

筑波大学

博士（医学）学位论文

A discrete glycinergic neuronal population
in the ventromedial medulla that induces muscle
atonia during REM sleep and cataplexy

(延髄腹内側に局在する

グリシン作動性ニューロンはレム睡眠時および
情動脱力発作時の筋脱力を制御する)

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

内田 俊太郎

目次

略語一覧	4
1. 背景	8
1.1 レム睡眠時の筋脱力(REM-atonina)とレム睡眠行動障害(RBD)	8
1.2 情動脱力発作(カタプレキシー)	11
1.3 グリシン作動性ニューロン	14
1.4 延髄腹内側(VMM)	16
1.5 下背外側被蓋核(SLD)	17
2. 目的	20
3. 方法	21
4. 結果	30
4.1 グリシン作動性ニューロン特異的に <i>iCre</i> を発現するマウスの作製	30
4.2 体性運動ニューロンに投射する VMM のグリシン作動性ニューロン群	31
4.3 Gly ^{VMM} →AH および Gly ^{VMM} の上流	33
4.4 Gly ^{VMM} および Glu ^{SLD} →VMM の活動阻害は REM-atonina を抑制した	35
4.5 Gly ^{VMM} および Glu ^{SLD} →VMM の活動阻害はカタプレキシー様行動を抑制した	37
4.6 Gly ^{VMM} の活動阻害は覚醒時間を延長した	39
5. 考察	41
5.1 延髄腹内側には体性運動ニューロンに限局して投射するグリシン作動性ニューロン群が存在する	41
5.2 Glu ^{SLD} →Gly ^{VMM} →体性運動ニューロンの回路が REM-atonina と情動脱力発作を制御する	42
5.3 Gly ^{VMM} が睡眠覚醒に果たす役割	44
5.4 α シヌクレイン関連疾患であるレム睡眠行動障害との関連	45
5.5 RBD とカタプレキシーの関係	47
5.6 オレキシンの下流でカタプレキシーの発動を抑える領域	48
5.7 Glu ^{SLD} →Gly ^{VMM} →Mn を制御する領域	50
6. 結論	53
7. 図表	54
8. 謝辞	78
9. 出典	80
10. 引用文献	81

略語一覽

3N	oculomotor nucleus
3PC	oculomotor nucleus, parvicellular part
4N	trochlear nucleus
6N	abducens nucleus
7N	facial nucleus
11N	accessory nerve nucleus
12N	hypoglossal nucleus
AAV	adeno associated virus
aCSF	artificial cerebrospinal fluid
AH	anterior horn
APT	anterior pretectal nucleus
CeA	central amygdala nucleus
ChAT	choline acetyltransferase
CL	centrolateral thalamic nucleus
CLEs	cataplexy-like episodes
CnF	cuneiform nucleus
cTRIO	cell type specific tracing the relationship between input and output
DAB	3,3'-diaminobenidine
DLL	dorsal nucleus of the lateral lemniscus
DMPAG	dorsomedial periaqueductal gray
DPGi	dorsal paragigantocellular nucleus
DpMe	deep mesencephalic nucleus
DPO	dorsal periolivary region
DR	dorsal raphe nucleus
ECIC	extended cortex of inferior colliculus

ECu	external cuneate nucleus
EEG	electroencephalogram
EMG	electromyogram
GABA	gamma-aminobutyric acid
Gi	gigantocellular reticular nucleus
GiA	gigantocellular reticular nucleus, alpha part
GiV	gigantocellular reticular nucleus, ventral part
GlyT2	glycine transporter 2
HLA	human leukocyte antigen
ILL	intermediate nucleus of the lateral lemniscus
InCo	intercollicular nucleus
IRT	intermediate reticular nucleus
Lat	lateral cerebellar nucleus
LC	locus coeruleus
LDT	laterodorsal tegmental nucleus
LH	lateral hypothalamus
LPGi	lateral paragigantocellular nucleus
LPO	lateral preoptic nucleus
LSO	lateral superior olive
MDL	mediodorsal thalamic nucleus
MdV	medullary reticular nucleus, ventral part
Med	medial cerebellar nucleus
mlf	medial longitudinal fasciculus
Mo 5N	motor trigeminal nucleus
MPO	medial preoptic nucleus

MS	medial septum
NREM	non-rapid eye movement
Pa4	paratrochlear nucleus
PAG	periaqueductal gray
PB	parabrachial nucleus
PBS	phosphate buffered saline
PCRT	parvicellular reticular nucleus
PFA	paraformaldehyde
PMn	paramedial reticular nucleus
PnC	pontine reticular nucleus, caudal part
PnO	pontine reticular nucleus, oral part
Pr	prepositus nucleus
Pr5	principal sensory trigeminal nucleus
py	pyramidal tract
RBD	REM sleep behavior disorder
REM	rapid eye movement
RG	rabies glycoprotein
RMg	raphe magnus nucleus
RN	red nucleus
ROb	raphe obscurus nucleus
RPa	raphe pallidus nucleus
RPO	rostral periolivary region
RtTg	reticulotegmental nucleus of the pons
SC	superior colliculus
SLD	sublaterodorsal tegmental nucleus

SP5L	spinal trigeminal nucleus
SPO	superior paraolivary nucleus
Su5	supratrigeminal nucleus
SubCV	subcoeruleus nucleus
TeNTLC	tetanus toxin light chain
TH	tyrosine hydroxylase
TPH2	tryptophan hydroxylase 2
VC	ventral cochlear nucleus
Ve	vestibular nucleus
vGAT	vesicular GABA transporter
vGlut2	vesicular glutamate transporter 2
vIPAG	ventrolateral periaqueductal gray
VMM	ventromedial medulla
ZI	zona incerta
ZT	zeitgeber time

1 背景

1.1 レム睡眠時の筋脱力(REM-atonía)とレム睡眠行動障害(RBD)

レム睡眠は睡眠中に急速かつ不規則に眼球運動を伴い、規則的に脳が強く賦活している状態として、1953年に Aserinsky と Kleitman によって初めて報告された¹。その後、レム睡眠時には大脳皮質ならびに辺縁系の賦活をともなうにもかかわらず、全身の抗重力筋が脱力することが報告され²、ネコを用いた電気生理学実験では脊髄前角ニューロンの静止膜電位がレム睡眠中に過分極することが示された^{3,4}。この過分極はグリシン受容体拮抗薬であるストリキニーネの投与によって解消されることから、脳幹から脊髄で抑制性神経伝達物質として作用するグリシンがレム睡眠中の筋脱力を誘導すると考えられていた⁵⁻⁸。

