

解 説

レム睡眠の開始機構:ドーパミンと扁桃体の役割

櫻井 武

筑波大学医学医療系/国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIIIS)

1. はじめに

レム睡眠の発見は、ユージン・アセリンスキーとナサニエル・クライトマンの先見的な観察によるとされている。1953 年、彼らは乳幼児において、急速な眼球運動と静穏な睡眠が交互に現れる「活動的睡眠」を特定した。その後、彼らは、急速な眼球運動が特定の脳波パターンと関連していること、また、成人した人間の場合、この時期にストーリー性のある夢を見ることを明らかにした。Jouvet はネコにも同様の状態があることを突き止め、レム睡眠時に骨格筋の緊張低下と覚醒状態に似た皮質活動、および急速眼球運動を伴うことを示した。その後、有袋類、鳥類のほか、トカゲ、ゼブラフィッシュ、タコなど、さまざまな動物種でレム睡眠、あるいは Rapid eye movements, REM 睡眠に似た状態が確認されている。これらのことから、レム睡眠は動物界で保存されている現象であり、正常な生物学や生理学に関与していることが示唆されている。レム睡眠は、もともと急速な眼球運動によって識別されていたが、現在では、さまざまな生理的特徴によって特徴づけられることがわかっている。例えば、振幅が小さく周波数が速い脳波、海馬由来の高振幅シータ波、骨格筋活動の積極的抑制(レム・アトニア)、断続的な筋肉の痙攣、自律神経の変動、脳・体温の変動、覚醒閾値の上昇などが挙げられる。覚醒に似た脳波パターンと骨格筋の無緊張の組み合わせから、一部の科学者は REM 睡眠を「逆説的睡眠 paradoxical sleep」と呼ぶ。Jouvet は当初、橋がレム睡眠を生み出すことを発見したが、過去 20 年間で、REM 睡眠のメカニズムの理解において大きな進展があった。その多くは、オプトジェネティクスや神経回路トレーシングなどの新しい技術により、REM 睡眠調節に関わる脳回路や神経伝達物質を高精度に調べることができるようになったためである。現在では、延髄、中脳、視床下部などを含んだ神経回路が REM 睡眠のタイミング、持続時間、特徴を決定する役割を担っているこ

とがわかってきている。

睡眠覚醒状態は、脳幹／視床下部にあるモノアミン作動性ニューロンの活動に強く影響されている。これらのニューロンは、小さな核に由来するが、大脳皮質、前脳基底部、外側視床下部(LH)、視床など脳の広い領域に広く軸索を投射し、覚醒状態を維持するために働いている。このうち、青斑核のノルアドレナリン(NA)ニューロン、結節乳頭核のヒスタミン(His)ニューロン、背側縫線核のセロトニン(5HT)ニューロンは、覚醒時には数 Hz の頻度で発火し、Non rem sleep, NREM 睡眠時には散発的に発火し、レム睡眠時にはほぼ完全に発火が停止するという類似した発火パターンを有している^{1), 2)}。しかし、黒質および腹側被蓋野(VTA)のドーパミン(DA)ニューロン(VTA-DA ニューロン)は、他のモノアミン作動性ニューロンとは異なる発火パターンを睡眠／覚醒状態間で示すと考えられてきた。VTA-DA ニューロンはレム睡眠時にバースト発火を示すと報告されている。一方、別の報告では VTA-DA ニューロンは睡眠・覚醒の段階にわたって平均発火率に変化がないとされていた^{4), 5)}。一方、最近のファイバーフォトメトリーによる細胞内カルシウム計測の結果、VTA-DA ニューロンは NREM 睡眠時には覚醒時や REM 睡眠時に比べて低い活性を示すことが明らかになっている⁶⁾。また、最近のウィルストレーサーを用いた研究により、VTA-DA ニューロンは入出力組織の異なるヘテロな異種集団で構成されていることが明らかになっている^{7), 8)}。このことは、睡眠／覚醒調節に異なる役割を持つ複数の VTA-DA ニューロン集団が存在し、睡眠覚醒状態に応じて異なる発火パターンで存在する可能性も考えられる。

