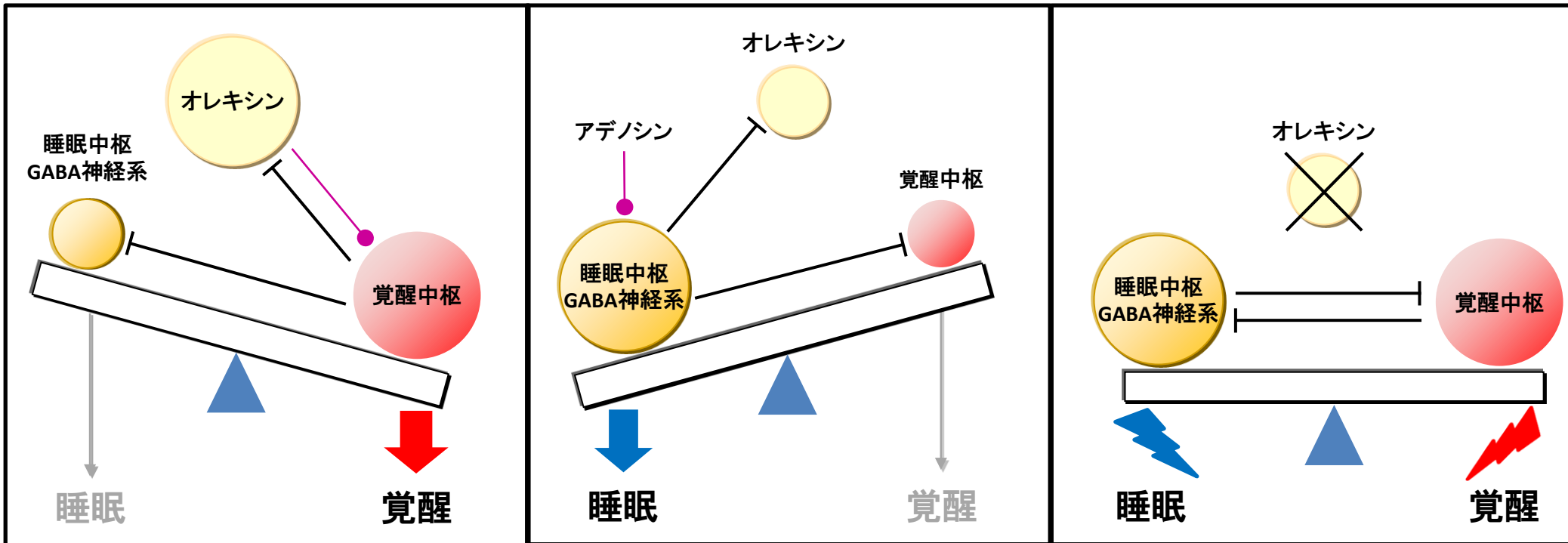


ナルコレプシーは オレキシンニューロンの脱落が原因である

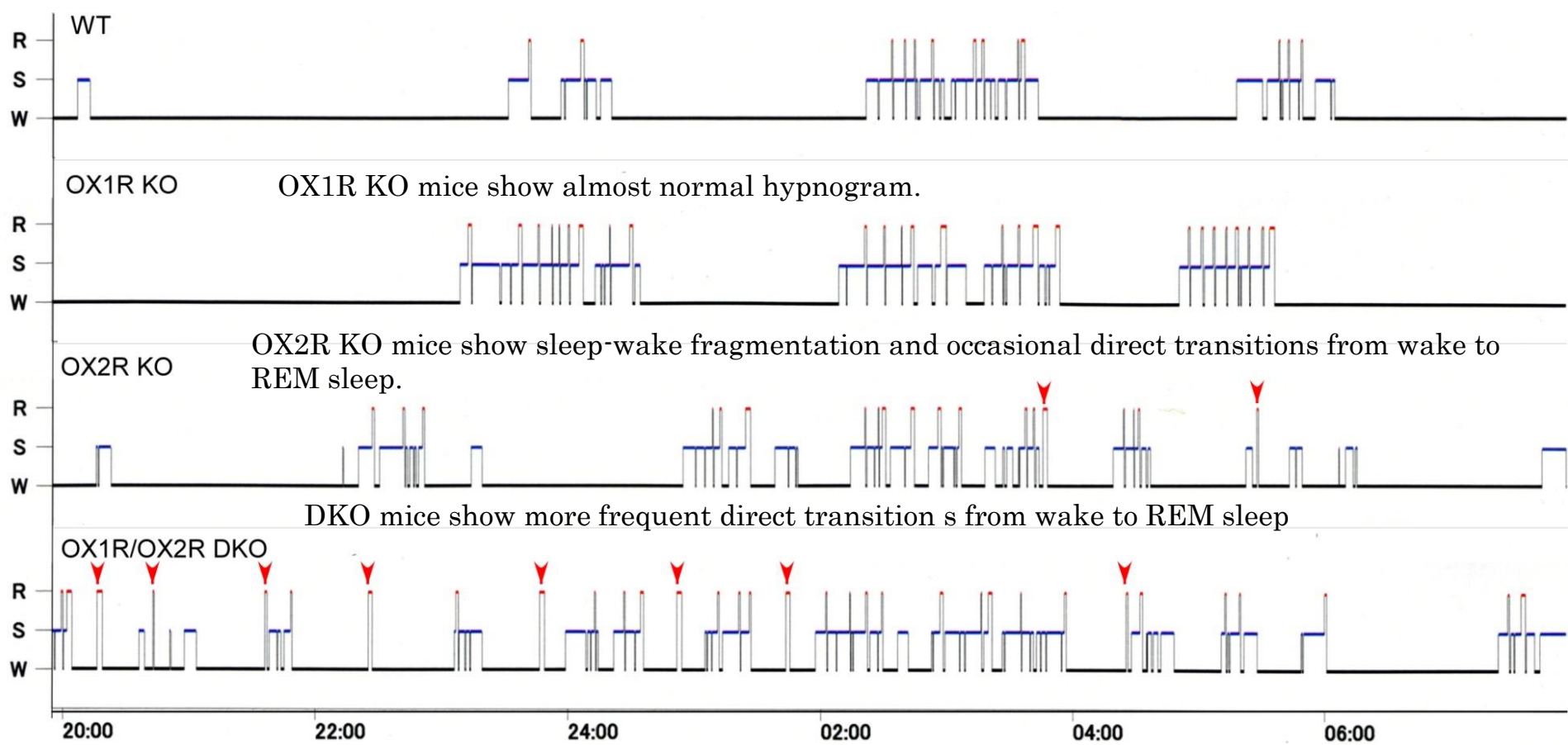
活動期

休息期

ナルコレプシー



二つの受容体の働き

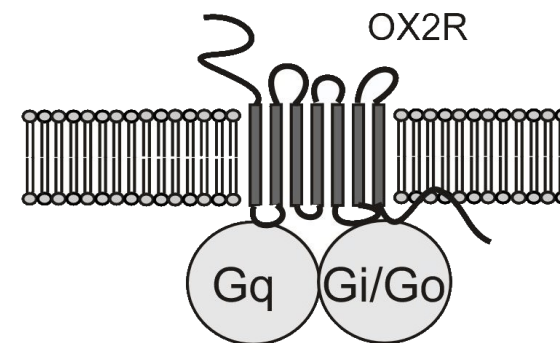
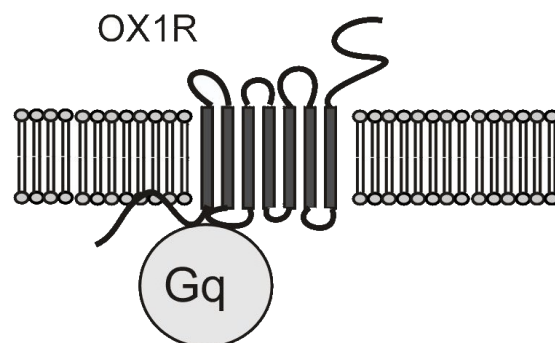


Hondo et al. 2010

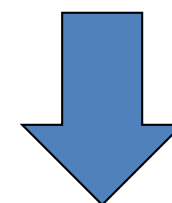
⇒signaling through OX2R is highly important for stability of waking period. But, OX1R also has additional effects on sleep/wake regulation.

2つの受容体の働き

Orexin Receptors

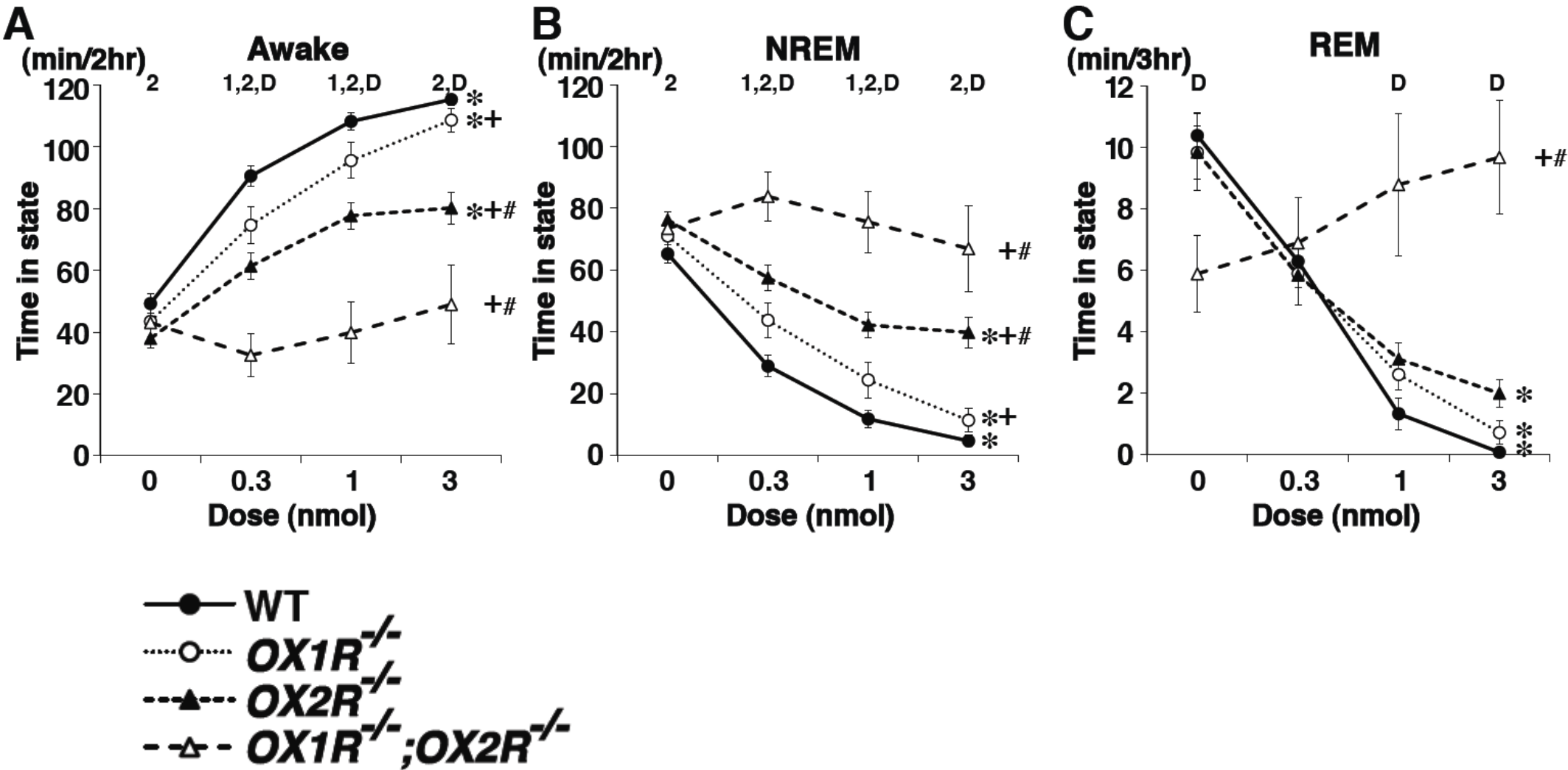


レム睡眠の
抑制



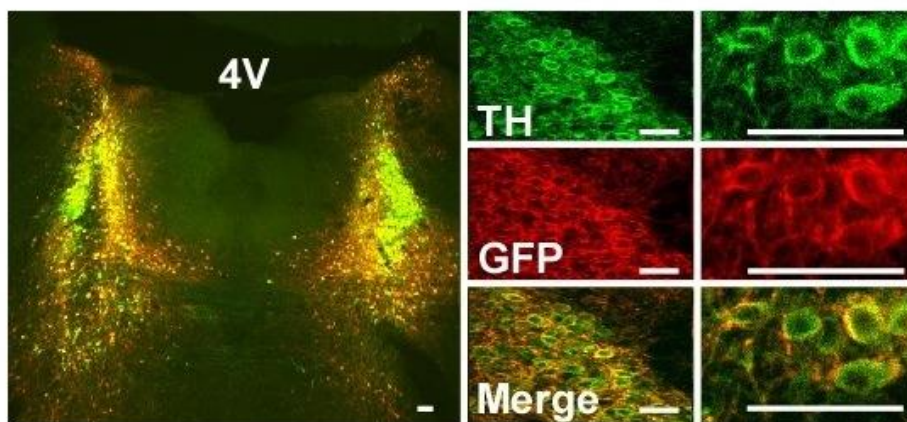
覚醒の維持

二つの受容体の働き



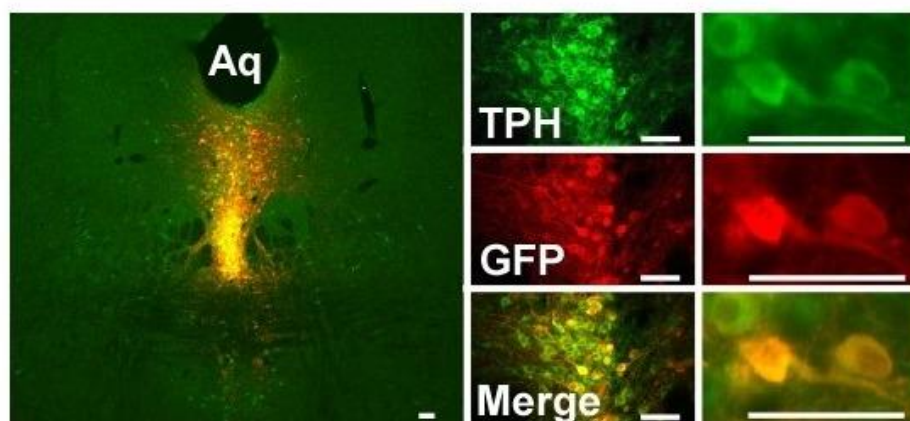
Spatially-selective rescue of orexin receptors in double receptor deficient mice