最近のラットを用いた RNA 干渉による実験では、延髄腹内側(Ventromedial medulla, VMM)に位置する巨大細胞核腹側部において、GABA とグリシンの小胞内への取り込みに関わる小胞輸送トランスポーター (vGAT) の mRNA を抑制した結果、レム睡眠中の筋脱力が消失し、レム睡眠中にレム睡眠行動障害 (rem sleep behavior disorder, RBD) 様の運動が見られたことが報告されている⁹。さらに同じグループの報告では、橋被蓋に位置する下背外側被蓋核(SLD)の小胞性グルタミン酸トランスポーター(*Vglut2*)の mRNA 発現を抑制した結果、レム睡眠中の筋脱力が消失したことが示されている¹⁰。しかし、レム睡眠中の筋脱力

(REM-atonia) を制御する固有のグリシン作動性ニューロンが局在するのか、あるいは SLD と VMM が直接シナプス接合するのかといった、神経回路レベルで REM-atonia を制御するメカニズムは明らかになっていない。

RBD は、REM-atonia を担う神経回路の破綻によって生じると考えられている。RBD の患者はレム睡眠中に寝言や下肢が軽く動く程度のものから、粗雑な四肢・体幹の運動に至るまで様々な行動を取る。これらの異常行動はレム睡眠中の夢の内容を反映していると考えられており¹¹、患者本人やベッドパートナーの怪我の原因になりうる^{12,13}。また、RBD はパーキンソン病や Lewy 小体型認知症などの変性疾患の中核症状に数年先行して発症することがある。こうした患者の死後脳では、リン酸化された α -シヌクレインが脳幹に沈着することが報告されており、RBD の発症機序として α -シヌクレインの沈着が REM-atonia を制御する神経回路を障害する可能性が示唆されている¹⁴。しかし、RBD にはこうした基礎疾患のない例も存在し、詳細な病態は分かっていない。

また、脳幹以外の領域についてもその関連が指摘されている。RBD 患者では線条体のドーパミン受容体 2 型の発現量が減少しているという報告や¹⁵、RBD を併発する変性疾患の患者では、RBD を併発しない変性疾患の患者より嗅覚脱出症状が顕著だとする報告もある¹⁶。しかしながら、これらの報告は変性疾患によって脳の広範な領域が障害された結果とも考えられ、REM-atonia 制御の神経

回路にかかわるかは明らかになっていない。

臨床的に明確な背景疾患を持たない RBD は特発性 RBD と呼称されるのに対して、脳血管障害や脳腫瘍、多発性硬化症などの疾患でも RBD の併発がみられ、二次性 RBD と呼称される。また、後述するナルコレプシー患者でも RBD が見られることがある¹⁷。さらに、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)など薬剤の服用によっても二次性 RBD が誘発される¹⁸。

RBD の治療薬の第一選択としてはクロナゼパムが用いられるが、翌日への眠気の持越し作用やふらつきなどの副作用が高齢者では問題になることがある¹⁹。第二選択としてはメラトニン²⁰ やアセチルコリンエステラーゼ阻害薬²¹ などが用いられることもあるが、これらの薬剤が REM-atonia を制御する神経回路にどのように作用するのかは明らかになっていない。RBD の病態解明にも、レム睡眠時の筋脱力を制御する回路を解明することは重要な知見となる。

1.2 情動脱力発作（カタプレキシー）

レム睡眠に関連する病的な症状として RBD の他に、ナルコレプシーの中核症状のひとつである情動脱力発作（カタプレキシー）が挙げられる。情動脱力発作は笑いや喜び、驚きなど主にポジティブな情動によって抗重力筋の筋緊張が低下する発作であり、行動が中断されるほか、ときに怪我の原因ともなる。

ナルコレプシーは通常 10 代で発症し、通常では眠気をきたさないはずの状況で覚醒を維持できない過眠症状とカタプレキシーを中核症状とする。カタプレキシーをともなうナルコレプシーはナルコレプシー1型と呼称され、視床下部外側野に局在する神経ペプチド、オレキシンAとオレキシンBを産生する神経（オレキシン作動性ニューロン）の脱落が病態の原因とされる²²⁻²⁴。ナルコレプシー1型の患者ではオレキシンAの脳脊髄液の濃度が著明に低下していること²⁵、患者の死後脳においてオレキシン細胞が脱落していることが明らかになっている²⁶。さらにナルコレプシー患者では HLA-DQB1*0602 遺伝子座との強い関連が指摘されているほか²⁷、ゲノムワイド関連解析では T 細胞受容体 α 遺伝子座にある一塩基多型との関連も指摘されており²⁸、HLA 分子と T 細胞受容体を介してエフェクター T 細胞が賦活化され、自己反応性 T 細胞が生じる可能性が指摘されている²⁹。このため自己免疫機序によってオレキシン作動性ニューロンが障害され、機能不全に陥ると考えられている。近年ではインフルエンザ感染との因果

関係も指摘されている³⁰。

オレキシンの補充が根本治療と考えられるが、血液脳関門を通過する低分子のオレキシン受容体作動薬はいまだ開発段階であり、現在の治療薬は日中の過剰な眠気に対してはモダフィニルやメチルフェニデートなどの中枢刺激薬、カタプレキシーに対しては三環系抗うつ薬や SSRI による対症療法が中心である。カタプレキシーは怪我の原因になるだけでなく、患者自らカタプレキシーの発動を回避するために感情表現を抑えようとするすることで、日常生活の喜怒哀楽の表現が乏しくなり、生活の質が棄損される³¹。カタプレキシーを発動する神経回路を理解することは、病態の理解だけではなく、患者の生活の質に直結する新規の治療開発にも大きく寄与するだろう。