2. 睡眠覚醒状態の変遷に伴う脳各部位におけるドーパミン濃度の変化

私達のグループは、睡眠覚醒状態に応じて異なる動態を持つ VTA-DA ニューロンの亜集団の存在を検討す

るため、いくつかの脳領域において、睡眠／覚醒状態およびその変遷における DA 細胞外レベルの変化を調べた。マウスの扁桃体基底外側核(BLA)、側坐核(NAc)、内側前頭前野(mPFC)、視床下部(LHA)にドーパミンセンサーGRABDA⁹⁾を発現させ、DA 量と各睡眠／覚醒状態遷移の関係をフォトメトリーによって調べた。その結果、NREM から REM への移行時の DA 動態には少なくとも3つのパターンがあることがわかった。BLAのDA濃度は、各 NREM-REM 遷移の直前に始まる一過性の上昇と REM 睡眠中の有意な減少という特徴的なパターンを示した(図1)。DA 値の上昇はNREM睡眠からREM睡眠への移行より早く始まっていた。NAcにおいても、DA濃度はNREM-REM睡眠移行前に上昇し、REM睡眠中に平均値がやや高くなる変動を示した。mPFCとLHAでは類似したDAレベルの時間的パターンを示しREM睡眠中に大きく減少した(図1)。

BLAにおけるNAや5HT濃度の遷移は、DAとは全く異なるパターンを示し、NREM睡眠からREM睡眠への移行においては、遷移前に上昇することはなく、REM睡眠中に大きく低下していた。このNAや5HTの挙動は脳内の他の部位においても共通しており、単一の、あるいは類似した発火パターンをもつNAおよび5HT細胞集団が各部位に投射している可能性が高い。

3. BLAにおけるDAレベルの上昇はノンレム睡眠からレム睡眠への移行を引き起こす

NREM睡眠からREM睡眠に移行する際のBLAにおけるDA増加が、睡眠・覚醒状態にどのような影響を与えているかを明らかにするために、NREM睡眠中におけるDA上昇を人為的に惹起して検討した。DAT-ires-CreマウスのVTA-DAニューロンにstabilized step function opsin(SSFO)¹⁰⁾を発現させ、BLAに光ファイバーを留置し光遺伝的に興奮させた(1秒幅)。NREM睡眠中にBLAに投射しているDA神経終末を興奮させると、刺激後140秒ほどでREM睡眠へ移行され、対照群よりはるかに早かった(図2)。BLAに投射しているDA神経終末をZT,

zeitgeber time ZT8からZT11まで30分おきに興奮させると、REM睡眠が増加し、NREM睡眠が減少した。

一方、NREM睡眠中にNAcやmPFC、あるいはLHのDA神経終末を興奮させても、REM睡眠に影響を与えなかった。さらにはBLAに投射しているVTA-DA神経終末を光遺伝学的に阻害すると、REM睡眠までの潜時が長くなり、REM睡眠量が減少した。このことから、BLAにおけるDAの上昇はNREM睡眠からREM睡眠への移行に関与していることがわかった。

4. BLAにおけるD2受容体陽性ニューロンの抑制がNREM睡眠からREM睡眠への移行を引き起こす

マウスにおいてDAを薬理的に枯渇させるとREM睡眠が大きく減少すること、また、ドーパミン2受容体(DRD2)作動薬を投与するとREM睡眠が回復することが報告されている¹¹⁾。また、DRD2作動薬を扁桃体に局所注射するとREM睡眠が増加する¹²⁾。これらのことからDAがBLAのDrd2陽性ニューロンに作用してREM睡眠を開始させる可能性が考えられた。BLAのDrd2陽性ニューロン(Drd2ニューロン)からパッチクランプ記録を行ったところ光照射によるVTA-DA神経終末の興奮はDrd2ニューロンに長時間持続する過分極を引き起こすことが明らかになった。