LC AAV-PRSx8-OX1R-EYFP

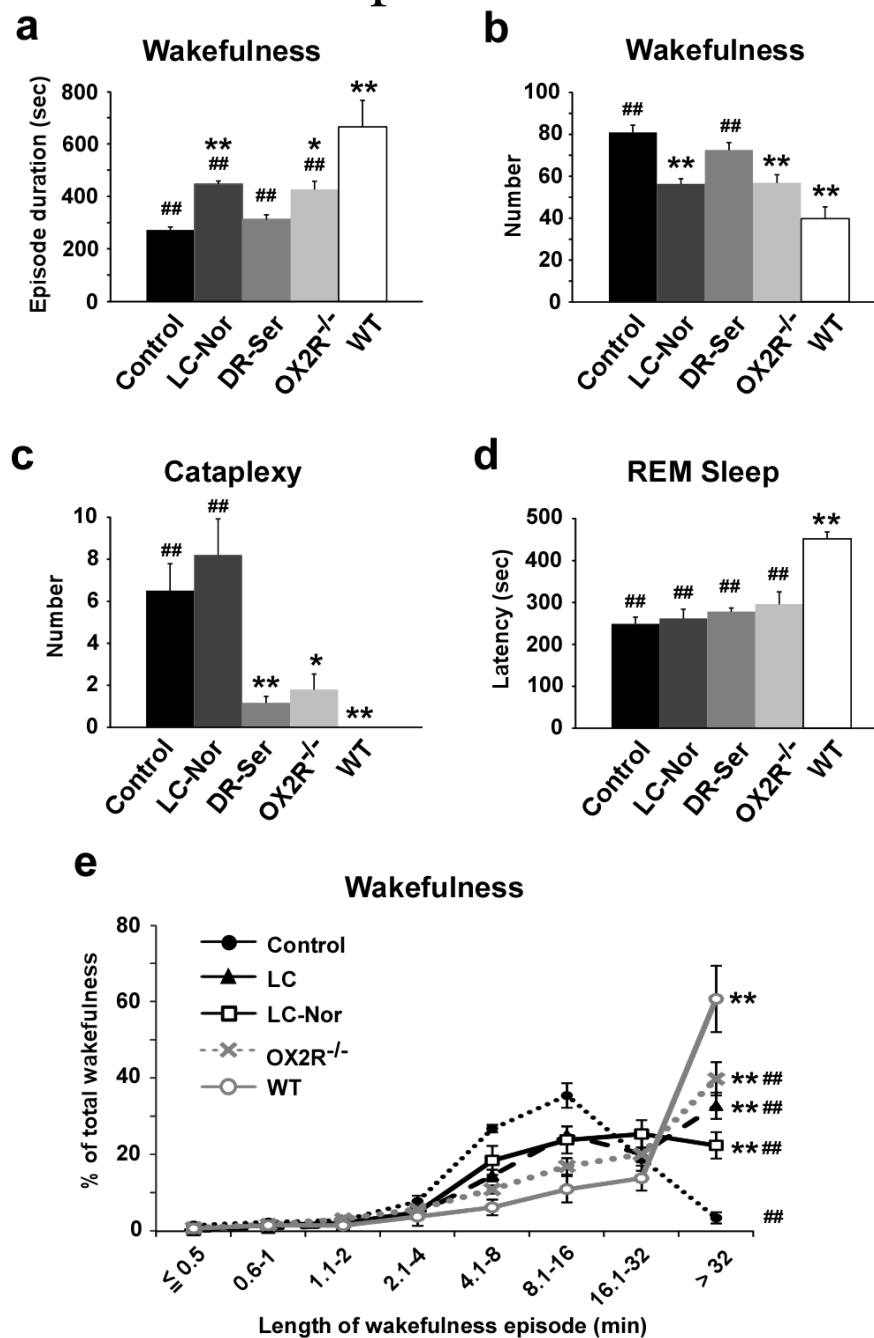


expressing OX1R in the NA neurons in the LC ameliorated the fragmentation of wakefulness.

DR AAV-Pet1-OX2R-EYFP

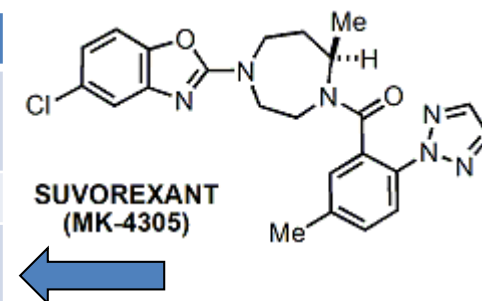


specific expression of OX2R in serotonergic neurons in the DR almost completely inhibited cataplexy.

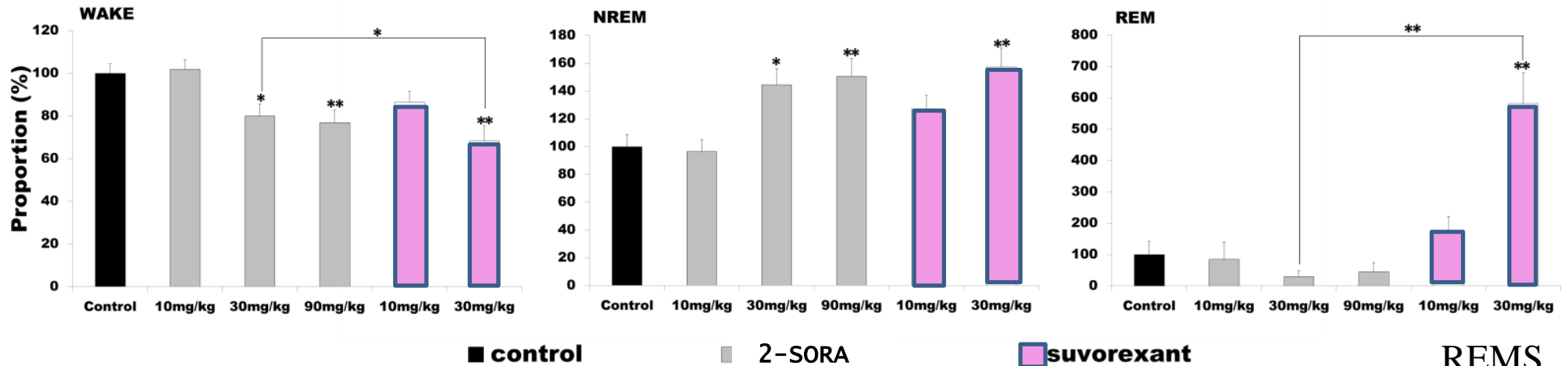


オレキシン受容体拮抗薬

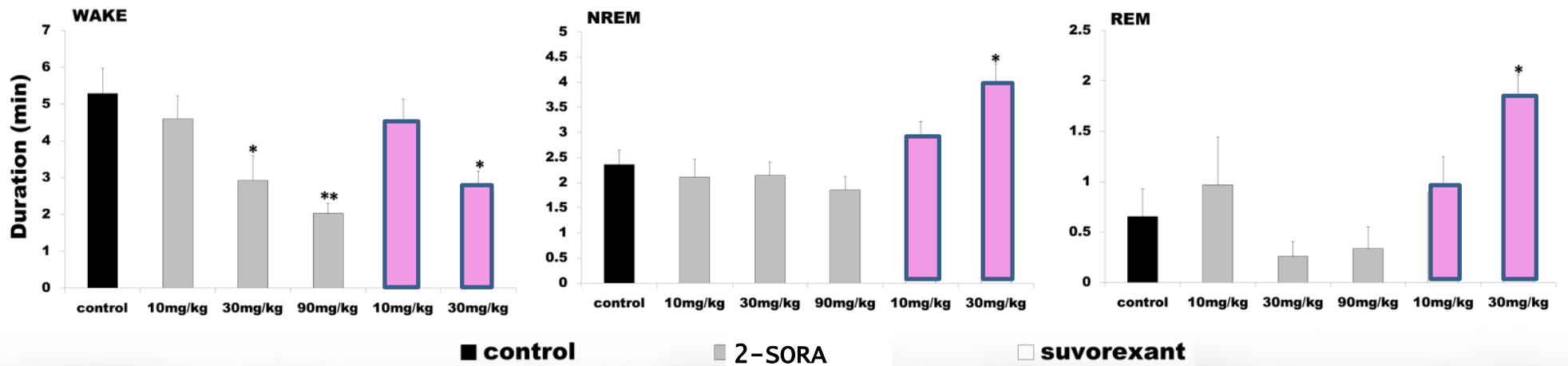
Type	Compound	Affinity(K_i , nM)		Ref
		for the human OX1R	for the human OX2R	
DORA	ACT-078573 (almorexant)	13	8	143
DORA	MK-4305 (Suvorexant)	0.6	0.4	144
DORA	SB-649868	0.3	0.4	145
1-SORA	SB-410220	8.1(pK_b)	6.3 (pK_b)	146
1-SORA	SB-334867	28	1704	147
1-SORA	SB-408124	22	1405	146
1-SORA	SB-674042	1.1	129	146
1-SORA	ACT-335827	6 (IC_{50})	417 (IC_{50})	75
2-SORA	1-(2-bromo-phenyl)-3-((4S,5S)-2,2-dimethyl-4-phenyl-[1,3]dioxan-5-yl)-urea	5.3 – 6.1(pK_i)	6.8 – 7.1(pK_i)	148
2-SORA	JNJ-10397049	1644	6	148
2-SORA	C1m	27 (IC_{50})	3000 (IC_{50})	2,149
2-SORA	EMPA	900	1.1	150
2-SORA	TCS-OX2-29	n.d.	7.4(pK_i)	151



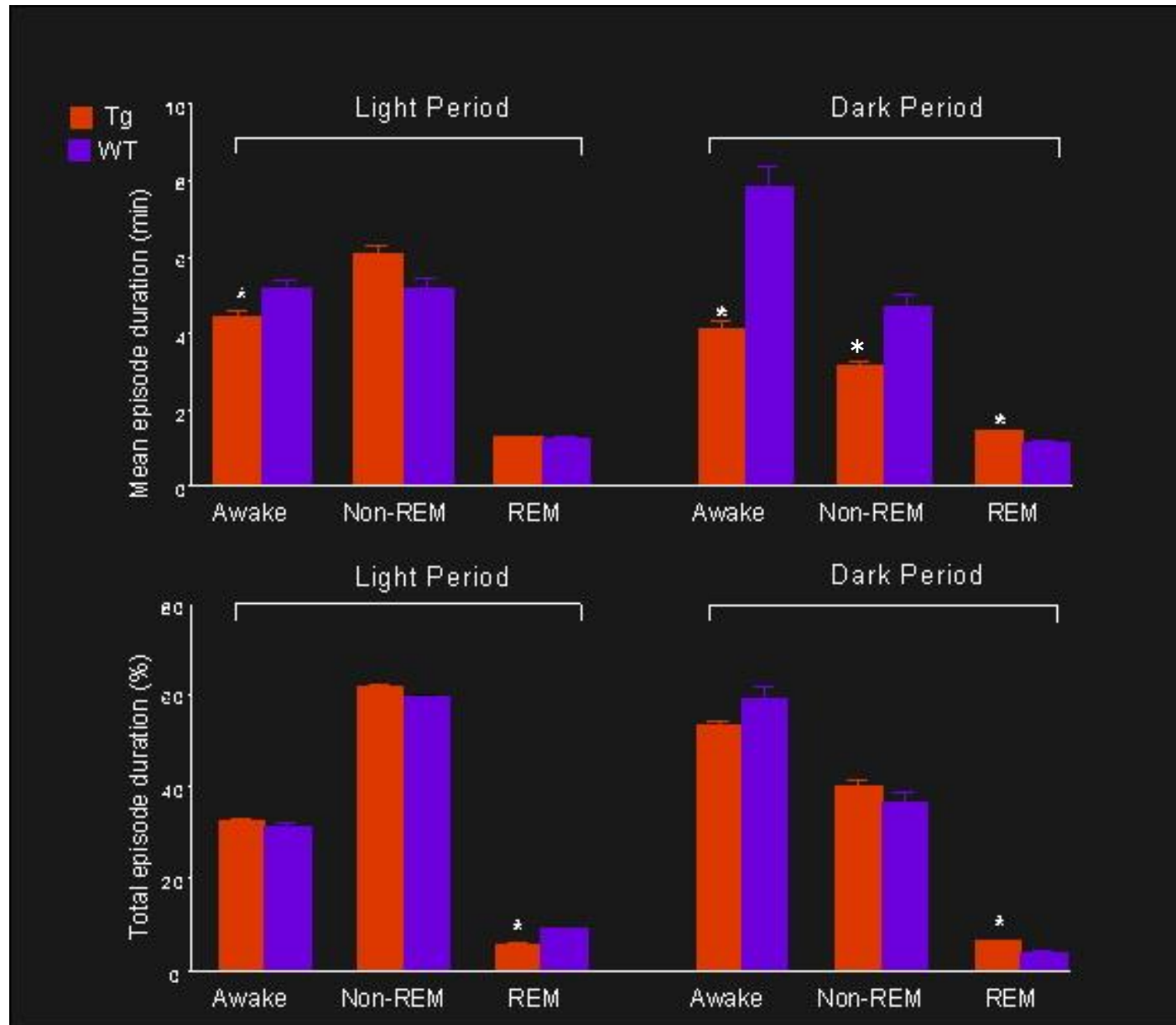
スボレキサント(DORA)と2-SORAの作用(投与後2時間)



REMS
の増加



ナルコレプシーマウス (Orexin/ataxin-3 Mice) の睡眠・覚醒

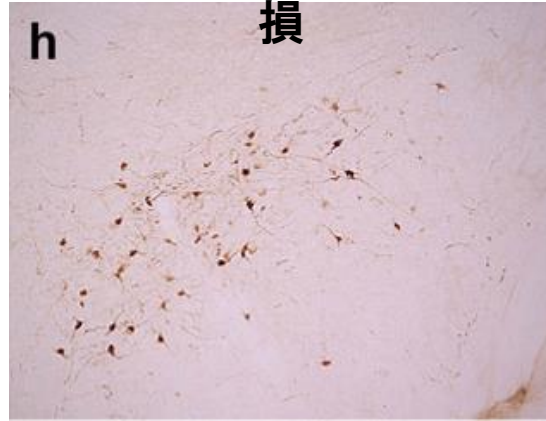


オレキシンニューロンの欠損はカタプレキシー様症状を引き起こす(マウス)