オレキシンペプチド、あるいは二つのオレキシン受容体を欠損したマウスではヒトのナルコレプシー1型の症状に似た表現型を呈する³²⁻³⁴。暗期にカタプレキシー様の突然の運動停止が見られ、脳波筋電図上では通常では起こりえない覚醒期からレム睡眠への移行が確認され、カタプレキシーは覚醒からレム睡眠様状態への病的な移行と捉えられている。オレキシンノックアウトマウスの扁桃体を破壊するとナルコレプシー様行動が激減すること³⁵、および薬理遺伝学的に扁桃体を活性化するとナルコレプシー様行動が増加することから³⁶、扁桃体がカタプレキシーの発動に関与すると考えられている。オレキシン作動性

ニューロンの下流では、中脳に位置する背側縫線核(dorsal raphe nucleus, DR)が扁桃体の興奮を抑制することでカタプレキシー様行動の発動を制御すると考えられているが^{37,38}、扁桃体から運動ニューロンに至るまでカタプレキシー様行動を発動する詳細な回路は解明されておらず³⁵、これがREM-atonia と共通の回路を介するものであるかも明らかになっていない。

前述したようにナルコレプシー患者の中には二次性のRBDを発症する症例も報告されており、REM-atonia とカタプレキシーをそれぞれ回路レベルで理解することが病態解明のためにも望まれる。

1.3 グリシン作動性ニューロン

グリシンは小脳および脳幹から脊髄にかけて抑制性神経伝達物質として作用することが知られ、多様な生理学的作用を持つ。細胞外グリシンを細胞内へと輸送するグリシントランスポーターには GLYT1 と GLYT2 の二種類が存在し、GLYT1 は主に脳内のグリア細胞に発現し、シナプス間隙のグリシンを排除するのに対して、GLYT2 はグリシン作動性ニューロンに発現し、細胞外から細胞内への取り込みに重要である^{39,40}。GLYT2 プロモーターの下流に組み換え酵素 Cre や蛍光タンパクなどを発現させたマウスが作製され^{41,42}、近年では GLYT2 陽性ニューロンに光遺伝学的操作や薬理遺伝学的操作を行うことでグリシン作動性ニューロンの機能を探索する実験が行われている^{43,44}。

グリシンは抑制性伝達物質であることから、グリシン作動性ニューロンの中には、軸索が限局し、近傍の領域を抑制する介在ニューロンとして機能するものが多く存在する。代表的なものは腱反射などで脊髄前角の α 運動ニューロンを抑制する renshaw cell であり、グリシンを伝達物質として用いる⁴⁵。また、後角のグリシン作動性ニューロンは2次侵害受容ニューロンを抑制し、温痛覚を減弱する機能を持つ介在ニューロンであることが示されている⁴⁶。

延髄では、VMM よりさらに正中の延髄縫線核のグリシン作動性ニューロン群は、介在ニューロンとして褐色細胞腫を支配する交感神経節前ニューロンを

抑制することが示唆されている⁴⁷。一方でグリシン作動性ニューロンには長い軸索を伸ばし、離れた領域を抑制する投射ニューロンも数多く存在する。

VMMのグリシン作動性ニューロンは脊髄の運動ニューロンへ下向性の軸索を伸ばし、運動の停止に関わるとされる⁴⁴。VMMの外側に位置するグリシン作動性ニューロン群は腕傍核を含む脳幹の広範な領域に出力し、呼吸リズムを形成するとされる⁴⁸。すなわち延髄のグリシン作動性ニューロンは介在ニューロンと投射ニューロンが存在し、運動制御のみならず、自律神経の制御など多様な生理機能を持ち、機能ごとに解剖学的に異なる領域に位置し、異なる入力源や出力先を持つことが推測される。

1.4 延髄腹内側(VMM)

VMM を構成する神経核は延髄巨大細胞網様核腹側部(GiA または GiV; gigantocellular nucleus, alpha part or ventral part)と呼称される領域であり、橋から延髄にかけて続く網様体の一部である。網様体には脊髄に投射するニューロンが存在し、電気刺激や破壊実験によって行動の制御を担うことが示されてきた。最近では青斑核や縫線核に投射し、睡眠を誘導するニューロン群の存在も指摘されている^{49,50}。VMM にはグリシン作動性ニューロンのみならず、GABA 作動性ニューロン、GABA/グリシン共作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロンが混在する^{44,51-53}。このうち光遺伝学的手法によって VMM を含む延髄巨大細胞網様核のグリシン作動性ニューロンを光遺伝学的手法によって活性化すると歩行の休止や筋弛緩用の行動が見られることも示されている⁴⁴。前述した RNA 干渉によって VMM の vGAT の mRNA 発現を抑制すると REM-atonia が消失する報告⁹と合わせると、VMM が前運動ニューロンとして運動ニューロンへ抑制性シグナルを送ることで筋脱力を担う領域なのではないかと考えられる。

1.5 下背外側被蓋核 (SLD)

SLD は背外側被蓋核(laterodorsal tegmental nucleus, LDT)の腹側に隣接する神経核であり、ヒトでは青斑下核と呼称される領域である。ネコの離断実験によって橋被蓋はもともと REM-atonia を担う領域として注目されており⁵⁴、ネコやラット、マウスを用いた電気生理学実験によって LDT と SLD はレム睡眠中に賦活することが知られている^{2,55,56}。アセチルコリン受容体作動薬であるカルバコールをネコの橋背側に投与するとレム睡眠が誘導されることが示されている⁵⁷。ラットの実験でもカルバコールの投与によって SLD に位置するニューロンが興奮すること⁵⁸、REM 睡眠を断眠した後に SLD 内のグルタミン酸作動性ニューロンでは神経活性化のマーカーである Fos タンパク陽性細胞が増加することが示されている⁵⁹。

前述した RNA 干渉による実験では SLD の興奮性ニューロンが REM-atonia を制御することが示唆されている¹⁰。さらに Cre-loxP システムによるノックダウンを用いて、*vGlut2-flox* ラットあるいは *vGAT-flox* ラットの SLD に、Cre をコードするアデノ随伴ウイルスベクターを投与した実験では *vGlut2-flox* ラットを用いた実験でのみ REM-atonia が消失したことも報告されている⁶⁰。このため、SLD に位置する興奮性ニューロンが脊髄あるいは延髄の抑制性ニュー