そこで、この過分極を人為的に模倣することでREM睡眠が誘導されるかどうかを調べた。BLAのDrd2ニューロンに、光によって過分極を誘導する脊椎動物低波長オプシン(vLWO)を発現させた。スライス標本を用いた全細胞記録では、光パルス(462nm, 1Hz, 40秒)を照射すると、VTA-DA神経終末を励起したときと同様に、vLWOを発現させたDrd2ニューロンは長時間持続的に過分極することが示された。マウスにおいてもDrd2ニューロンを光遺伝学的に抑制することにより、NREM睡眠はREM睡眠に移行した。REM睡眠は、光照射後89.2±20.3秒

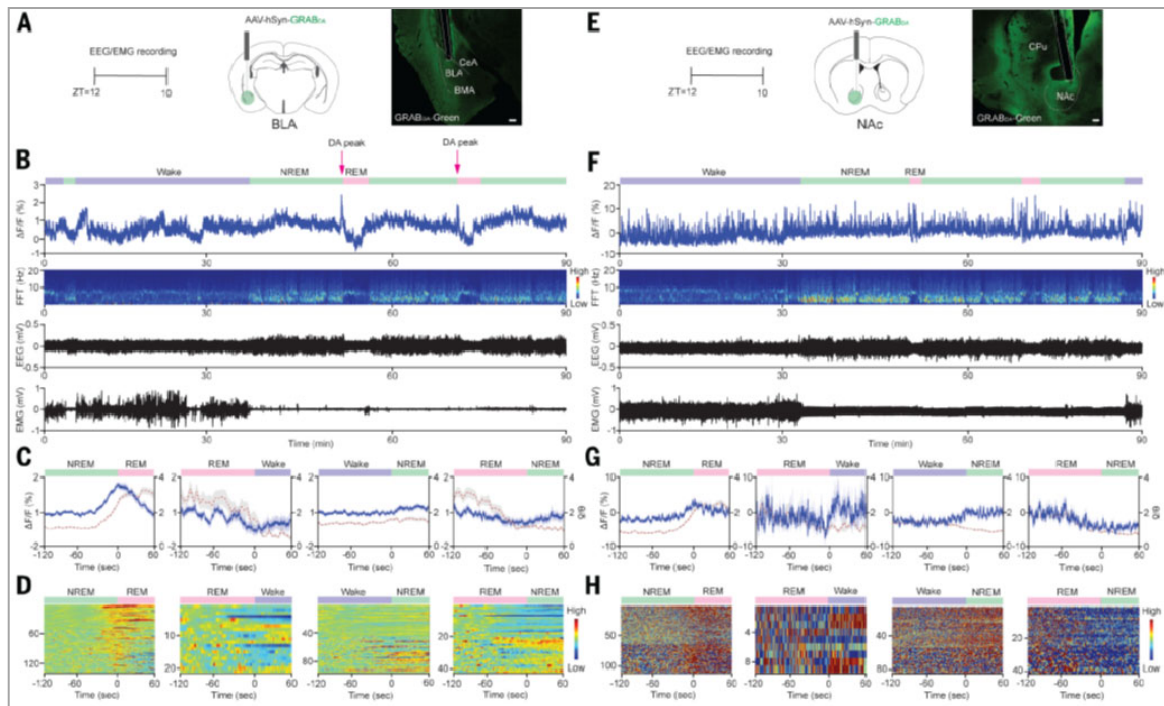


図 1. 睡眠覚醒状態における BLA と NAc における DA レベルの変化

(A), (E)左、実験デザイン。中、光ファイバーの位置と AAV 投与部位。右、抗 GFP(緑)抗体で染色した代表的な脳切片像。白線は光ファイバーの位置を示す。(B), (F) 上段、C57BL/6J マウスの BLA, NAc, における DA 濃度変化の代表的なトレース。紫、緑、ピンクのバーはそれぞれ覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠を示す。中、下、脳波と筋電図の時間分解パワースペクトルと波形。(C), (G)各遷移における DA レベルの時間変化(青)とシータ/デルタ比(赤の点線)(平均±SEM)。(D), (H) 各遷移における DA レベルを示すヒートマップ。