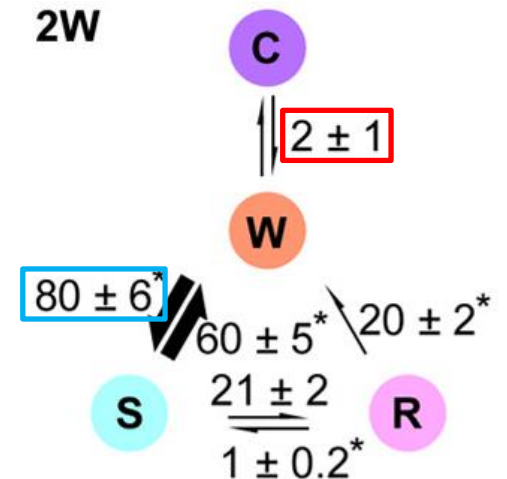
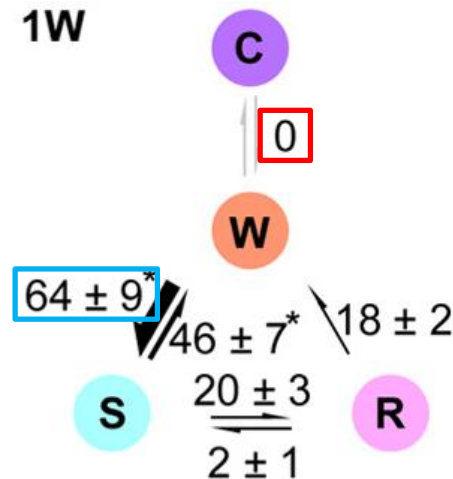
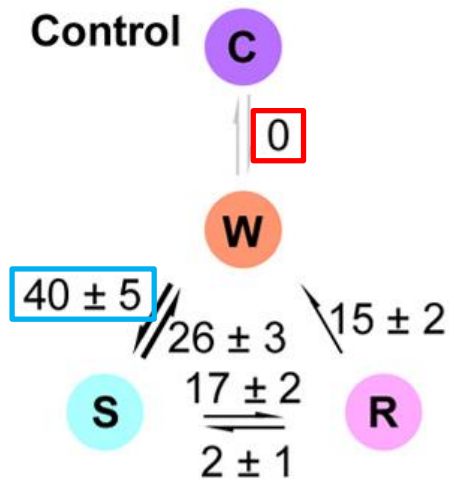
コントロール



80%～オレキシン神経欠損



95%～オレキシン神経欠損



W: wakefulness, S: slow-wave-sleep, R: REM sleep, C: cataplexy

☐ カタプレキシー様症状の回数

☐ 覚醒⇔睡眠の回数(増えた場合は睡眠が分断化していることを意味する)

対象: Orexin-tTAマウス(ドキシサイクリンの存在下でのみTet-Oによってオレキシン遺伝子を発現できるマウス)

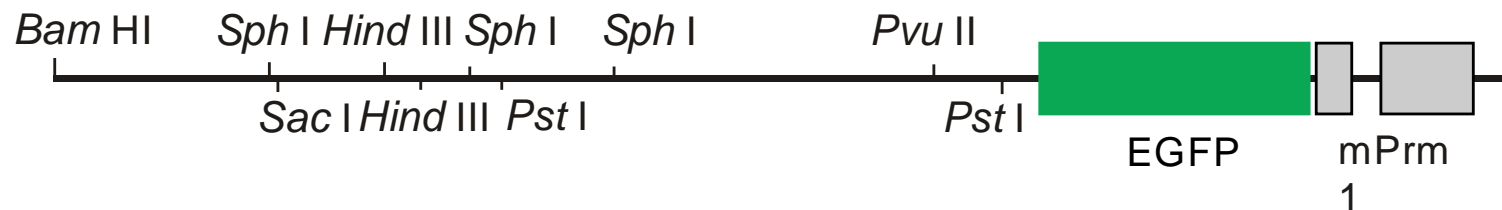
方法: Orexin-tTAマウスの餌からドキシサイクリンを除去することによりオレキシン神経を変性させ急速にオレキシン神経の欠損を引き起こした

Orexin/GFP Mouse

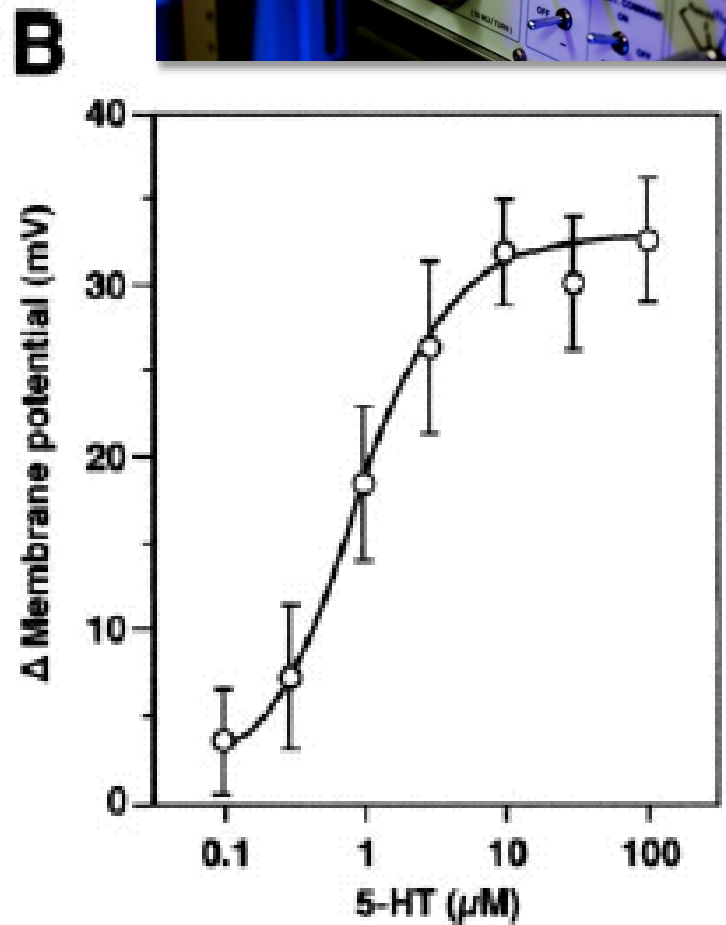
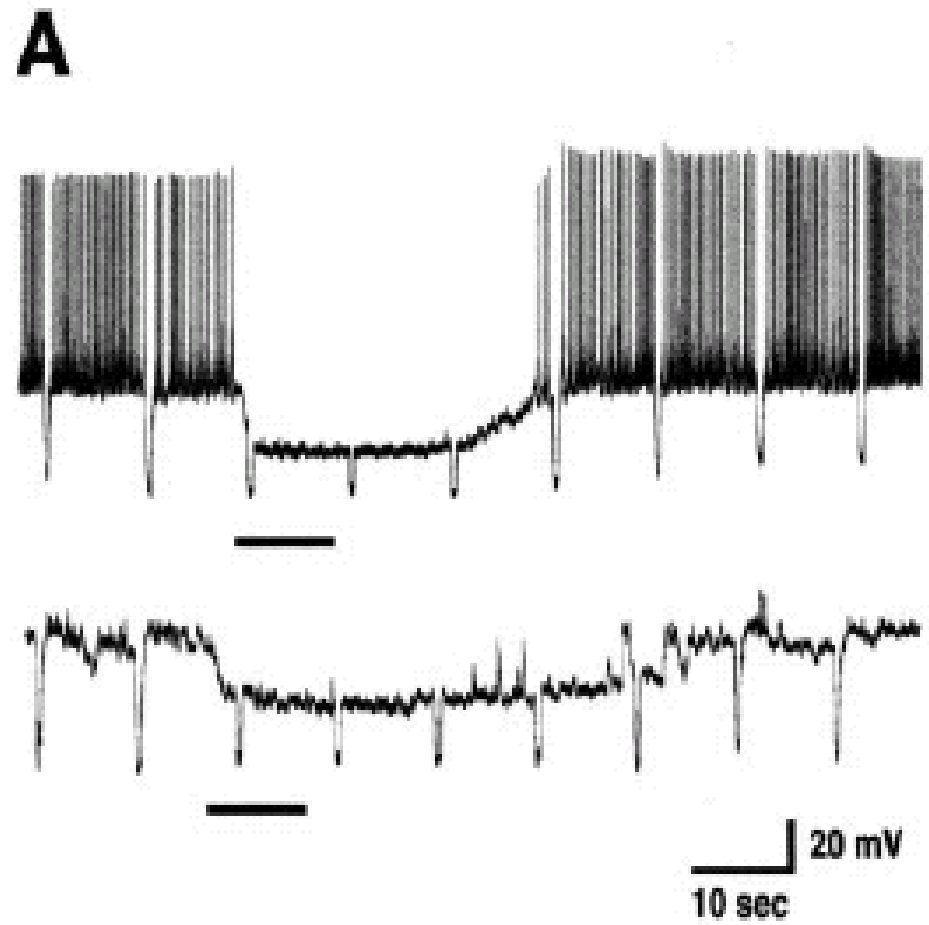
In slice preparations, prepared from the hypothalamus, fluorescing orexin neurons were subjected to whole cell patch clamp recordings.



Human *prepro-orexin* promoter

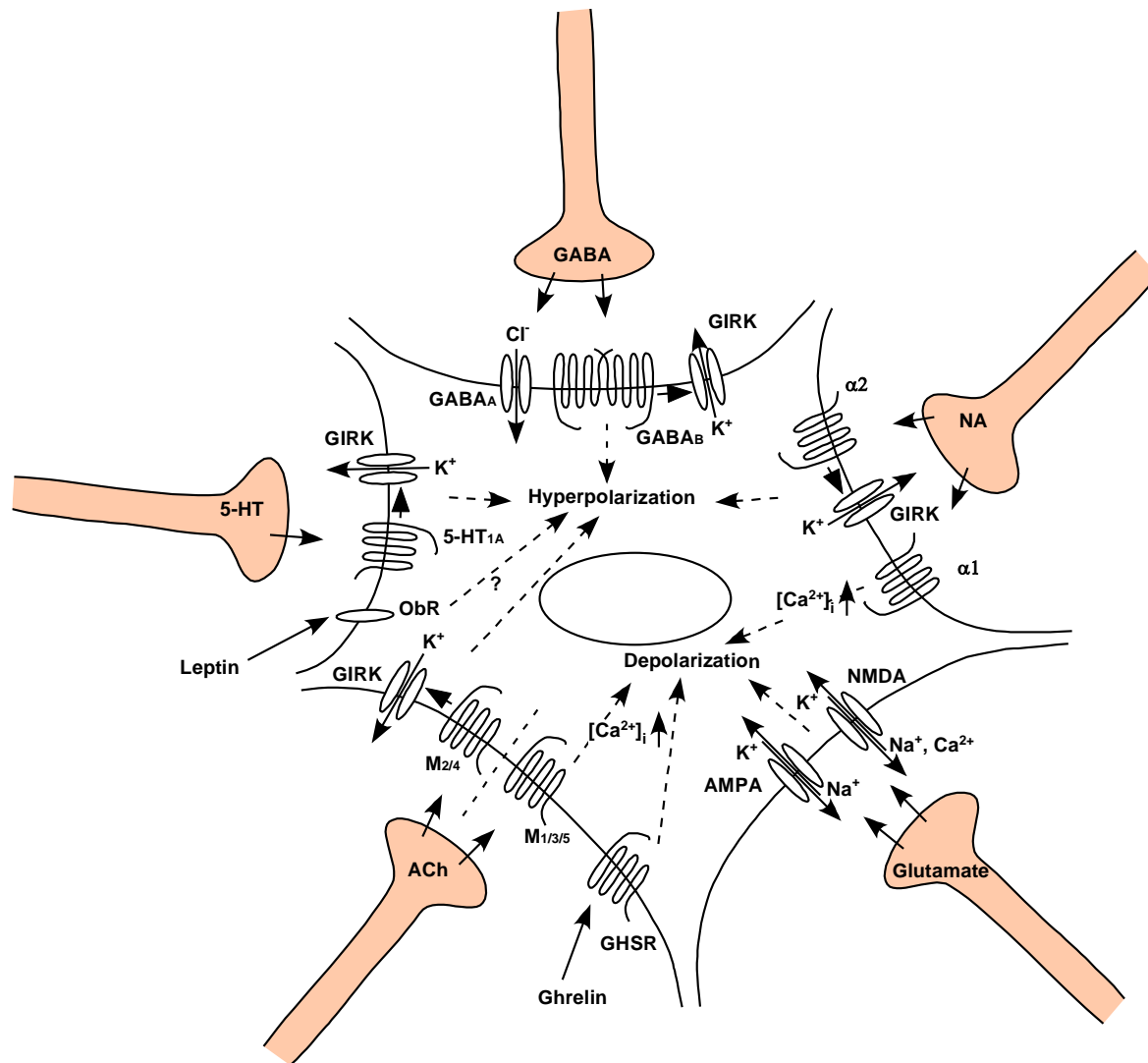


セロトニンは5HT1A受容体を介して オレキシンニューロンを抑制する



All orexin neurons examined were inhibited by 5-HT (n=88)
The response was inhibited by the 5-HT1A receptor antagonist, WAY100635.

オレキシンニューロンの活動に影響を与える因子



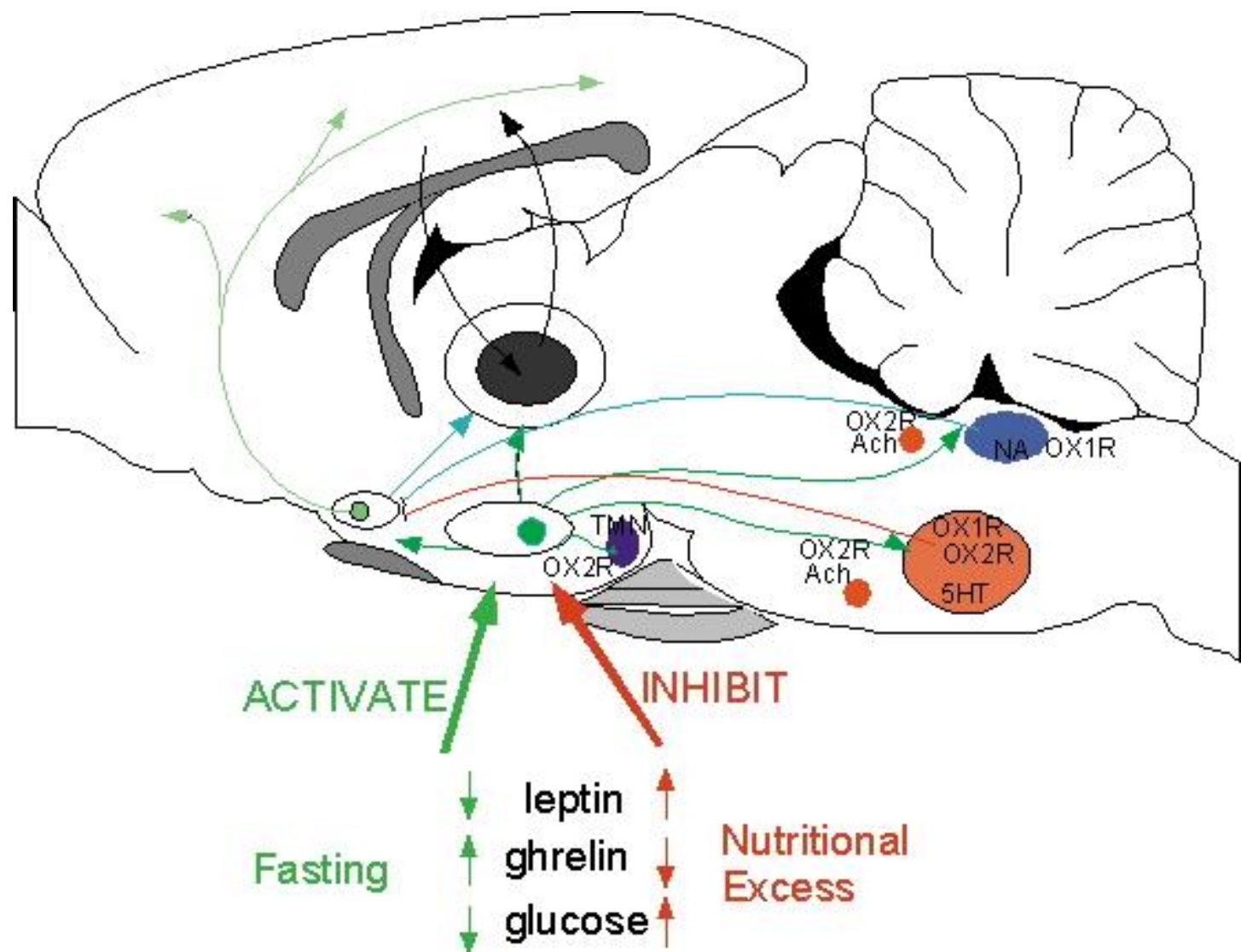
Excitation

glutamate
 Ghrelin
 CCK (CCK-A)
 Neurotensin
 Vasopressin(V1a)
 Oxytocin(V1a)
 CRH
 TRH
 orexin
 Ach (M3) (27%)