ロンを介して運動ニューロンを抑制し、REM-atonia を誘導すると考えられてきた。

また、SLD がカタプレキシー様行動を誘導するとする報告がある⁶¹。薬理遺伝学的に SLD に含まれるすべてのニューロンを操作した実験では、オレキシン欠損マウスにおいて SLD を抑制すると REM-atonia が破綻し、カタプレキシー様行動の回数が減少したのに対して、SLD を興奮させるとカタプレキシー様行動の回数が増加することが報告されている⁶¹。さらに、野生型マウスにおいても SLD を興奮させるとカタプレキシー様行動が生じることが示されている。これらの実験ではアデノ随伴ウイルスベクターを感染させることで SLD を操作しているものの、SLD は非常に小さい領域であるため、SLD 周囲の LDT や橋灰白質など橋被蓋の多くの領域にウイルスが感染しており、SLD のみを限局して操作しているとはいえない。

このように SLD はレム睡眠の制御に大きく寄与することが示されてきた領域であるにもかかわらず、特にマウスにおいてその解剖学的な位置が厳密に定義されていなかった。また、レム睡眠の制御を担う SLD の興奮性ニューロンが同じくレム睡眠中に発火する LDT のアセチルコリン作動性ニューロンから独立した神経核であるのかも明らかにされてこなかった。薬理遺伝学的操作によって REM-atonia やカタプレキシー様行動を検討した実験は局所的な操作に

とどまり、回路レベルでVMMや体性運動ニューロンとどのような神経接続をし、REM-atonia およびカタプレキシーを制御するのかといった理解も曖昧であった。

2 目的

本研究の目的はマウスを用いて、REM-atonia を制御する神経回路を探索し、この回路がナルコレプシーモデルマウスで見られるカタプレキシー様行動の筋脱力を制御する回路と共通であるのか明らかにすることである。先行研究で指摘されてきた VMM や SLD に注目し、その解剖学的な関係を明らかにし、これらの活動阻害が REM-atonia とカタプレキシー様行動に影響するか検討する。

3 方法

3.1 実験動物

12 週齢から 20 週齢の *orexin-ataxin 3*³³、*Ai9*⁶²、*vGlut2-iresCre*⁶³ のヘテロ接合型の C57BL/6J バックグラウンドのオスマウスを用いた。*GlyT2-iCre* マウスは C57BL/6N の胚性幹細胞へ外来遺伝子ベクターを導入し、相同組み換えが確認された細胞を ICR マウスの 8 細胞期胚へ移植することによって作成した。目的のベクターは GlyT2 遺伝子のエクソン 2 に *iCre* とネオマイシン耐性遺伝子を挿入した。キメラマウスは C57BL/6J females (Jackson 社) と交配し、ネオマイシン耐性遺伝子は FLP66 マウス⁶⁴ との交配によって除去した。野生型 C57BL/6J マウスとの戻し交配を最低 8 回経たヘテロ接合型の雄マウスを実験に用いた。実験マウスは個別ケージで飼育、特定の病原体のない条件下および周囲温度と湿度が管理された部屋で、12 時間：12 時間の明暗スケジュールで管理した。すべての実験は筑波大学の動物実験委員会の申請によって承認されており、NIH のガイドラインを満たしている。

3.2 アデノ随伴ウイルスベクター (AAV)

AAV はヘルパーフリーシステムによって作成した。前日に HEK293T 細胞の継代を行い subconfluent に達した 10cm プレートを 2 枚用意した。20 μ g 相当の

pHelper プラスミド (Stratagene)、10 µg 相当の AAVcapsid プラスミド、11 µg 相当の pAAV プラスミドを混合した液を準備した。次に 1mg/ml に調整したポリエチレンイミン(コスモバイオ)150 µl と Opti-MEM 1.9ml を混合させた溶液を 3 種のプラスミド液に加え常温で 15 分放置した。この溶液を 1dish あたり 1ml ゆっくりと滴下した。3 日後に細胞を回収し、aCSF 液 400 µl で懸濁した。-80°C で 20 分以上凍結させ、37°C で 2 分間融解し、1 分間ボルテックスする操作を 4 回繰り返した。その後、Benzonase (Millipore) を 1 µl 加え、45°C の恒温槽で 30 分間反応させ遠心した上清をウイルス液として用いた。ウイルスの力価を Table 1 に示す。

pAAV-EF1a-FLEX(loxP)-TVA-mCherry および *pAAV-EF1a-FLEX(loxP)-RG* (rabies glycoprotein)⁶⁵ は内田直滋先生(ハーバード大学)から、*pAAV-CAG-FLEX(Frt)-TVA-mCherry* と *pAAV-CAG-FLEX(Frt)-RG*⁶⁶ は宮道一成先生(理研)からの供与をうけた。*pAAV-hSyn-FLEX(loxP)-TeNTLC-P2A-EYFP*⁶⁷ は櫻井勝康先生(筑波大学)より供与された。*pAAV-CAG-FLEX(Frt)-TeNTLC-P2A-EYFP* と *pAAV-CAG-FLEX(Frt)-EYFP* は *pAAV-CAG-FLEX(Frt)-TVA-mCherry* の TVA-mCherry 部位を TeNTLC-EYFP あるいは EYFP で置き換えることで作成した。

CAV2-FLEX(loxP)-Flp は Biocampus Montpellier 社より購入した。△G 欠

損狂犬病ウイルスベクター (SAD Δ G) は pcDNA-SADB19L(Addgene, #32632), pcDNA-SADB19G (Addgene, #32630), pcDNA-SADB19N, pcDNA-SADB19P(Addgene, #32631), and pSADdeltaG-GFP-F2 (Addgene, #32635) を B7GG 細胞(名古屋大学の小坂田文隆先生より供与をうけた)に感染させ増殖させた後、EnvA による偽型化を行った⁶⁸。