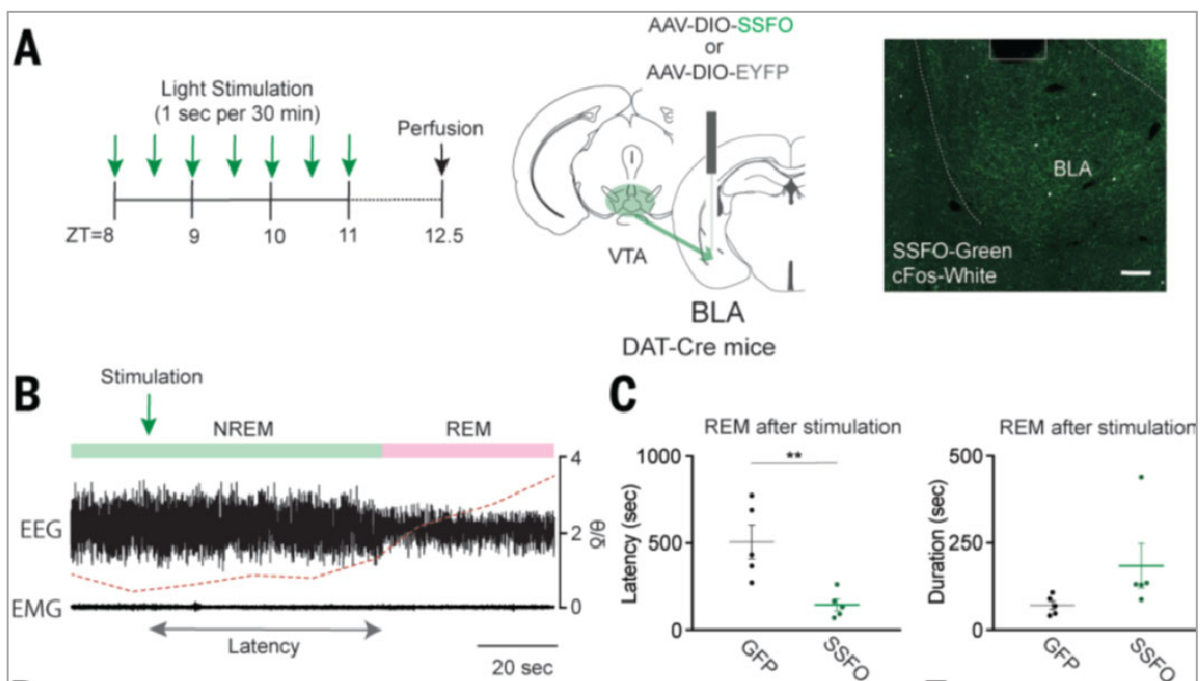


図 2. NREM 睡眠中における BLA へ投射している VTA-DA 神経終末の光遺伝学的興奮による REM 睡眠の誘導

(A)左、実験デザイン。中、光ファイバーの配置と AAV 投与部位。右、抗 GFP(緑)および抗 cFos(白)抗体で染色した冠状脳切片。白線は光ファイバーの位置を示す。(B)光ファイバーを埋め込んだ DAT-ires-Cre マウスの脳波、筋電図、シータ・デルタ比の代表例。矢印は光刺激した時間。緑とピンクの棒は NREM 睡眠と REM 睡眠の時間を示す。(C)最初の光刺激後のレム睡眠潜時および持続時間。

で開始し、対照群よりはるかに早かった。ZT8 から ZT11 まで 25 分ごとに光照射すると、REM 睡眠量が大きく増加した。また、Drd2 ニューロンの抑制は、周辺の BLA ニューロンを興奮させることがわかった。さらに扁桃体において、Drd2 ニューロンの抑制がトリガーとなり興奮した BLA 周辺ニューロンは、REM 調節に関与する橋背側部の領域に多く投射していた。

BLA の Drd2 ニューロンを化学遺伝学にて持続的に抑制すると、REM 睡眠時間を増加させ、NREM 睡眠時間を減少させた。

これらの結果より、NREM 睡眠中にみられる BLA における DA の一過性の増加がトリガーとなり、Drd2 ニューロンを持続的に抑制することによって、扁桃体を賦活することが、REM 睡眠を開始させ、さらには維持することが明らかになった。