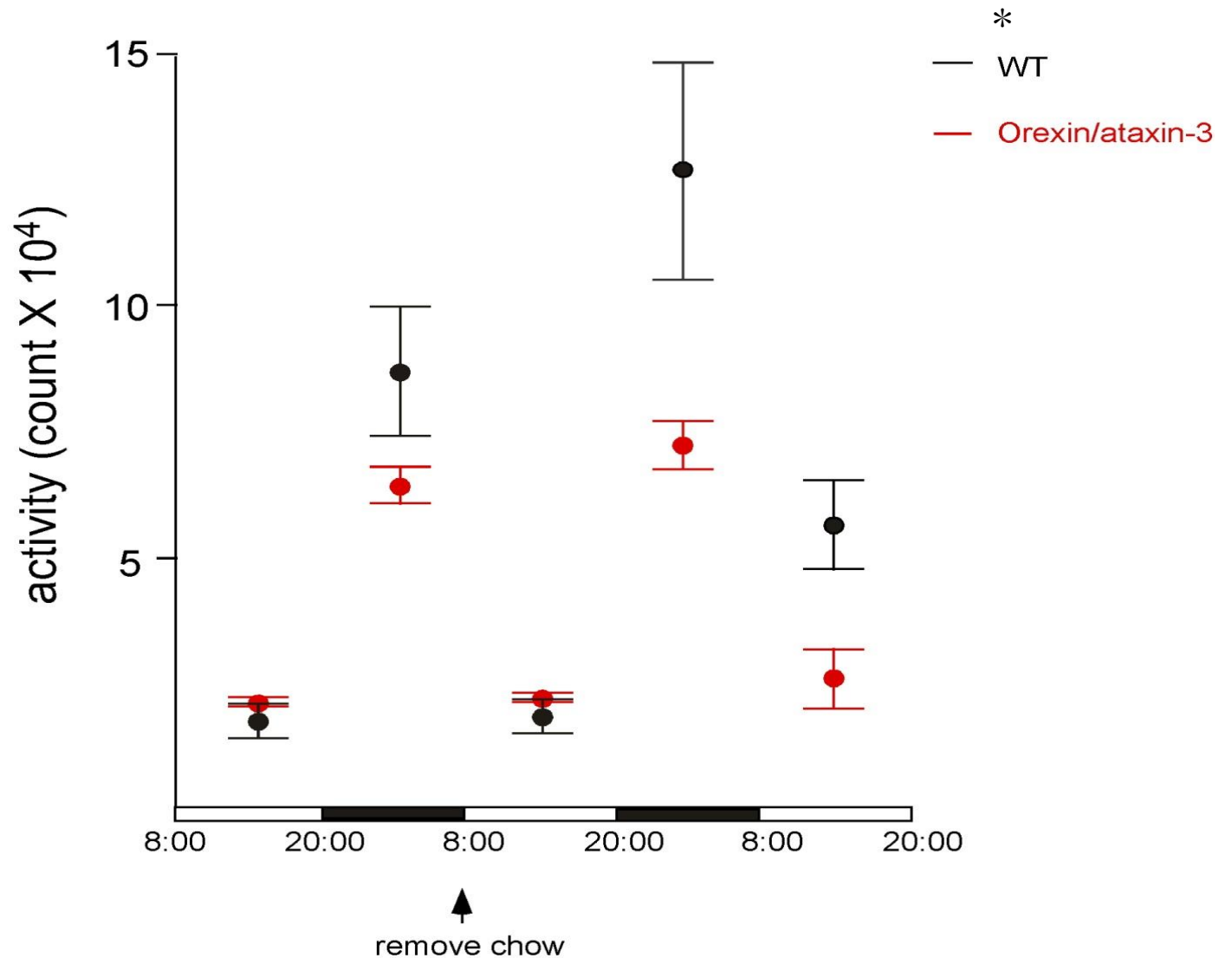
Inhibition

Glucose
 GABA(GABAA, GABAB)
 Serotonin (5HT1A)
 Noradrenalin ($\alpha 2$)
 Leptin (OB-R)
 CNTF
 IL-6
 Ach (muscarinic) (6%)

オレキシン産生神経は動物のエネルギーバランスに応じて覚醒状態を制御する。



オレキシン産生神経は絶食時の行動量の増加に必須

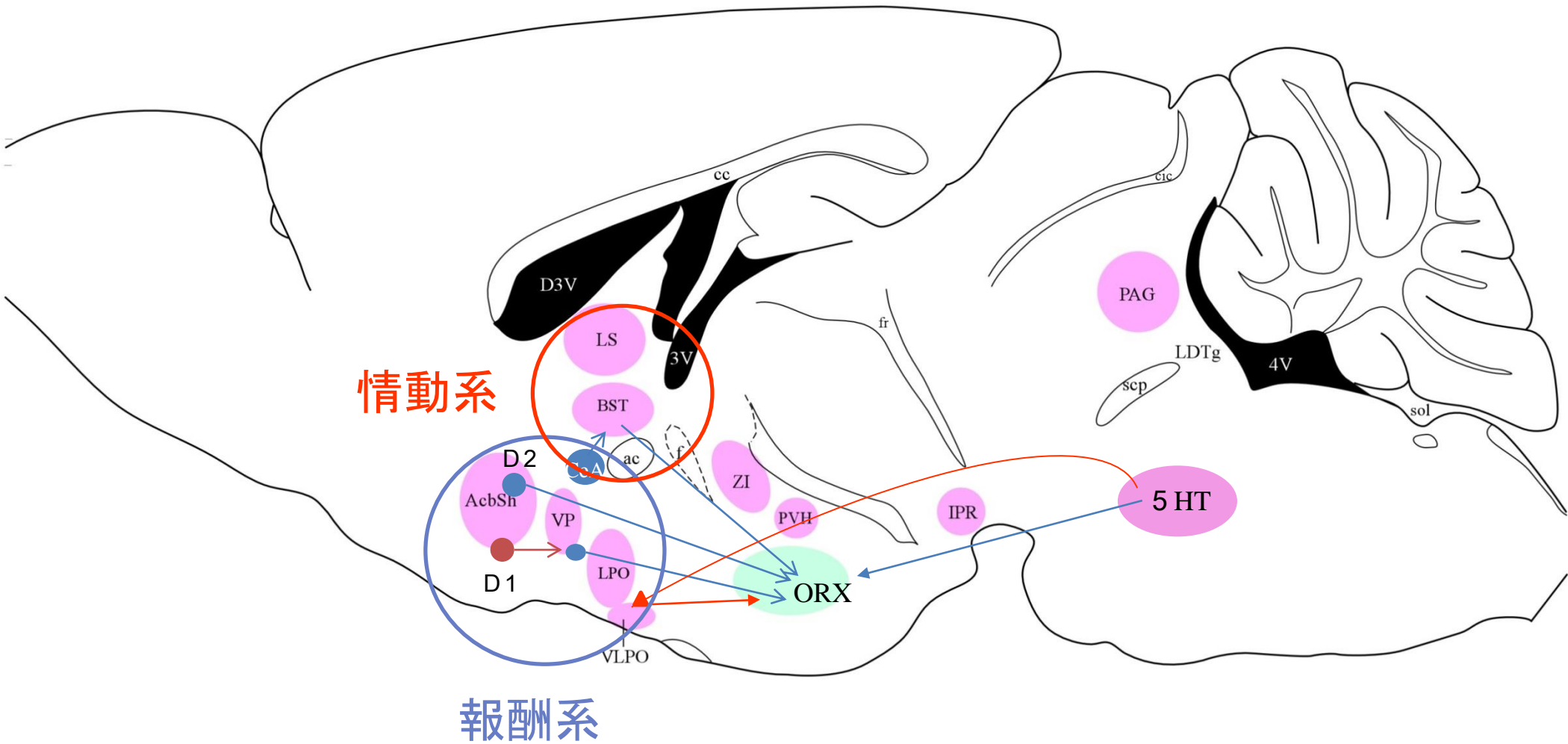


睡眠と覚醒に影響を与える3大要素

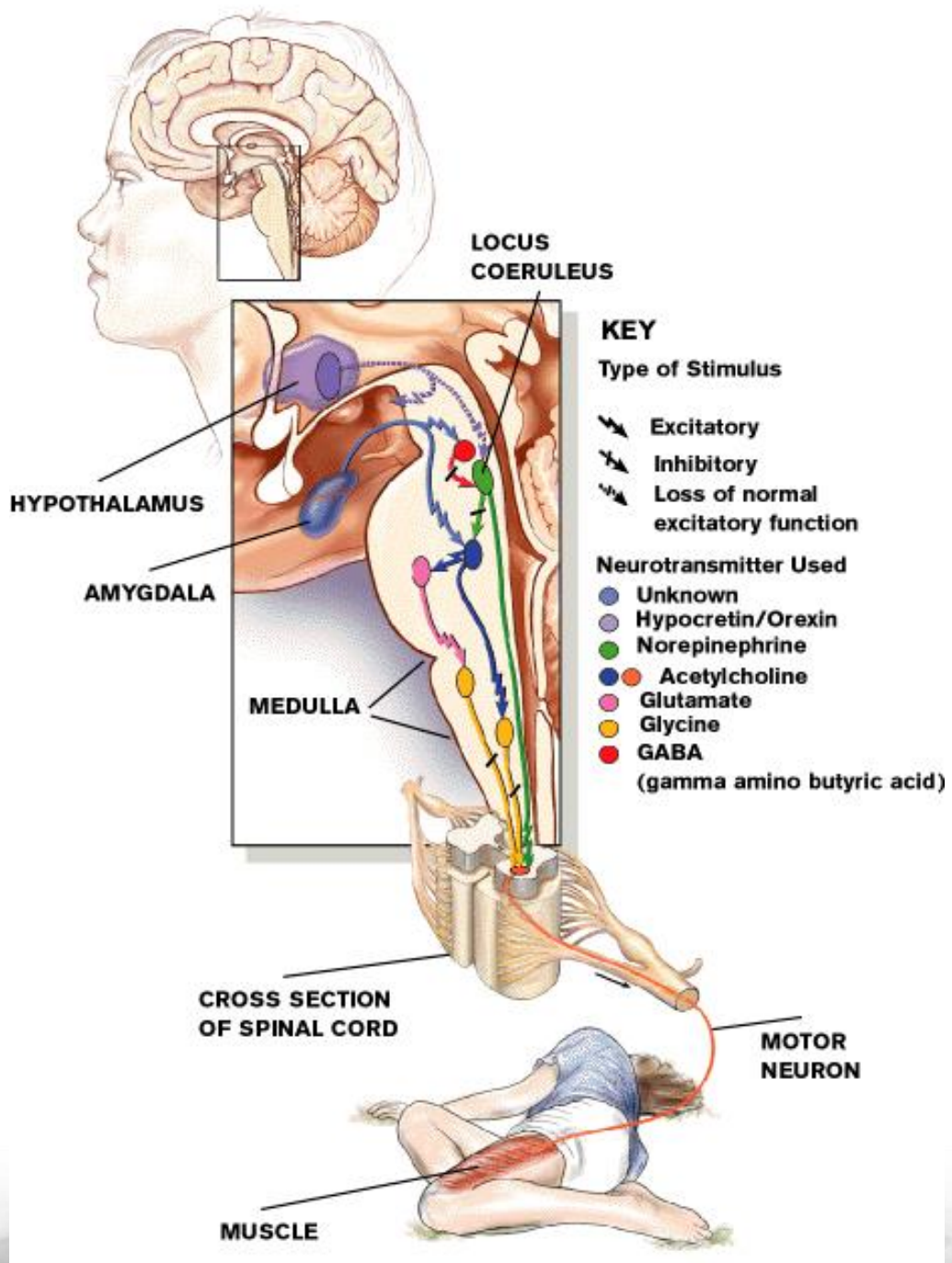
Three major factors that affect
sleep/wakefulness

- 情動 Emotion
- 睡眠負債(睡眠圧) Sleep pressure (sleep debt)
- 体内時計 Biological Clock
- 栄養状態