3.4 手術

全ての手術は、イソフルラン(1-2%)による麻酔下のもと行った。脳部位へウイルスベクターの投与をする際は脳定位固定装置 (David Kopf Instruments)によってマウスの頭部を固定した。ウイルス液を満たしたガラスシリンジを空気圧インジェクター(Picospritzer III, Parker 社)に接続し、目的の脳部位にガラスシリンジを刺入し、2分以上かけて 120nl 投与した。投与後、ウイルス液の浸透を待つため、5分ガラスシリンジを置いたままの状態にした。目的の脳部位にガラスシリンジを刺入する際、頭蓋骨は電動ドリルによって取り除き、頭蓋表面の硬膜と髄膜は 27G 針を用いて剥離した。各脳部位の座標はブレグマを基準点とした。VMM: (ブレグマから尾測へ 6.2 mm、左右 \pm 0.4 mm、脳表面から腹側 5.3 mm) SLD: (ブレグマから尾側へ 5.0 mm、左右 \pm 0.75 mm、脳表面から腹側 3.5 mm)。

cTRIO の実験で行った腰髄前角への投与では、麻酔下にある *GlyT2-iCre* マウスの Th12-L5 に相当する背側の皮膚を切開し、脊髓固定装置(Pro Device Instruments)によって固定した状態で行った。Th13 と L1 間の傍脊柱筋や結合組織を顕微鏡下で丁寧に剥離し、椎間孔を露出した。27 ゲージの針を用いて髄膜を剥離し、*CAV2-FLEX(loxP)-FLP* で満たしたガラスシリンジを正中線から 700 μm 左側へ、脊髓表面から 900 μm 腹側へ挿入し、5 分以上かけて 120 nl 投与した。その後、麻酔下のまま脳固定装置へ移動し、*AAV10-CAG-FLEX(Frt)-TVA-mCherry* と *AAV10-CAG-FLEX(Frt)-RG* を 1:2 の割合で混合したウイルス液を左側の VMM に 120 nl 投与した。2 週間後、左側の VMM に 120 nl の *SAD Δ G-GFP(EnvA)* を投与し、ホームケージで 1 週間飼育した後、還流固定(p.26)をおこなった。

脳筋電図電極は頭蓋骨上に取り付けた。脳波用の 2 つの電極はブレグマから右側に 0.60 mm、後方にそれぞれ 0.15 mm と 2.65 mm の位置に刺入した。筋電電極はステンレスワイヤー (AS633, Cooner Wire) を用い、マウスの両側の項筋に挿入し、デンタルセメント (3M, 56818) によって固定した。術後、マウスは単独で飼育した。

3.5 睡眠覚醒状態の評価

マウスは睡眠記録チャンバーで一週間の馴らし期間の後に2日間連続の脳波筋電波形を記録した。各個体のデータの2日間の平均を生データとして使用した。脳波筋電電極は増幅器(AB-611J, 日本光電)を用いて波形をフィルタリングし(脳波, 0.5–64 Hz; 筋電, 16–64 Hz)、専用のソフトウェア (Vital recorder, キッセイコムテック)で記録した。睡眠覚醒の判定は10秒を1エポックとし、覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠、カタプレキシー様エピソードのいずれかに分類した。先行研究に則り、覚醒から直接レム睡眠に移行したエポックをカタプレキシー様エピソードと定義した⁶⁹。なお本研究ではレム睡眠中に筋活動が生じる状態を観察しているが、レム睡眠の脳波波形はシータ波が優位になることから覚醒時の脳波から容易に区別することができる。本研究ではノンレム睡眠に続発し、シータ波がデルタ波より優位である状態をレム睡眠と判定した。筋電図の電位は4ミリ秒ごとに記録し、10秒エポックで2500ある生データを整流平滑化した筋電の値をエポックごとに算出した。その後、各ステージでのエポックの筋電の値の平均値を算出した。マウスによって筋電電極の置く位置などが異なることから、レム睡眠中の筋電電位の積分値は同じマウスのノンレム睡眠時の値で除した比を用いた。

3.6 免疫組織化学染色

イソフルラン麻酔下にあるマウスに還流固定法を行った。翼状針を左心室に刺入し、すぐに右房を切開した後、10%Sucrose/PBS 溶液 10~20ml を 1~2 分で流し脱血した。その後固定液 100ml を 10 分以上還流し、脳と脊髄を取り出し、固定液に一晩 4°C で浸透させた。翌日、固定した脳と脊髄を 30%スクロース/PBS 溶液に 4°C で一晩浸透させたあと、OCT 液 (Sakura) に包埋し、-80°C で凍結した。クライオスタット (Leica) を用いて冠状断の切片を 80 μ m で切り出し、PBS を浸した 12 ウェルプレートに集め、PBS で 3 回洗浄したあと 1%Triton/PBS 溶液に常温で 3 時間浸した。その後、ブロッキング溶液に 1 時間浸したあと、一次抗体液を 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体液を除いて切片を PBS で 3 度洗浄し、二次抗体液を 4°C で一晩反応させた。使用した一次抗体液と二次抗体液を Table 2 に示す。組織像は共焦点顕微 (Zeiss LSM 780 あるいは Leica SP8) を用いて撮影した。

3.7 In situ ハイブリダイゼーション

GlyT2, *ChAT*, *Vglut2* の mRNA の発現を見るため、RNA scope (コスモバイオ) を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。免疫組織化学染色同様に、固定と凍結保護を行い、OCT 液 (Sakura) で包埋し -80°C で凍結させ

た。20~30 μm で切り出した脳あるいは脊髄の切片を用い、マニュアルに従い、染色を行った。プローブはそれぞれ GlyT2 probe (SLC6A5-C1, 409741-C1)、ChAT probe (ChAT-C1, 408731-C1)、Vglut2 probe (SLC17A6-C2, 540961-C2)を用いた。組織像は共焦点顕微 (Zeiss LSM 780)を用いて撮影した。

3.8 全脳の入力細胞のカウント

狂犬病ウイルスを用いた逆行性トレーシングでは全脳の切片のうち3枚おきに採取した切片を観察し、GFP陽性を入力細胞を数えた。各領域はマウスブレインアトラス⁷⁰を用いて判定した。全入力細胞数は各個体によって異なることから、各領域の入力細胞数を全入力細胞数で除したパーセンテージを算出した。先行研究より、SLDはLDTの腹側に位置する領域と定義した^{71,72}。

3.9 軸索密度の数値化

mCherryの軸索が見られた脳領域の軸索強度を数値化するため、imageJソフトウェアを用いた。各領域の画像を200 μm \times 200 μm の大きさにトリミングし、8ビット画像に変換し、閾値を設定することで二値化処理を行い、閾値より高い値のピクセルの割合を画像ごとに求めた。閾値は三叉神経運動核(Mo