5. カタプレキシーは、覚醒時の BLA における一過性の DA 増加により引き起こされる

カタプレキシーはナルコレプシーの主要な症状のひとつであるが、覚醒中に REM 睡眠が侵入する病的な状態であり、REM 睡眠関連症状の一つだと考えられている。以前の研究では DRD2 作動薬や拮抗薬によってナルコレプシーが増加または減少することが示されている^{13, 14} (Burgess et al., 2010; Nishino et al., 1991)。

オレキシンニューロンを脱落させたナルコレプシーモデルマウス(orexin-ataxin3 マウス)において BLA における DA レベルを観察してみると、チョコレートの認知による情動刺激により誘発されるカタプレキシーのトリガーにも DA の上昇が重要な役割を果たしていることが明らかになった。ナルコレプシーマウスにおけるチョコレート摂取時の BLA の DA 濃度の増加は、対照群より有意に大きかった(図3)。しかし、NAc におけるチョコレート認知時の DA 増加の振幅は、ナルコレプシーマウスとコントロールマウスで同程度であった。

光遺伝学手法を用いて、DAT-ires-Cre マウスの BLA にて、ナルコレプシーマウスのチョコレート摂取時に見られるのと同様のパターンの DA レベルの一過性の上昇を誘導すると、カタプレキシーが誘発された。逆に BLA の VTA-DA 神経終末を光遺伝学的に抑制するとナルコレ

プシーマウスのカタプレキシーがほぼ完全に消失した。これらのことから、ナルコレプシーにおいては、通常オレキシンによって抑制されている BLA の DA 濃度の情動刺激による増加が REM 睡眠様の状態を引き起こしてしまうことによりカタプレキシーが誘発されていることが示唆された。

6. まとめ

扁桃体は、覚醒時における情動制御に重要な役割を果たしている。しかし、REM 睡眠中にも扁桃体が賦活していることが示されている(Corsi-Cabrera et al., 2016; Maquet et al., 1996)。今回、NREM 睡眠中の BLA における DA の一過性の増加が扁桃体を賦活し、NREM 睡眠を終了させ、REM 睡眠を開始させることが明らかになった(図 4)。また、BLA に投射する VTA-DA ニューロンは他の領域に投射するものとは別の集団だった。BLA における DA による Drd2 ニューロンの抑制は、長時間の過分極を伴っていた。この長時間持続する過分極は、Gi タンパク質が活性化したときの特徴であり、REM 睡眠の安定性を維持する機構に関与している可能性がある。実際に、BLA の Drd2 ニューロンの長時間の過分極を Designer receptors exclusively activated by designer drugs , DREADD にて模倣すると、REM 睡眠が増加した。

ナルコレプシー患者では、ポジティブな感情によってカタプレキシーが生じることが多く、カタプレキシーでは扁桃体活動が上昇することから(Meletti et al., 2015)、カタプレキシーにおける扁桃体と報酬系の役割が示唆されてきた。今回、情動がきっかけとなり BLA において DA を一過性に上昇することがカタプレキシーの誘発にも関与していることが明らかになった。以前、筆者らは、オレキシンによって興奮する DR の 5HT ニューロンの活性がカタプレキシーの抑制に関与することを示した(Hasegawa et al., 2017)。この経路が 5HT による DA 神経終末の抑制を介して BLA の DA 放出を抑制する可能性を示唆するものである。