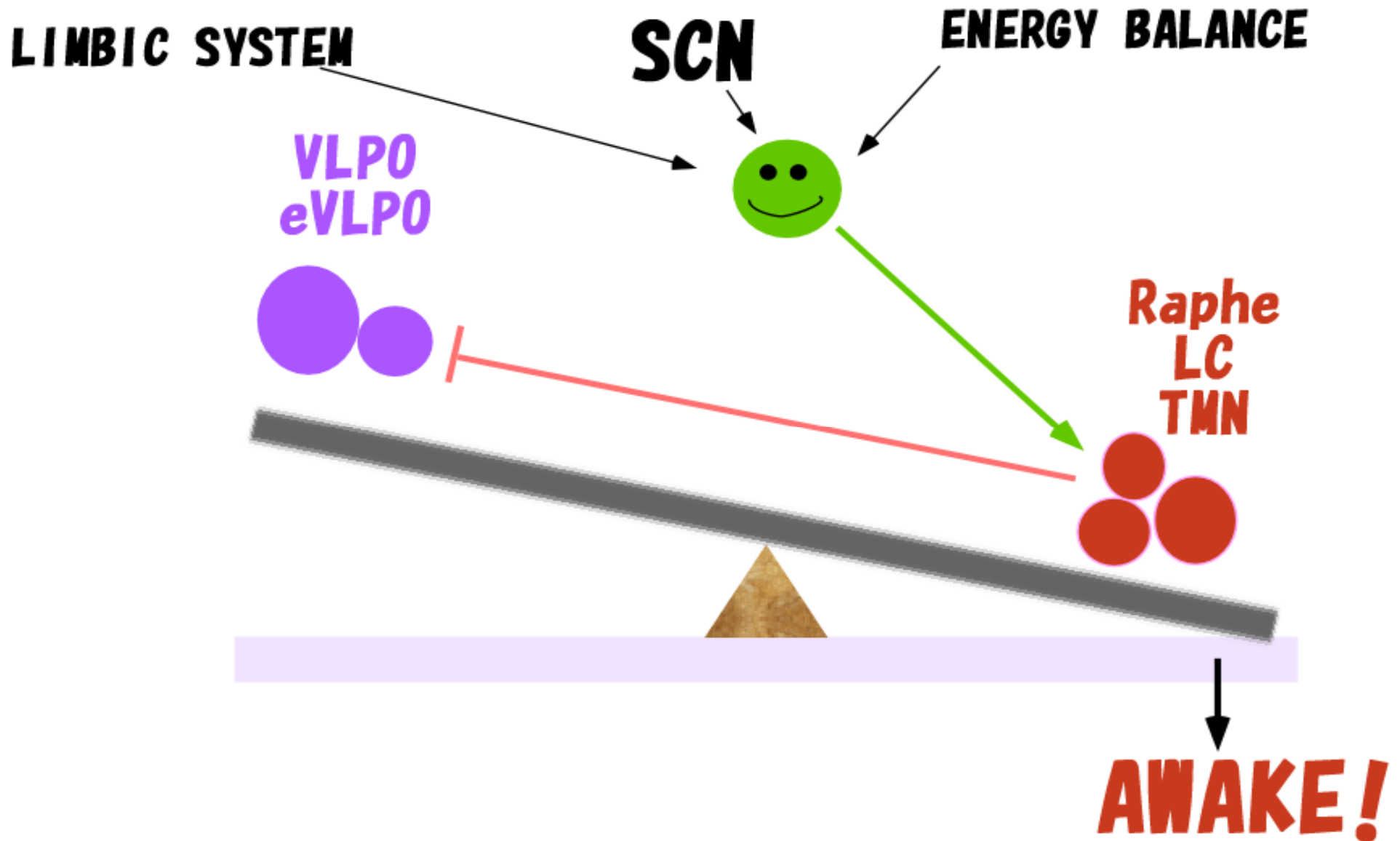
オレキシンニューロンへの直接入力系



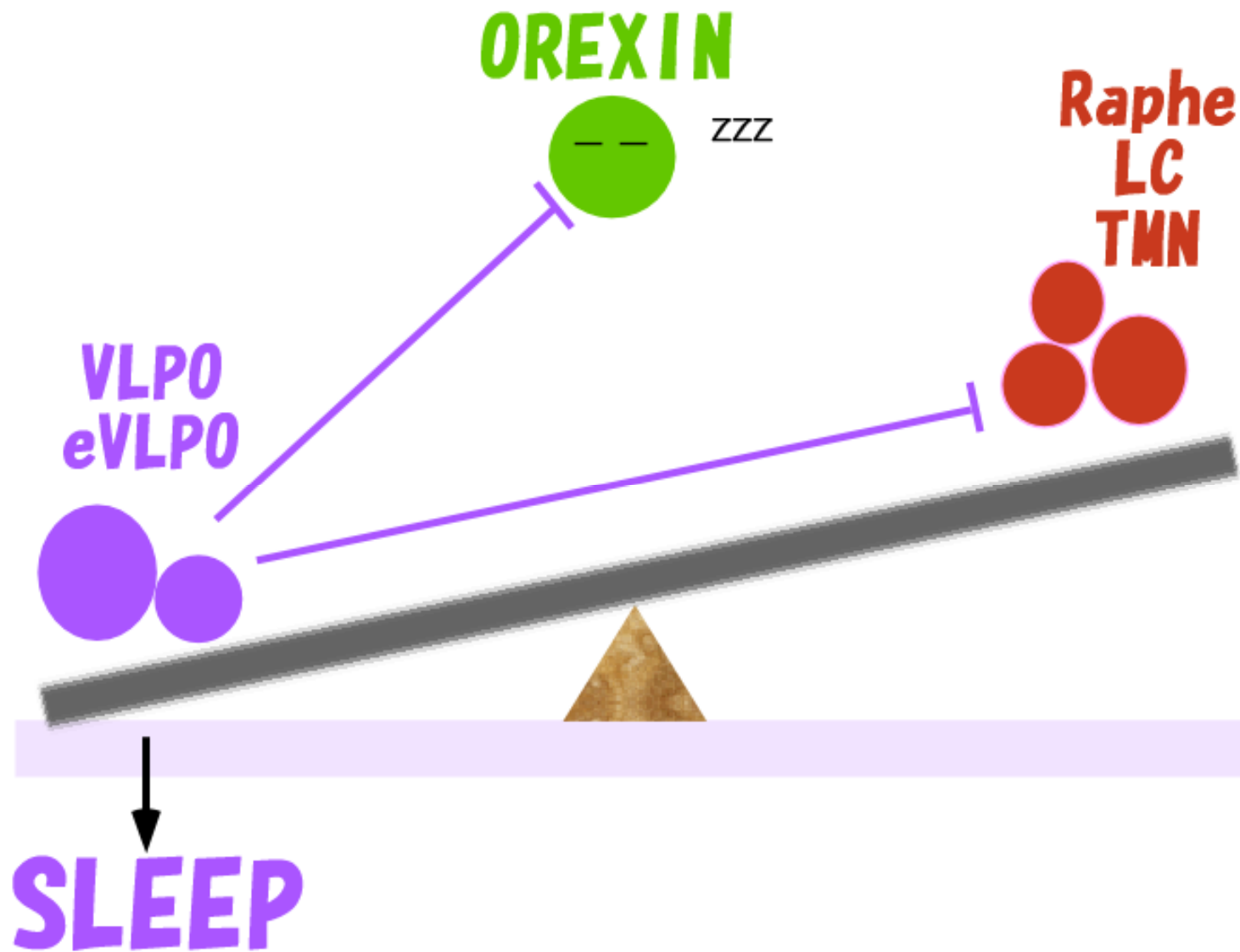
Mechanism of Cataplexy



オレキシシンニューロンはモノアミン・コリン作動性ニューロンに働き覚醒を支える



オレキシン神経とモノアミン神経はVLPO(睡眠中枢) から抑制性的の影響を受けることにより睡眠が引き起こされる。



オレキシニンニューロンはモノアミン・コリン作動性ニューロンに働き覚醒を支える

LIMBIC SYSTEM

SCN

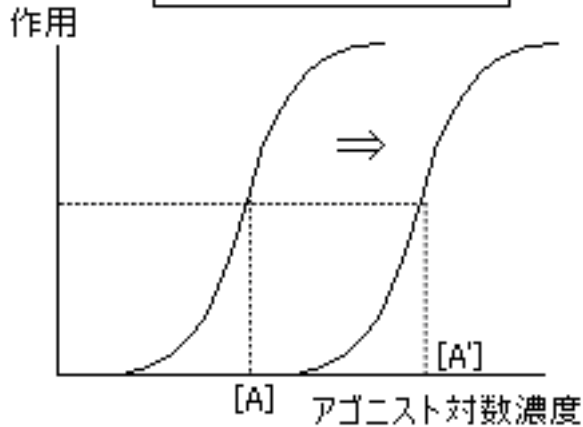
ENERGY BALANCE

VLPO
VLPO

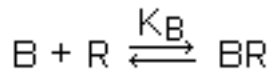
スボレキサント

Raphe
LC
TMN

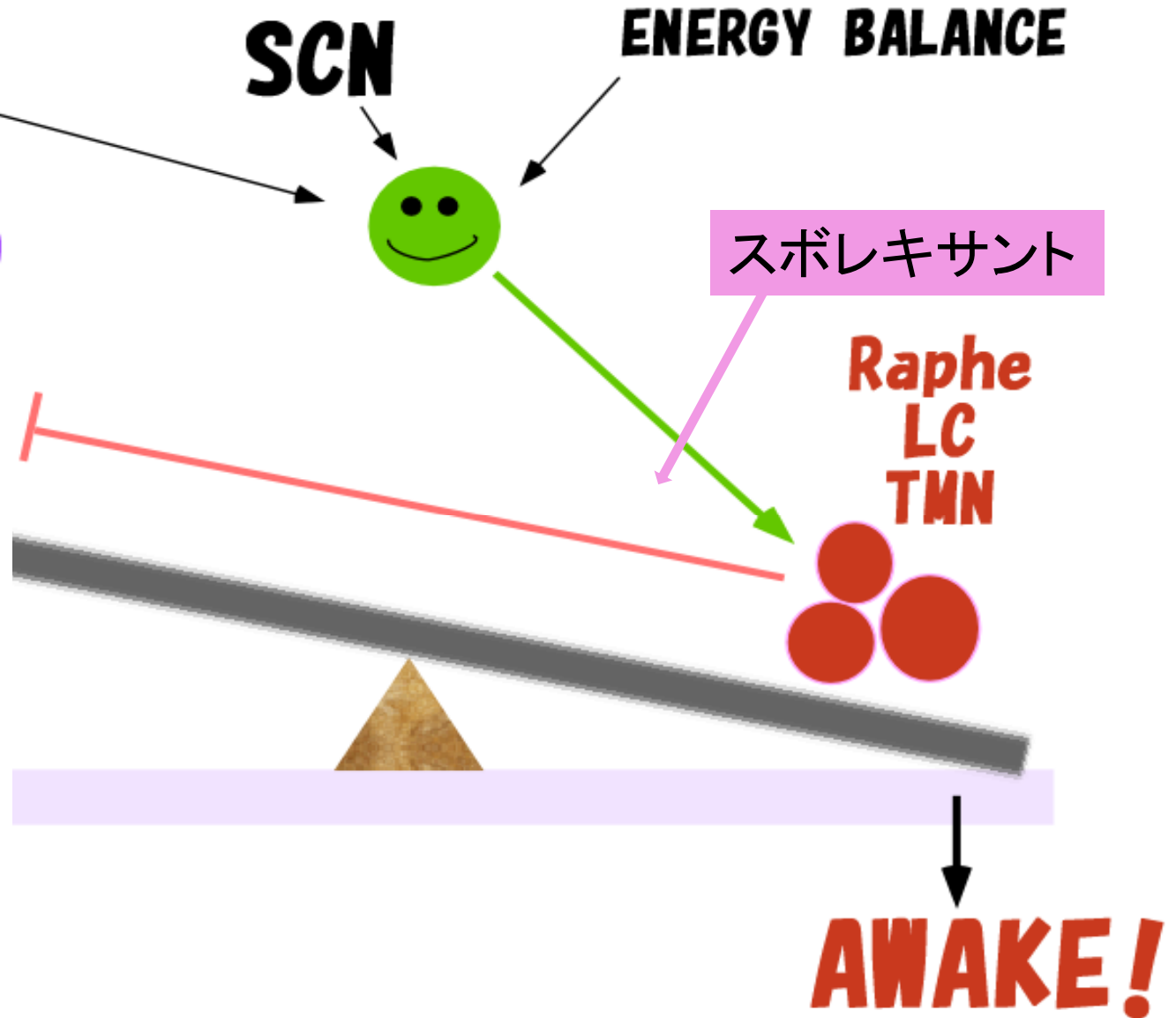
競争アンタゴニスト



アンタゴニストをBで表すと、



$$\frac{[A']}{[A]} - 1 = \frac{[B]}{K_B} \quad (\text{シルドの式})$$

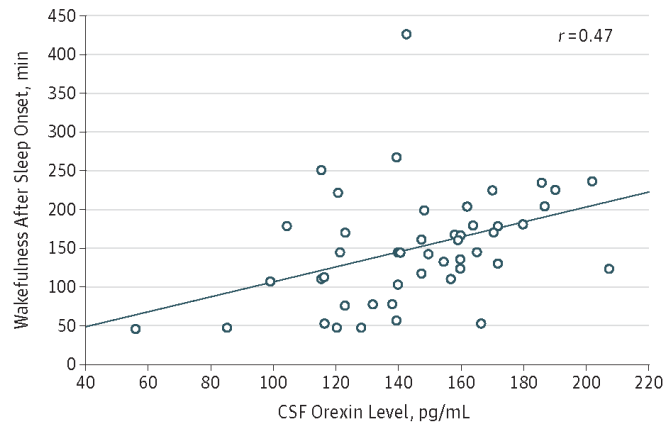


Original Investigation

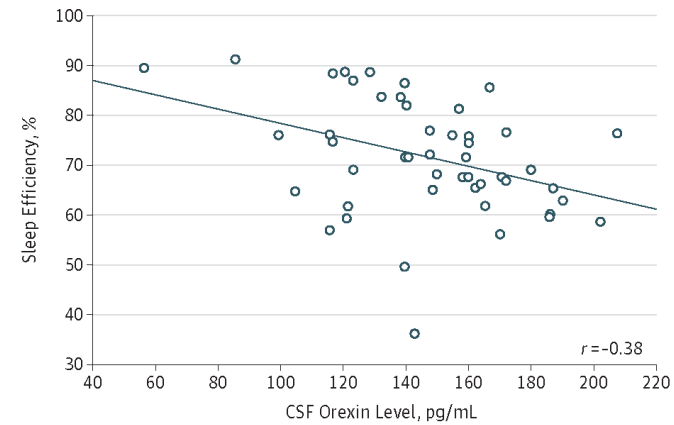
Orexinergic System Dysregulation, Sleep Impairment, and Cognitive Decline in Alzheimer Disease

Claudio Liguori, MD; Andrea Romigi, MD, PhD; Marzia Nuccetelli, PhD; Silvana Zannino, MD; Giuseppe Sancesario, PhD; Alessandro Martorana, MD; Maria Albanese, MD; Nicola Biagio Mercuri, MD; Francesca Izzi, MD, PhD; Sergio Bernardini, MD; Alessandra Nitti, BSc; Giulia M. Sancesario, PhD; Francesco Sica, MD; Maria G. Marciani, MD, PhD; Fabio Placidi, MD, PhD