5N)の軸索の形を描画する値をマウスごとに手動で定め、その値を同じマウスで統一して用いた。各脳領域でのピクセルの割合を、全脳の領域の合計値で除した百分率を算出した。

3.10 オープンフィールドテスト

予備実験でマウスの新規環境における自発的な活動性を測定するオープンフィールドテストを行った。プラスチック製の白色の箱(40cm×40cm×30cm)にマウスを入れ、10分間ビデオでマウスの行動を測定した。箱の内部は照度が一定になるようにした(20~30 lux)。解析は Smart Video Tracking Software (Panlab, Harvard Apparatus)を用いて行い、歩行距離を測定した。また、Figure 11.A に示すように箱内を9分割したブロック内の滞在時間も解析した。中央の1ブロックを中央区間、四隅の4ブロックを四隅区間と定義した。

3.11 統計処理

全ての結果は平均値±標準誤差で表記した。二群間での単一の値の有意差検定は、まずF検定を行い等分散の検定を行い、 $p < 0.05$ の場合、標本分散が等しくないと判断した。標本分散が等しい場合は対応のない Student の t 検定を、等しくない場合は Welch の t 検定を用いた。二群間での多重比較は Two-

way ANOVA で分析後、個々の値を Bonferroni の事後比較を用いた。差は $p < 0.05$ の場合、有意とみなした。すべての統計分析は Graph Pad Prism 8.0 を用いた。

4 結果

4.1 グリシン作動性ニューロン特異的に Cre を発現するマウスの作製

脊髄に投射する VMM のグリシン作動性および GABA 作動性ニューロンは運動制御に関わることが知られている^{44,53,73-75}。近年の研究では VMM のグリシンおよび GABA 作動性ニューロンは REM-atonia を制御することが示されているが⁹、VMM の中で REM-atonia を制御する固有のニューロン群が存在するのかは明らかになっていない。

グリシン作動性ニューロン特異的に操作するため、グリシン作動性ニューロン特異的なマーカー *GlyT2* 特異的に *iCre* を発現するマウスを作成した (Fig. 1A)。*iCre* が発現する箇所が *GlyT2* 特異的であるかを確かめるため、*Cre* 依存的に赤色蛍光タンパク TdTomato を発現する *Ai9* マウスと交配して得た *GlyT2-iCre;Ai9* マウスを用いて、脳幹から脊髄にかけて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った (Fig. 1B)。

橋、延髄、脊髄にかけて *GlyT2* 陽性細胞の中で TdTomato を共発現する細胞の割合、ならびに TdTomato 陽性細胞の中で *GlyT2* を共発現する細胞の割合を算出した結果を Table 3 に示す。代表的な組織像を Fig. 1B に示す。*GlyT2* 陽性細胞のほぼすべてで TdTomato が発現し、TdTomato が発現する細胞の少なくとも 91%以上が *GlyT2* 陽性であることを確認した。このマウスはグリシ

ン作動性ニューロン特異的に *iCre* を発現すると判定した。

4.2 体性運動ニューロンに投射する VMM のグリシン作動性ニューロン群

次に VMM のグリシン作動性ニューロン(Gly^{VMM})の出力先を確認するため、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク mCherry を発現する *AAV8-hSyn-FLEX(loxP)-hM3Dq-mCherry* を *GlyT2-iCre* マウスの片側 VMM に投与した (Fig. 2A)。2 週間後にマウスを還流固定し、全脳から脊髄にかけて mCherry 陽性の軸索を探索した。ウイルスが感染し、mCherry を発現する Gly^{VMM} の組織像を Fig. 2B に示す。mCherry 陽性の軸索を脳内・脊髄内で探索した結果、三叉神経運動核 (motor trigeminal nucleus; Mo 5N)、顔面神経核 (facial nucleus; 7N)、副神経核 (accessory nerve nucleus; 11N)、舌下神経核 (hypoglossal nerve nucleus; 12N)、脊髄前角 (anterior horn; AH)などの体性運動ニューロンに密な軸索の投射を認めた(Fig. 2C)。運動ニューロン以外にも赤核 (red nucleus; RN)、背側縫線核 (dorsal raphe; DR), 青斑核 (locus coeruleus; LC)を含む脳内の広範な範囲に mCherry 陽性の軸索を認めた(Table 4, Fig. 2C)。興味深いことに動眼神経核 (oculomotor nerve nucleus; 3N)、滑車神経 (the trochlear nerve nucleus; 4N)、外転神経核 (abducent nerve nucleus; 6N) には軸索を認めなかった。Gly^{VMM} は脳内から脊髄にかけての体性運動ニューロンを含む脳内の

様々な領域に投射することが分かった。

次に、体性運動ニューロンに投射する Gly^{VMM} のみをラベルし、その出力先と入力源を明らかにする実験を行った。cTRIO 法を用いて⁶⁶ 脊髄前角に投射する VMM のグリシン作動性ニューロン(Gly^{VMM→AH})に TVA-mCherry と RG を発現させた後に狂犬病ウイルスを感染させ、この上流を探索した。実験の操作を Fig. 3A に示す。Cre 依存的に組み換え酵素 flippase (Flp)を発現するイヌ科アデノウイルス *CAV2-FLEX (loxP)-Flp* を *GlyT2-iCre* マウスの L1 レベルの腰髄前角に投与した。イヌ科アデノウイルスは軸索末端から細胞体へと逆行性に感染するため、脊髄前角に投射するグリシン作動性ニューロン Gly^{VMM→AH} のみ *Flp* が発現することになる。偽型化した狂犬病ウイルス(*SADΔG(EnvA)*)が細胞に一次感染するのに必要な受容体 TVA を *Flp* 依存的に発現するウイルス(*AAV10-CAG-FLEX(Frt)-TVA-mCherry*)と、狂犬病ウイルスが上流の細胞へ伝播するのに必要である糖タンパク RG を *Flp* 依存的に発現するウイルス(*AAV10-CAG-FLEX(Frt)-RG*)の混合液を左側の VMM に投与した。2 週間に再びマウスの左側 VMM に *SADΔG-EGFP(EnvA)*を微量投与し、1 週間後に還流固定し、脳と脊髄を観察した(Fig. 3A)。