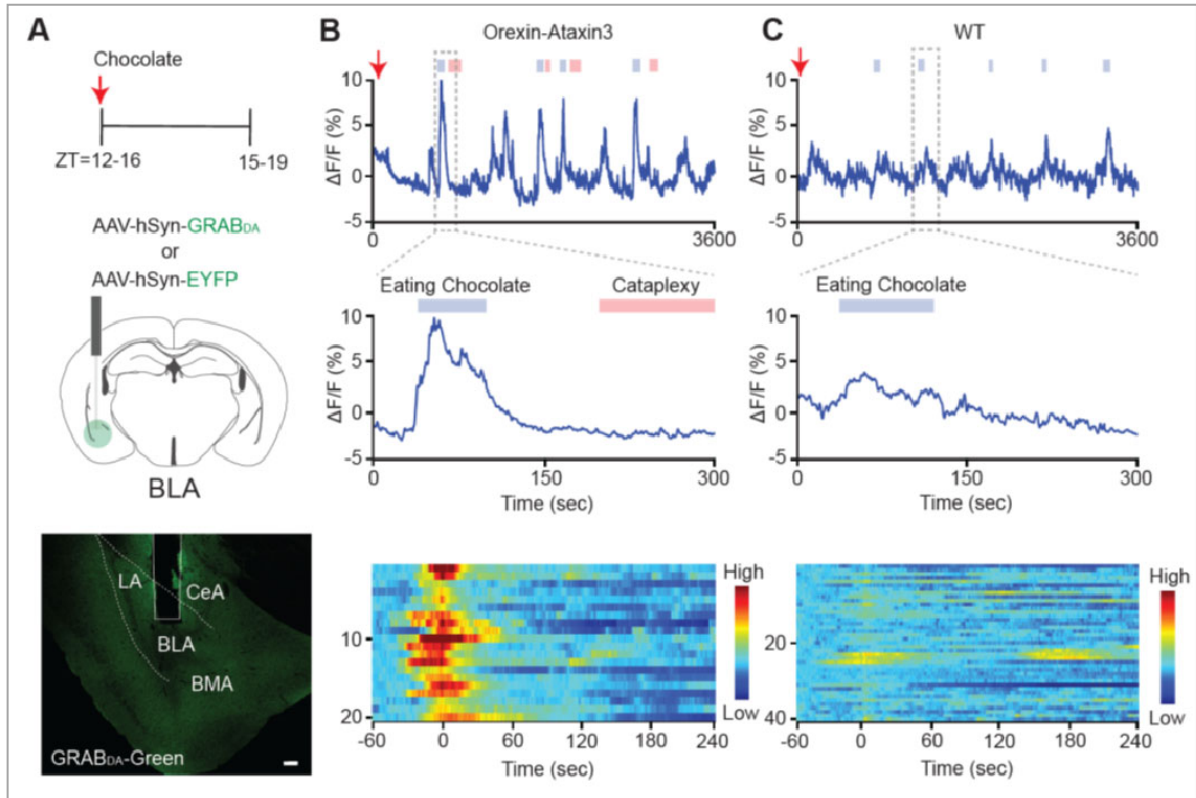


図 3. BLA における DA 濃度の一過性的上昇がナルコレプシーマウスのカタプレキシーを誘発する

(A)実験デザイン。上段、横棒はチョコレート摂取の時間。中段、光ファイバーの配置と AAV 投与。下、扁桃体の抗 GFP(緑)抗体で染色した冠状脳切片。白線は光ファイバーの位置を示す。ZT, zeitgeber time。スケールバー:100 μ m。(B) 上段はナルコレプシーモデルマウスにおける BLA の DA レベルの代表的なトレース。紫色の棒はチョコレート摂取の時間、ピンク色の棒はカタプレキシーの時間を示す。中段はチョコレート摂取時とカタプレキシーの拡大図。下、チョコレート摂取時およびカタプレキシーの BLA における DA レベルの時間変化を示すヒートマップ。(C) 上段および中段は、C57BL/6J マウスの BLA における DA レベルの代表的なトレース。紫色の棒グラフは、チョコレートを食べた時間を示す。下、C57BL/6J マウスのチョコレート摂食時の BLA における DA レベルの時間変化を示すヒートマップ。



図4 睡眠・覚醒サイクルに応じた扁桃体基底外側核と側坐核におけるドーパミン量の経時変化と状態遷移における役割
BLA(①)では、ノンレム睡眠からレム睡眠に移行する直前にドーパミンレベルが一過的に上昇する。側坐核(②)や前頭前野では、このような挙動は観察されない。またオレキシ欠損によるナルコレプシーでは、覚醒中に BLA のドーパミンが一過性に上昇し、通常の NREM から REM への移行と同様の変化を示すことが、カタプレキシーを引き起こす。野生型のマウスでは、情動刺激があっても、NAcでのドーパミンは一過性に上昇するが、BLA での上昇はオレキシンの機能により強く抑えられているためカタプレキシーは起こらない。