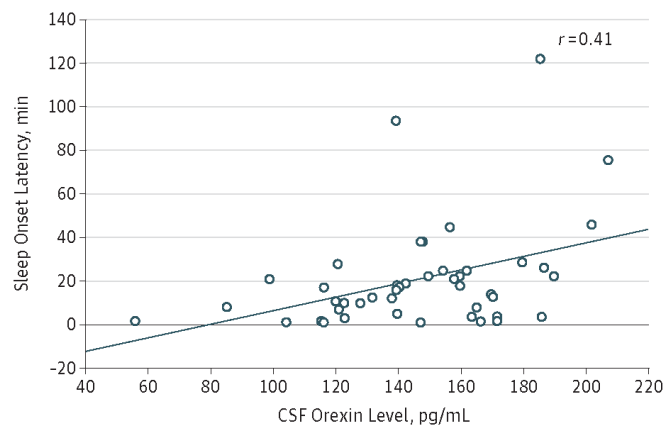
A Correlation of orexin level with wakefulness after sleep onset



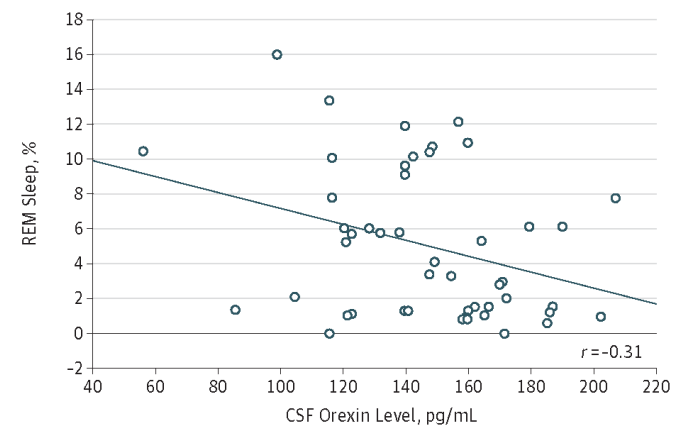
B Correlation of orexin level with sleep efficiency



C Correlation of orexin level with sleep onset latency



D Correlation of orexin level with REM sleep



不眠症 Insomnia

不安⇒ 過覚醒 ⇒不眠

↑

↓

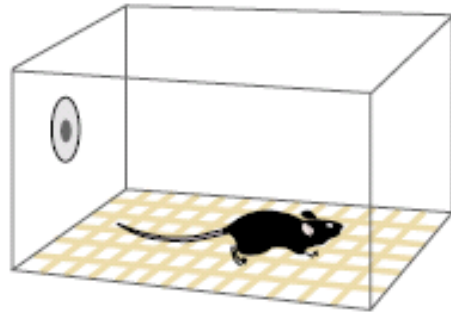
”不眠に対する“不安

不眠の慢性化には、情動記憶(恐怖学習)がかかわる

恐怖条件付け

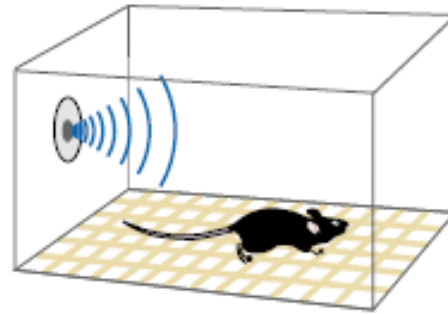
Context Conditioning

Training

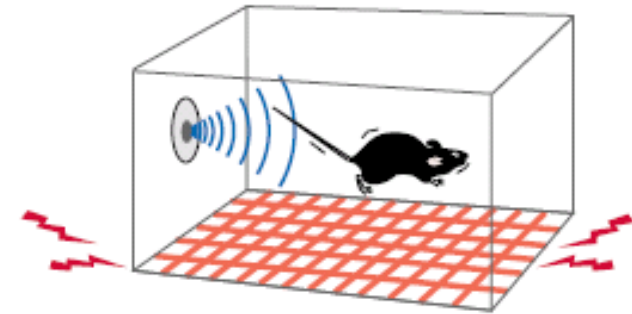


Exposure to Context

A

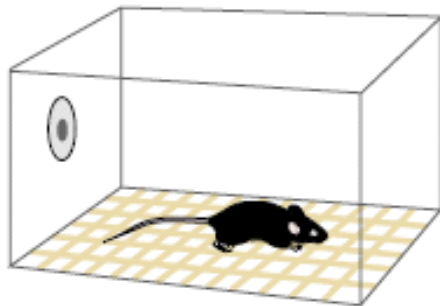


Onset of Sound (CS)



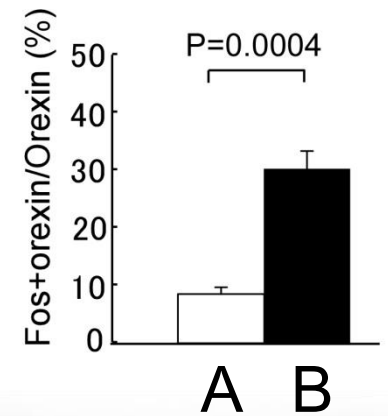
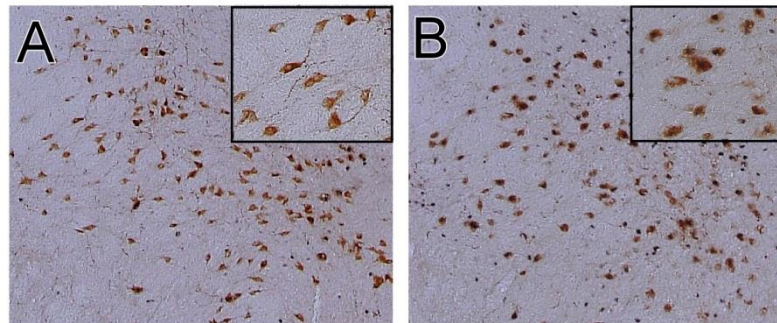
Onset of Shock (US)

Testing



Same Context
1 hour and 24 hours

B



Ox1r^{-/-} は手がかりによるすくみ行動が減弱

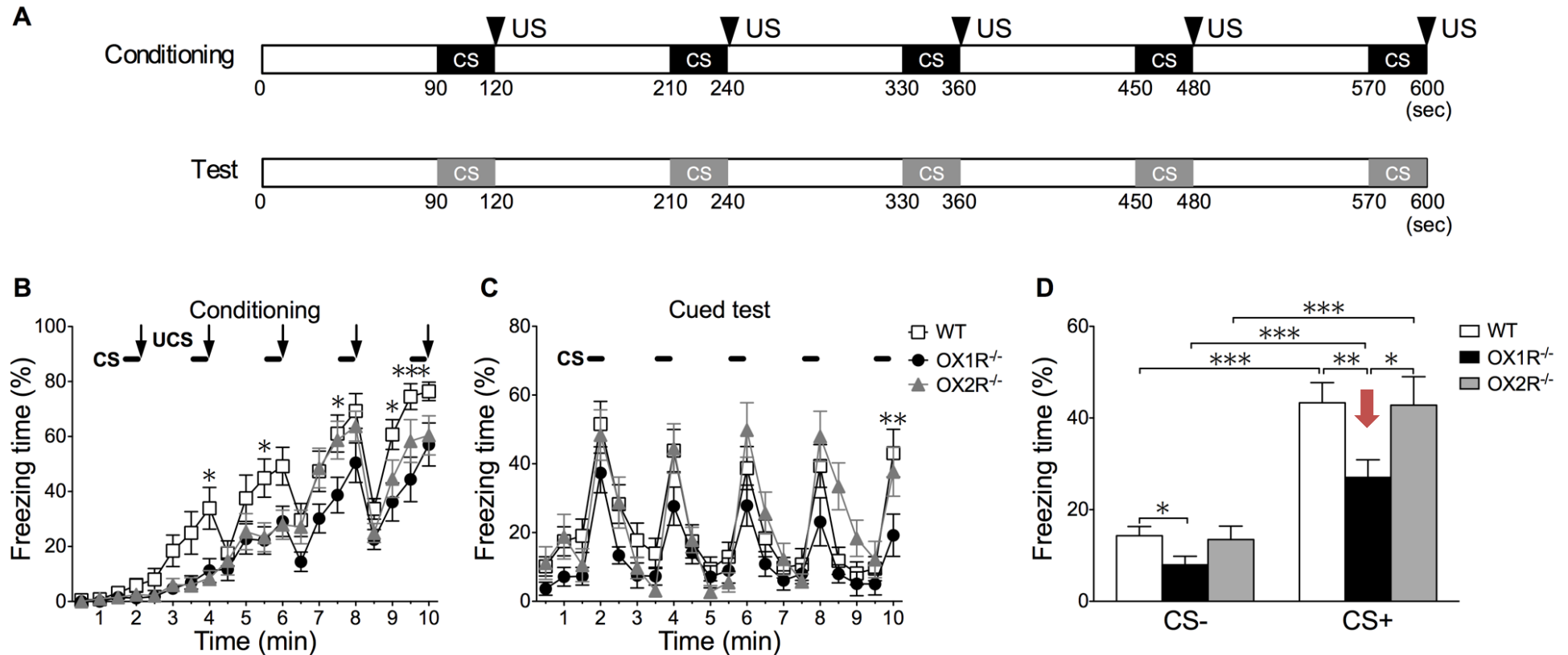
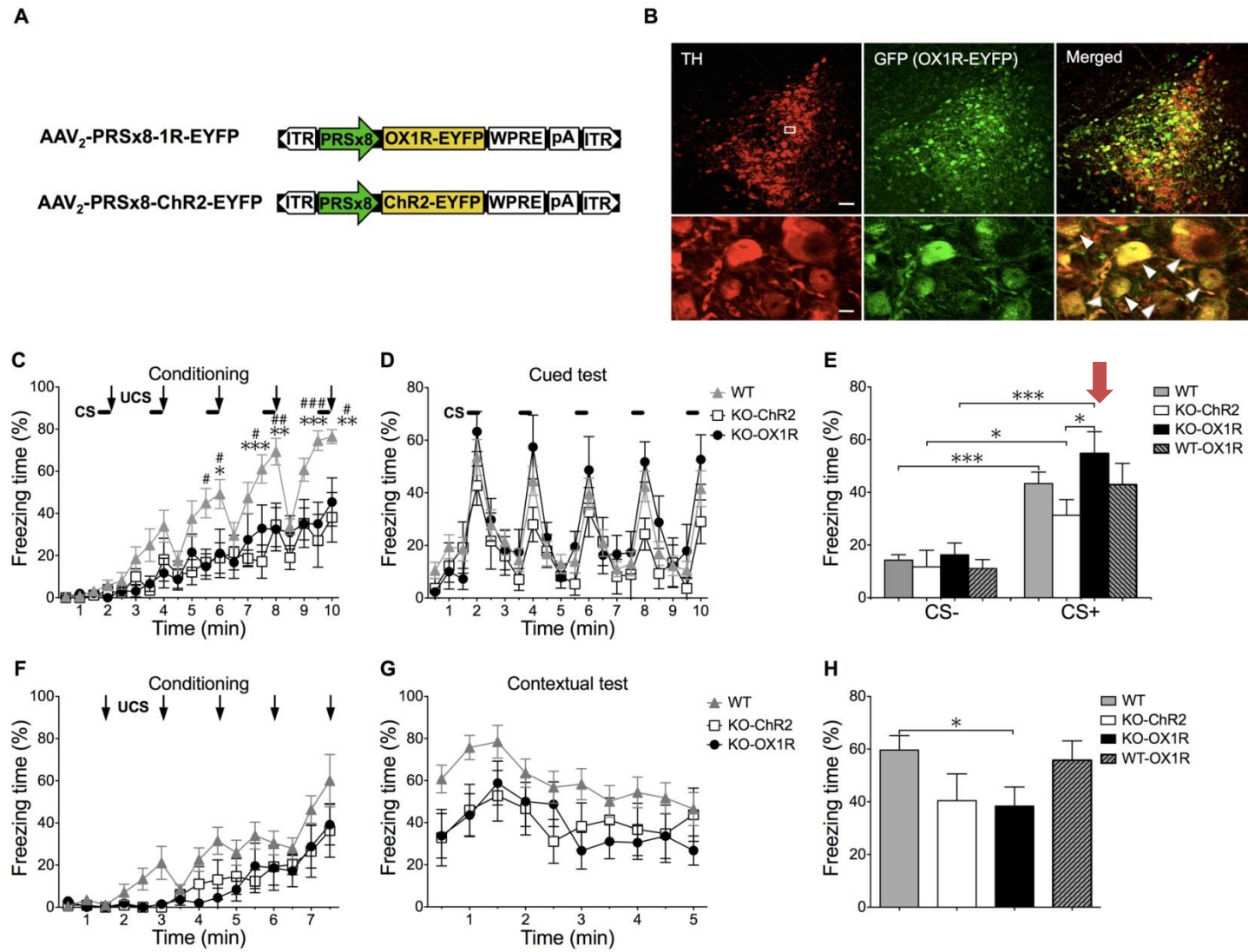
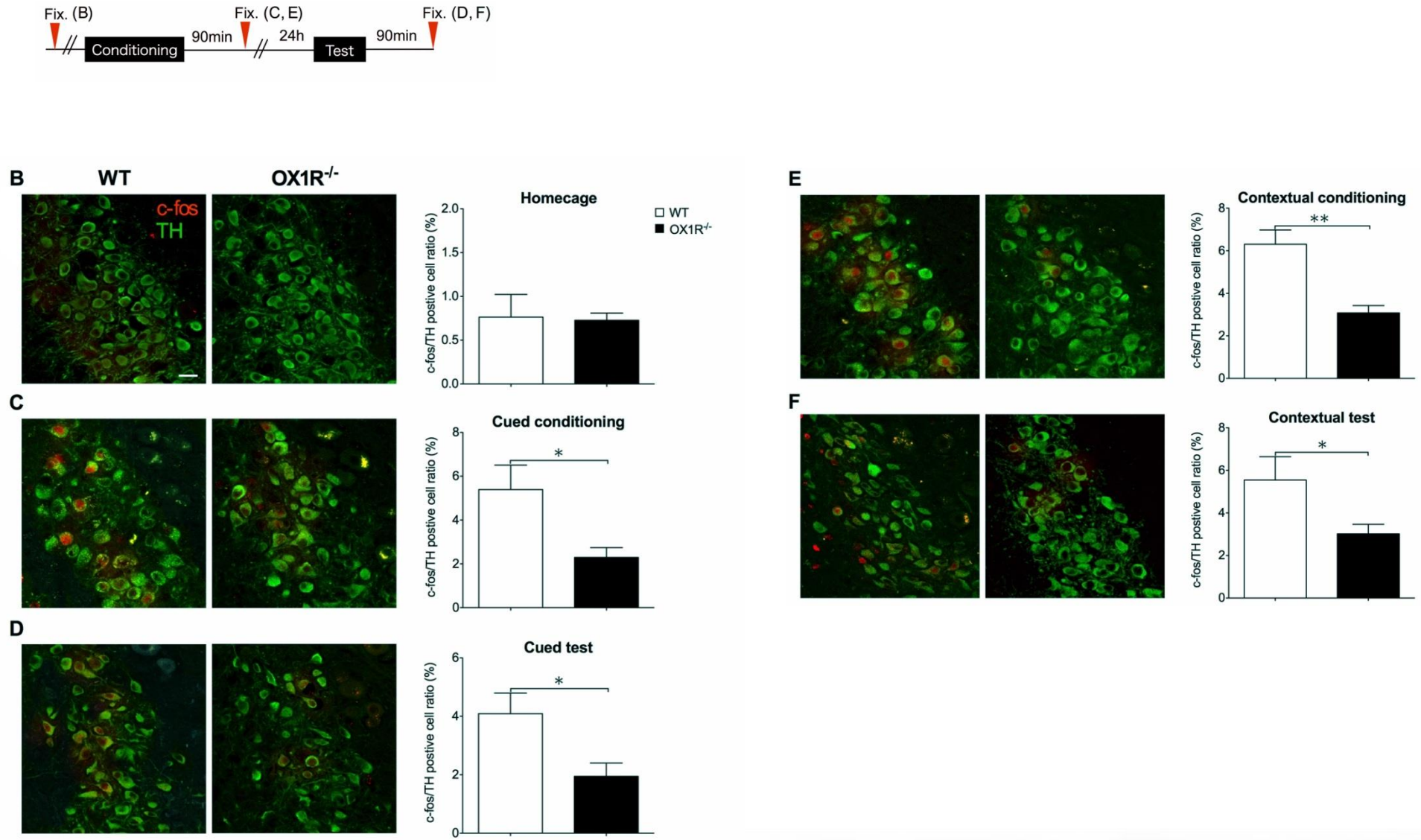