TVA には C 末に mCherry が融合タンパク質として存在するため、GFP と mCherry を共発現する細胞が *SADΔG-EGFP(EnvA)*が初感染した出発細胞と

判断できる。VMMの中で特に延髄網様体巨大細胞核腹側部 (GiA/GiV)にこの出発細胞を認め (Fig. 3B,C)、mCherry 陽性の軸索を Mo 5N、7N、11N、12N、および全レベルでの脊髓前角に認めた (Fig. 3D)。前述の Gly^{VMM} のトレーシング実験同様 3N、4N、6N には軸索を認めなかったが、RN、LC、DR などの領域には認めなかった (Table 4)。mCherry の軸索の蛍光強度を数値化し、先ほどの Gly^{VMM} の投射先の領域と比較した結果を Fig. 4A に示す。投射先特異的に Gly^{VMM→AH} を標識した本実験は、先の Gly^{VMM} をラベルした実験より感染細胞数が少ないものの、体性運動ニューロンで見られた蛍光強度のシグナルの割合が有意に高いことが分かった (Fig. 4B)。このことから Gly^{VMM} は脳内の広範な領域に出力するが (Fig. 4C)、体性運動ニューロンに限局して投射するニューロン群が存在することが分かった (Fig. 4D)。

4.3 Gly^{VMM→AH} および Gly^{VMM} の上流

cTRIO 法による逆行性トレーシングでは、GFP のみ陽性の入力細胞を脳幹、特に中脳深部核背側部 (deep mesencephalic nucleus; DpMe)、中脳水道灰白質 (periaqueductal gray; PAG)、上丘 (Superior colliculus; SC)、下丘 (inferior colliculus; ECIC)、SLD、橋網様体核 (pontine reticular nucleus; Pn) 等に認めた (Fig. 5A)。特に入力細胞が密に見られた SLD はアセチルコリン作

動性ニューロンの起始核である LDT に近接しており、レム睡眠の制御を担うと考えられている⁷⁶。先行研究では SLD のニューロンは GABA 作動性ではなくグルタミン酸作動性であることが指摘されていることから^{10,58-60}、この SLD に見られた入力細胞が LDT のアセチルコリン作動性ニューロンの一部であるのか、グルタミン酸作動性ニューロンであるのかを判別するため、免疫組織化学染色と *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。GFP で標識された SLD に位置する入力細胞は免疫組織化学染色でも *in situ* ハイブリダイゼーションでも ChAT では標識されず、*in situ* ハイブリダイゼーションでは vGlut2 陽性であることが分かった (Fig. 5B,C)。すなわち LDT のアセチルコリン作動性ニューロンではなく SLD のグルタミン酸作動性ニューロンが体性運動ニューロンに投射する VMM のグリシン作動性ニューロンと直接シナプス接合していることが分かった。

また、投射先特異性のない従来法による狂犬病ウイルスを用いたトレーシングも行った。*GlyT2-iCre* マウスの左側の VMM に Cre 依存的に TVA と RG を発現するウイルス (*AAV10-CAG-FLEX(loxP)-TVA-mCherry* および *AAV10-CAG-FLEX(LoxP)-RG*) を投与し、2 週間後に *SADΔG-GFP (EnvA)* を微量投与した (Fig. 6A,B)。cTRIO で見られた領域と同じような神経核に入力細胞を観察したが (Fig. 6C)、Two-way Anova による事後解析では Gi や GiA/GiV と

いった入力細胞付近の領域が cTRIO による標識で多く見られたのに対して、前庭神経核や小脳の入力細胞は従来法のトレーシングによる標識で多く見られた(Fig. 6D)。このことから Gly^{VMM→AH} は Gly^{VMM} と異なる入力細胞を持つことが示唆される。

4.4 Gly^{VMM} および Glu^{SLD→VMM} の活動阻害は REM-atonia を抑制した

Gly^{VMM} がレム睡眠の筋脱力を制御するのか確かめるため、SNARE 複合体をブロックすることで神経伝達を阻害する破傷風毒素(Tetanus toxin light chain; TeNTLC)を Cre 依存的に発現するウイルスベクター(AAV-FLEX (*loxP*)-TeNTLC-EYFP) を GlyT2-*iCre* マウスの両側 VMM に投与し、2 週間後に睡眠パターンとレム睡眠中の筋活動を観察した(Fig. 7A)。対照群のマウスには Cre 依存的に EYFP のみを発現するウイルスベクター (AAV-FLEX (*loxP*)-EYFP)を投与した。VMM にウイルスの発現が認められた組織像を Fig.7B に、発現が見られた領域を Fig. 7C に示す。対照群のマウスのレム睡眠では脳波では振幅が整ったシータ波が見られ、筋電図では筋活動は見られないという典型的なレム睡眠を呈した(Fig. 7D 上段)。これに対して Gly^{VMM} に TeNTLC を発現させたマウスではノンレム睡眠に続発するレム睡眠様のシータ波が見られるにもかかわらず、レム睡眠中に異常な筋活動を認めた(Fig. 7D 下段)。各ステ

ージにおける筋電の積分値を算出したところ、覚醒期、ノンレム睡眠では両群間に差が認められなかったが(Fig. 7E,F)、破傷風毒素を発現させた群では対照群に比べてレム睡眠中の筋電の積分値が有意に上昇していた(Fig. 7G)。これらの値は筋電電極を置いた場所の違いによってマウスごとに値が異なることから、同じマウスでレム睡眠時の値をノンレム睡眠の値で除した比を算出したところ、この値でも TeNTLC を発現させた群で有意に上昇していた(Fig. 7H)。

cTRIO による実験(Fig. 3A)で Gly^{VMM→AH} は多くの脳幹の神経核から入力を受けていることが分かったが、このうち SLD はレム睡眠の制御に関わると多くの文献で示されている^{56,59,77}。このことから VMM に投射する SLD のグルタミン酸作動性ニューロン(Glu^{SLD→VMM})の機能を特異的に阻害することを試みた。

vGlut2-iresCre マウスの両側 VMM に *CAV2-FLEX(loxP)-Flp* を投与し、SLD に FLP 依存的に TeNTLC を発現するウイルスベクター (*AAV-FLEX(Frt)-TeNTLC-EYFP*)を、対照群には EYFP のみを発現するウイルスベクター(*AAV-FLEX(Frt)-EYFP*)を投与した(Fig. 7I)。EYFP 陽性細胞が SLD に発現する組織像を Fig. 7J に、EYFP 発現細胞が見られた領域を Fig. 7L に示す。また、VMM に見られた EYFP 陽性の軸索を Fig. 7K に示す。手術後から 2 週間後に各ステージでの筋電を観察し、積分値を算出した結果、各ステージで両群に差は見られなかったものの(Fig. 7N-P)、積分値のレム睡眠/ノンレム