引用文献

- 1) Saper, C.B., Chou, T.C., and Scammell, T.E. (2001). The sleep switch: Hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* *24*, 726-731.
- 2) Scammell, T.E., Arrigoni, E., and Lipton, J.O. (2017). Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* *93*, 747-765.
- 3) Miller, J.D., Farber, J., Gatz, P., Roffwarg, H., and German, D.C. (1983). Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and waking in the rat. *Brain Res.* *273*, 133-141.
- 4) Monti, J.M., and Jantos, H. (2008). The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. *Prog. Brain Res.* *172*, 625-646.
- 5) Eban-Rothschild, A., Rothschild, G., Giardino, W.J., Jones, J.R., and De Lecea, L. (2016). VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors. *Nat. Neurosci.* *19*, 1356-1366.
- 6) Beier, K.T., Steinberg, E.E., DeLoach, K.E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X.J., Kremer, E.J., Malenka, R.C., and Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* *162*, 622-634.
- 7) Beier, K.T., Gao, X.J., Xie, S., DeLoach, K.E., Malenka, R.C., and Luo, L. (2019). Topological Organization of Ventral Tegmental Area Connectivity Revealed by Viral-Genetic Dissection of Input-Output Relations. *Cell Rep.* *26*, 159-167.e6.
- 8) Sun, F., Zeng, J., Kreitzer, A.C., Cui, G., and Li, Y. (2018). A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice In Brief The development of GPCR-activation-based-DA (GRAB DA) sensors enables measurements of dopamine dynamics in freely behaving animals. *Cell* *174*, 481-496.e19.
- 9) Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., et al. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* *477*, 171.
- 10) Dzirasa, K., Ribeiro, S., Costa, R., Santos, L.M., Lin, S.C., Grosmark, A., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., and Nicolelis, M.A.L. (2006). Dopaminergic control of sleep-wake states. *J. Neurosci.* *26*, 10577-10589.
- 11) Kumar Yadav, R., and Mallick, B.N. (2021). Dopaminergic- and cholinergic-inputs from substantia nigra and pedunculo-pontine tegmentum, respectively, converge in amygdala to modulate rapid eye movement sleep in rats. *Neuropharmacology* *193*, 108607.
- 12) Burgess, C.R., Tse, G., Gillis, L., and Peever, J.H. (2010). Dopaminergic regulation of sleep and cataplexy in a murine model of narcolepsy. *Sleep* *33*, 1295-1304.
- 13) Nishino, S., Arrigoni, J., Valtier, D., Miller, J., Guilleminault, C., Dement, W., and Mignot, E. (1991). Dopamine D2 mechanisms in canine narcolepsy. *J. Neurosci.* *11*, 2666-2671.
- 14) Corsi-Cabrera, M., Velasco, F., del Río-Portilla, Y., Armony, J.L., Trejo-Martínez, D., Guevara, M.A., and Velasco, A.L. (2016). Human amygdala activation during rapid eye movements of rapid eye movement sleep: an intracranial study. *J. Sleep Res.* *25*, 576-582.
- 15) Maquet, P., Peters, J.M., Aerts, J., Delfiore, G., Degueldre, C., Luxen, A., and Franck, G. (1996). Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* *383*, 163-166.
- 16) Meletti, S., Vaudano, A.E., Pizza, F., Ruggieri, A., Vandi, S., Teggi, A., Franceschini, C., Benuzzi, F., Nichelli, P.F., and Plazzi, G. (2015). The brain correlates of laugh and cataplexy in childhood narcolepsy. *J. Neurosci.* *35*, 11583-11594.
- 17) Hasegawa, E., Maejima, T., Yoshida, T., Maseck, O.A., Herlitze, S., Yoshioka, M., Sakurai, T., and Mieda, M. (2017). Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E3526-E3535.

Title: A role of dopaminergic signaling in the amygdala in regulation of REM sleep

Author: Takeshi Sakurai, M.D., Ph.D.

Address: 1-1-1 Ten-no dai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan.

Keywords: REM sleep, amygdala, dopamine