Figure 1

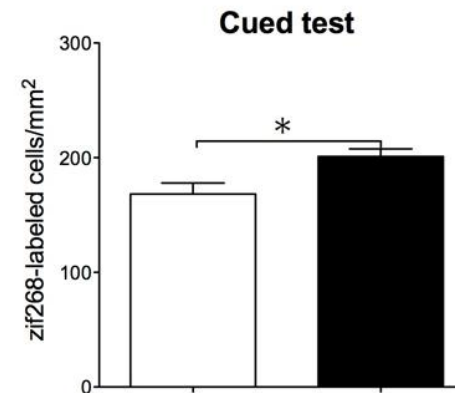
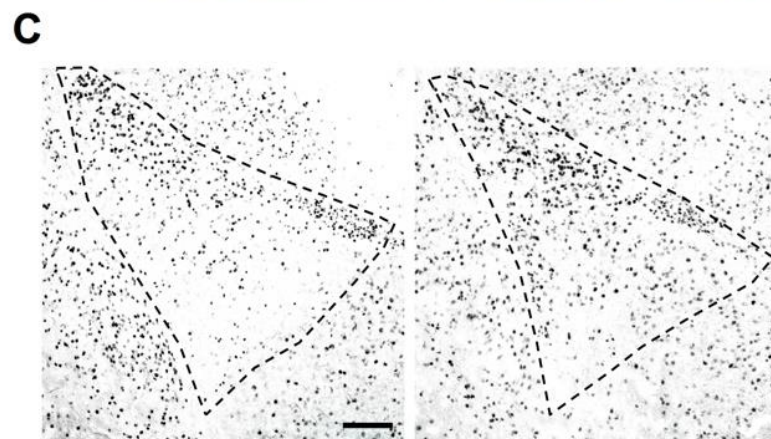
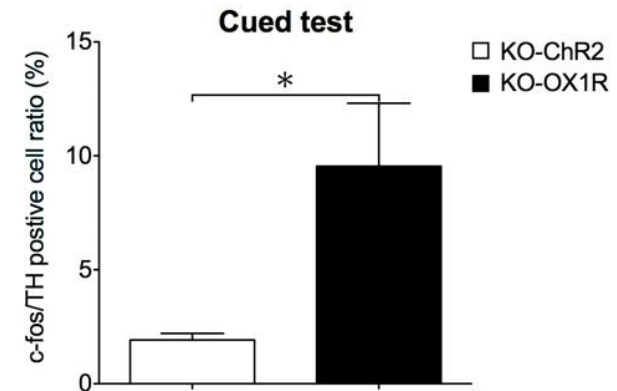
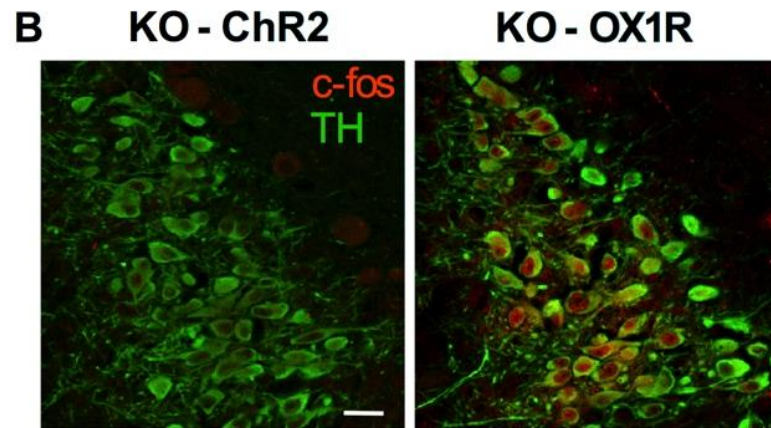
OX1R欠損マウスすくみ行動の減弱はLCのNAニューロンにOX1Rを発現させることによって回復



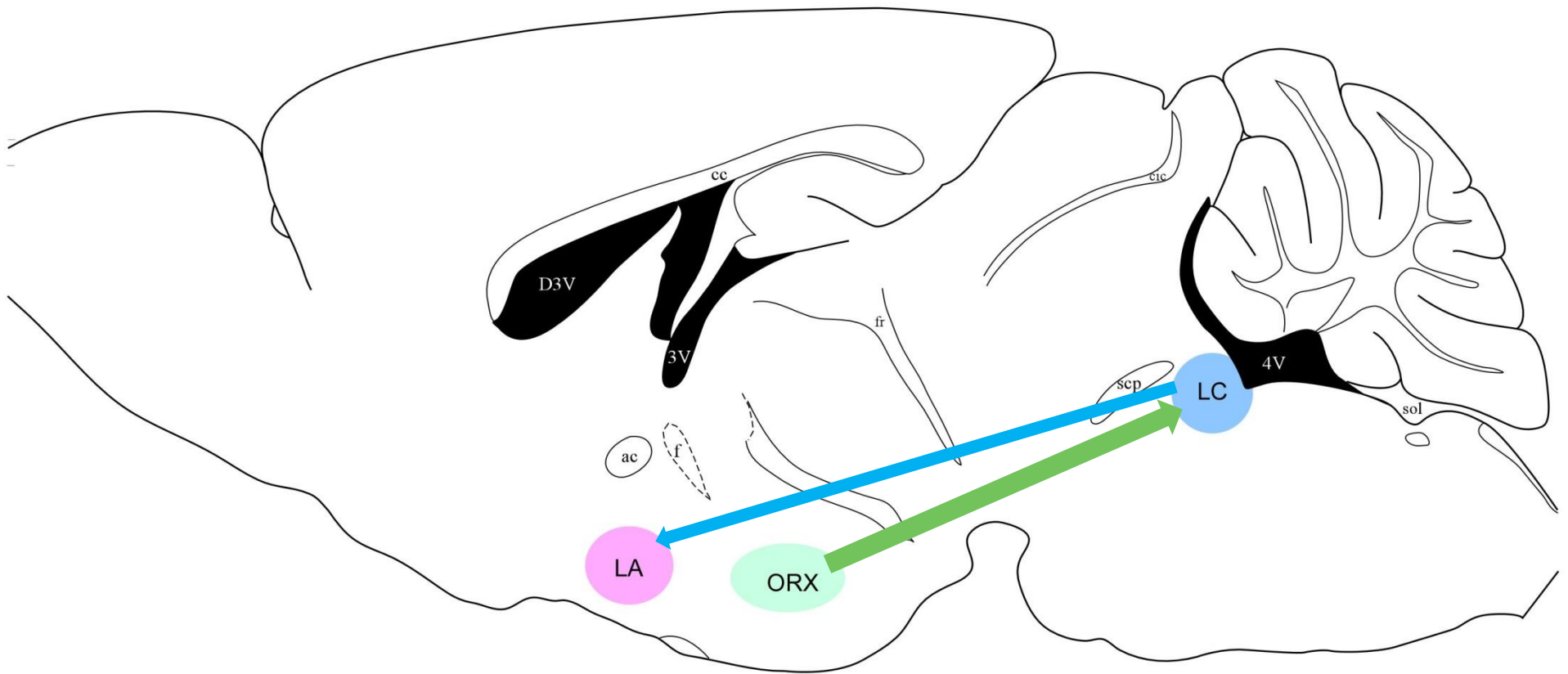
Impaired response of LC-NA neurons of *Ox1r*^{-/-} mice after exposure to fearful situations



Restoration of OX1R expression in LC-NA neurons normalized response of these cells to CS tone in *Ox1r*^{-/-} mice

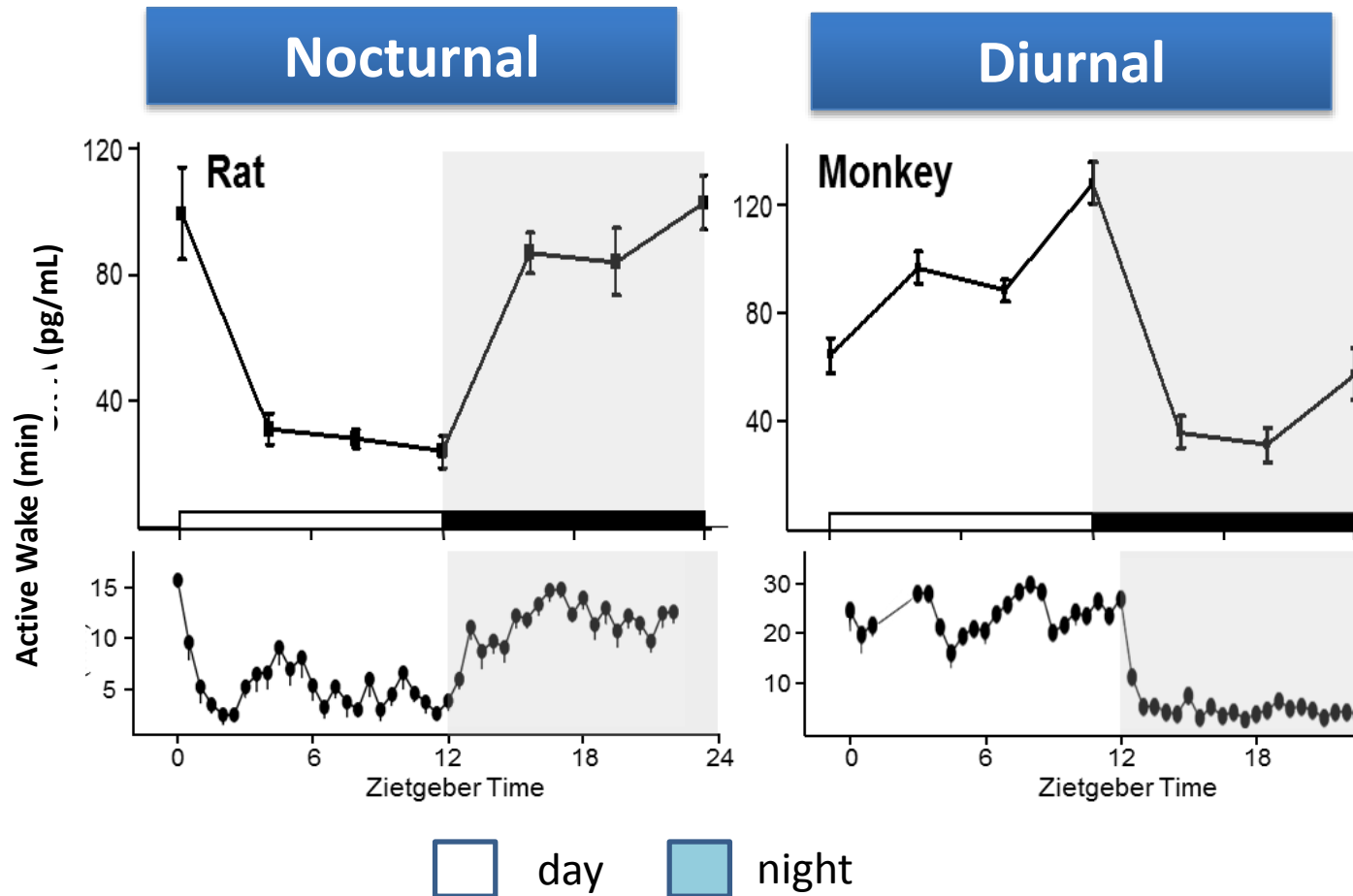


Regions Containing Neurons that send Direct Input to Orexin Neurons



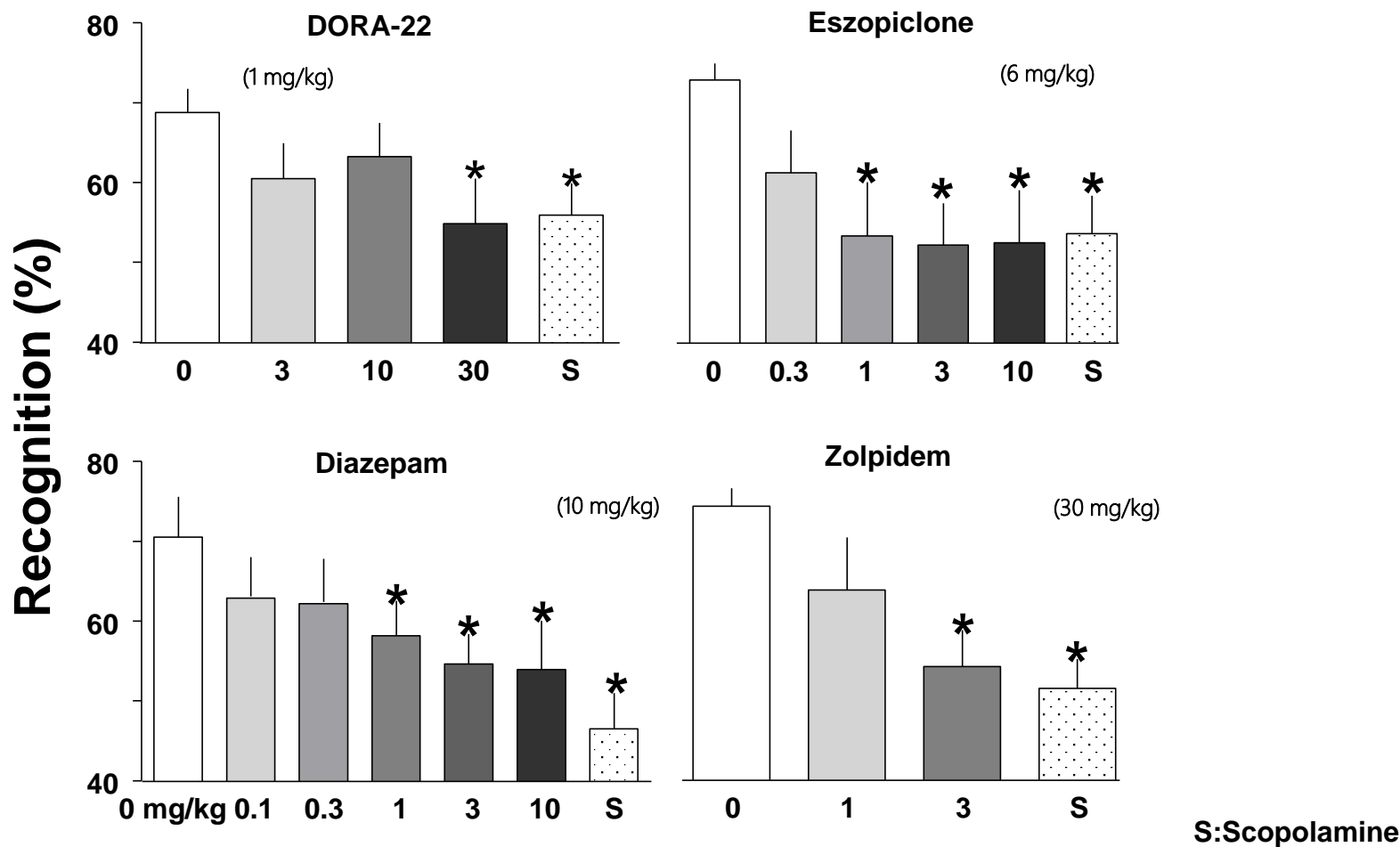
オレキシン量の日内変動

1. Zeitzer JM et al. *J Neurosci* 2003;23:3555–3560
2. Taheri et al. *Neurosci Lett* 2000;279:109–112



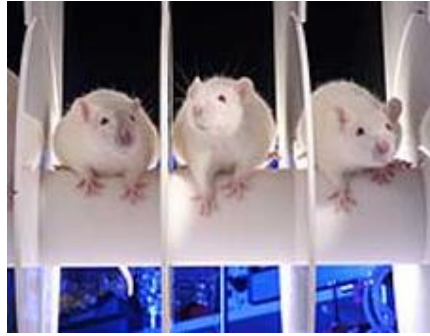
DORA-22、エスゾピクロン、ジアゼパム、ゾルピデムの 認知機能への影響(ラット)

各薬剤服用後の新規物体認識試験(Novel object recognition test)による
ラット認知機能への影響

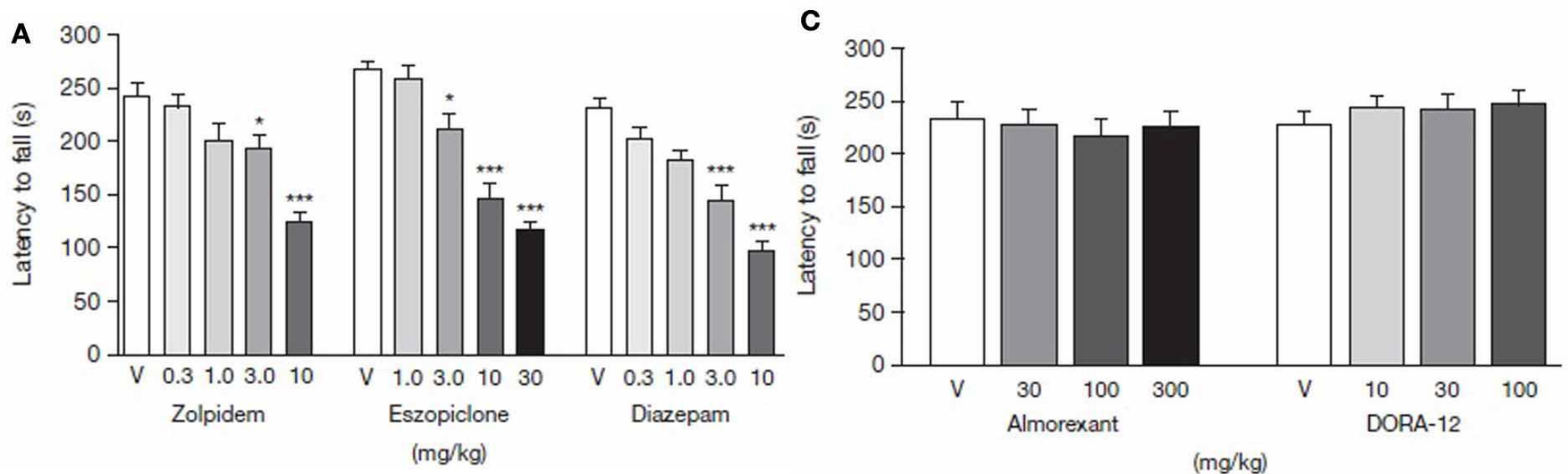


Effect of oral administration of DORA-22, eszopiclone, diazepam, or zolpidem on rat performance in the novel object recognition test. Scopolamine administered intraperitoneally at 1 mg/kg was used as a positive control. Compounds were given 30 min before the first exposure to the objects and arena (E1), and animals were tested for novel object recognition 60 min after E1 (90 min after dosing). 50% = chance recognition. Recognition was analyzed using between-subjects ANOVA to determine main effects and Fisher's least significance difference post hoc tests to compare to vehicle. n = 10 to 22 animals per group. *P < 0.05, significantly lower than vehicle.

DORA-12、Almorexant、ゾルピデム、エスゾピクロン、ジアゼパムの運動機能への影響(マウス)



各薬剤服用後のマウスの運動機能への影響 (Rotarodから落ちるまでの時間)



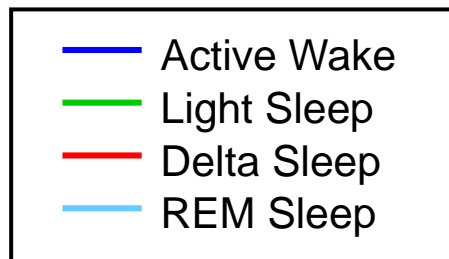
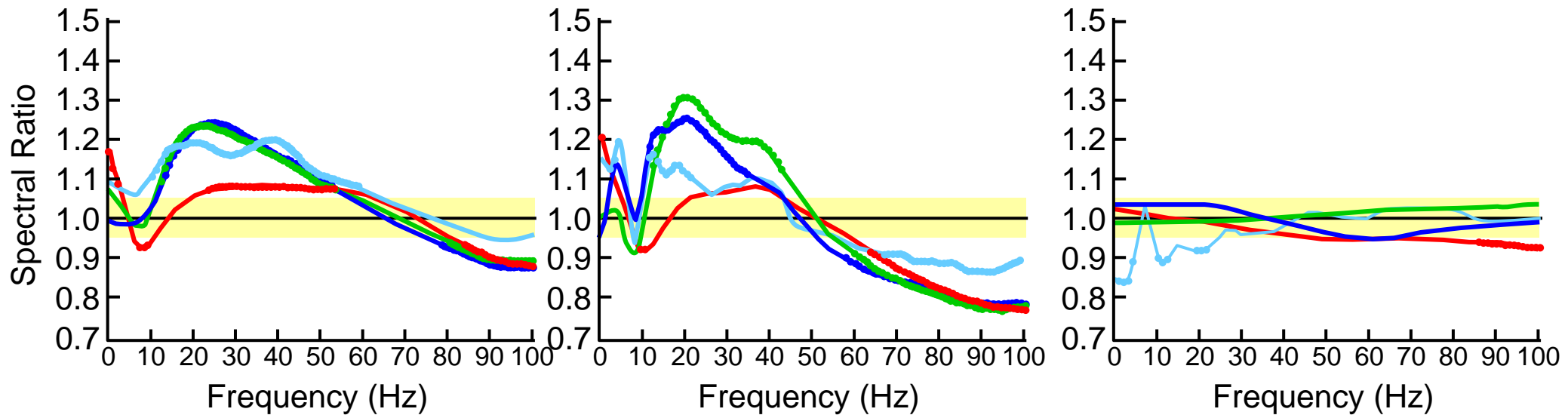
Comparison of GABA-A receptor modulators and orexin receptor antagonists in terms of latency to fall using rotarod as a measure of motor performance. Paraoral acute administration of zolpidem, eszopiclone and diazepam dose dependently impairs rotarod performance. Paraoral doses of orexin receptor antagonists, almorexant and DORA-12, do not impair locomotor performance after acute administration. Data are shown as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ for the level of significance vs. the vehicle-treated group. ANOVA *post-hoc* Newman-Keuls multiple comparison tests ($n = 7-12$). ANOVA, analysis of variance; PO, per oral; V, vehicle.

オレキシン受容体拮抗薬は、 睡眠構築や脳波スペクトルに対し影響を与えない

Eszopiclone

Zolpidem

DORA-22



依存性に関する非臨床試験 (サルの静脈内自己投与試験(TT #08-9003))

Figure 4 Response Rate

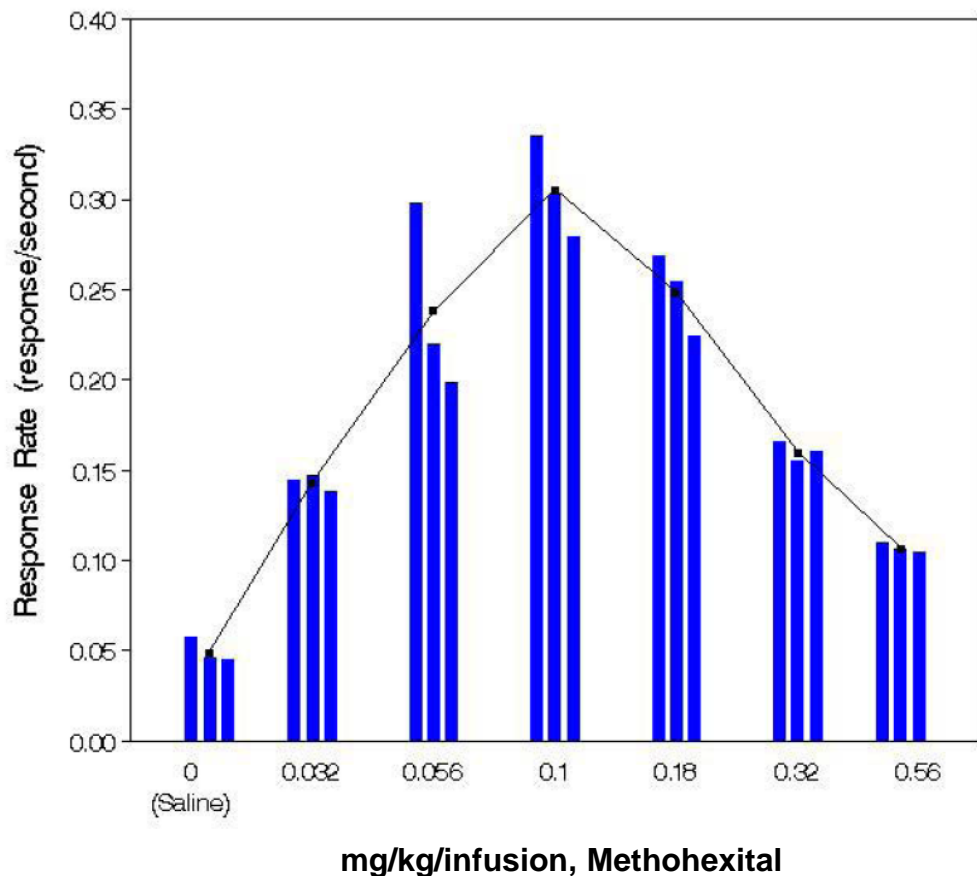
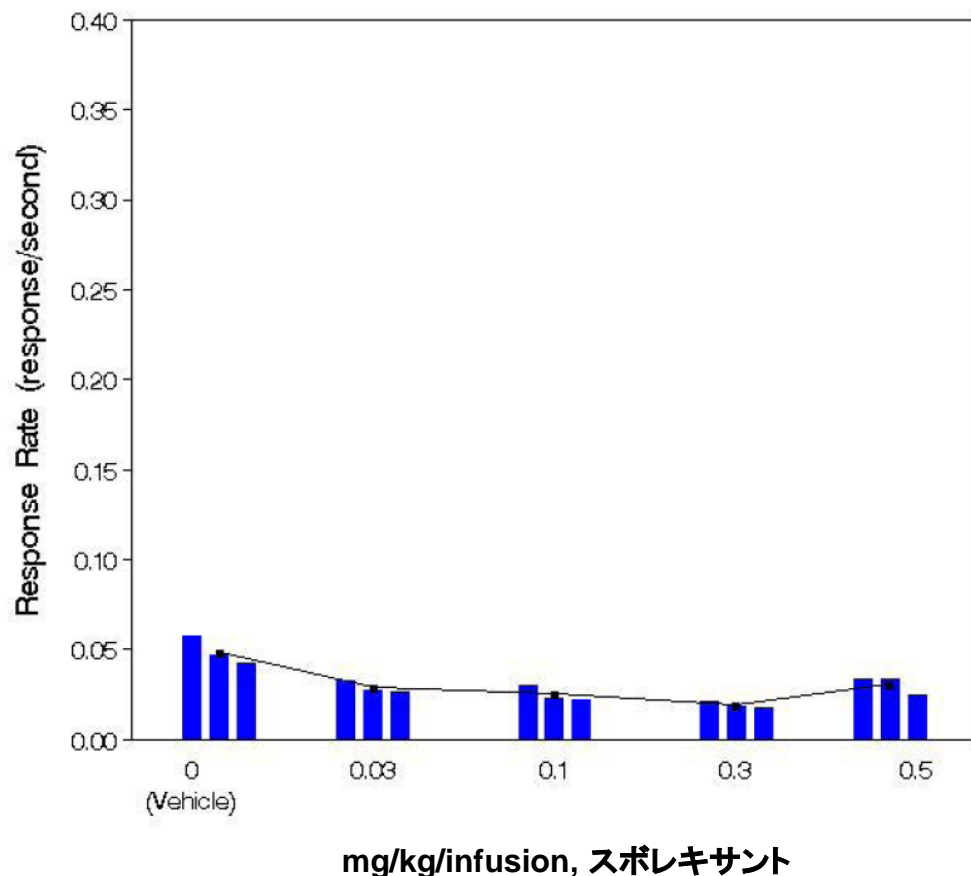


Figure 4A Response Rate



Acknowledgement

Kanazawa University

Michihiro Mieda, Takashi Maejima, Yuki
Saito, Shingo Soya, Emi Hasegawa

Center for Behavioral Molecular Genetics

University of Tsukuba

Masashi Yanagisawa

University of Texas, Southwestern Med
Center

Jon T. Willie

Carsten T. Beuckmann

Masashi Yanagisawa , Yaz Y Kisanuki