睡眠比は破傷風毒素を発現させたマウス群で有意に高くなった(Fig. 7Q)。この結果から $\text{Glu}^{\text{SLD} \rightarrow \text{VMM}}$ が REM-atonia を担うことが分かった。

4.5 Gly^{VMM} および $\text{Glu}^{\text{SLD} \rightarrow \text{VMM}}$ の活動阻害はカタプレキシー様行動を抑制した

次にこの回路がナルコレプシーモデルマウスで見られるカタプレキシー様行動の制御も担うのか検討した。オレキシン作動性ニューロンを脱落する *orexin-ataxin3* マウスはナルコレプシーモデルマウスとして用いられ、暗期にカタプレキシー様行動を示す³³。 *GlyT2-iCre* マウスと *orexin-ataxin3* マウスを交配して得た *GlyT2-iCre; orexin-ataxin3* マウスを用いて実験を行った。前述の実験と同様にこのマウスの両側 VMM に *AAV-FLEX (loxP)-TeNTLC-EYFP* あるいは *AAV-FLEX (loxP)-EYFP* を投与し(Fig. 8A)、2週間後に睡眠覚醒を観察した。実験後に VMM に EYFP が発現しているマウスを解析に用いた(Fig. 8B)。筋電図の積分値のレム/ノンレム比は破傷風毒素を発現した群で有意に高いことを確認した(Fig. 8C)。

オレキシン欠損マウスあるいは *orexin-ataxin3* マウスではチョコレート存在下でカタプレキシー様行動の回数が著明に増加することが示されており^{37,78}、暗期直前にマウスにチョコレート(The Hershey Trust Company)を与えた。マウスのカタプレキシー様行動を観察した先行研究に則り^{37,38,69}、Fig. 8D 左上に示

すように覚醒からレム睡眠の移行をカタプレキシー様行動と定義した。

TeNTLC を発現した群ではカタプレキシー様行動の時間当たりの発生時間、総時間、各エピソードでの平均持続時間、エピソード回数すべてが有意に減少した(Fig. 8E-H)。これらの結果は、Gly^{VMM} はカタプレキシー時の筋脱力をも担うことを示している。

Gly^{VMM} は脳幹の多様な領域から投射を受けていることからその上流領域ではレム睡眠の筋脱力と情動脱力発作を制御する領域が異なることも予想される。そのため、Glu^{SLD→VMM} を特異的に抑制することが情動脱力発作に与える影響を検討した。

vGlut2-iresCre マウスと *orexin-ataxin3* マウスを交配して得た *vGlut2-iresCre;orexin-ataxin3* マウスを用いた。VMM に *CAV2-FLEX (loxP)-Flp* を、SLD に *AAV-FLEX(Frt)-TeNTLC-EYFP* あるいは *AAV-FLEX(Frt)-EYFP* を投与し(Fig. 8I)、1週間後に睡眠覚醒を観察した。実験後に SLD に EYFP 陽性細胞を認めたマウスを解析に用いた(Fig. 8J)。筋電の積分値のレム/ノンレム比が TeNTLC を発現した群で有意に上昇していることを確認した(Fig. 8K)。

チョコレート存在下において、TeNTLC を発現したマウス群では時間当たりのカタプレキシー様行動の発生時間、総時間、各エピソードでの平均持続時間、エピソード回数のすべてが顕著に減少した(Fig. 8L-O)。これらの結果は

Glu^{SLD→VMM}がREM-atonia とカタプレキシーの双方を制御することを示している (Fig. 9)。

4.6 Gly^{VMM}の活動阻害は覚醒時間を延長した

Fig. 7Aの実験でTeNTLCをGly^{VMM}に発現したマウスの睡眠覚醒を1時間プロットで24時間あたり観察したところ、これらのマウスでは覚醒時間が増加し (Fig. 10B)、ノンレム睡眠とレム睡眠の時間が減少することが分かった (Fig. 10C,D)。さらに総時間に関してもGly^{VMM}にTeNTLCを発現した群では明期暗期ともに覚醒時間が増加し (Fig. 10E)、ノンレム睡眠とレム睡眠の時間が減少した (Fig. 10F,G)。覚醒時間の各エピソードでの平均持続時間に関しては明期暗期ともに差が見られなかったが (Fig. 10H)、明期のエピソード回数は増加した (Fig. 10K)。ノンレム睡眠とレム睡眠の各エピソードの平均持続時間は破傷風毒素を発現した群では著明に短縮した (Fig. 10I,J)。エピソード回数は明期でのみノンレム睡眠とレム睡眠ともに増加し、暗期では差は見られなかった (Fig. 10L,M)。各ステージの周波数帯域は両群間に差は見られなかった (Fig. 10N-P)。これらの結果はGly^{VMM}はレム睡眠中の筋活動のみならず、睡眠覚醒も制御していることを示している。

また、これらのマウスにおいて覚醒時の行動も変化するのか確かめるため、睡眠覚醒測定後の一部のマウスでオープンフィールドテストを行った(Fig. 11A)。例数は少ないが、両グループ間で歩行距離に大きな差は見られなかった(Fig. 11B,C)。Gly^{VMM}は体性運動ニューロンを抑制するニューロンであることから、その活動阻害は覚醒時のマウスの活動や歩行距離に影響を及ぼすことも考えうるが、この予備実験においては覚醒時における Gly^{VMM} の活動阻害の顕著な影響はみられなかった。

5. 考察

5.1 延髄腹内側には体性運動ニューロンに限局して投射するグリシン作動性ニューロン群が存在する

レム睡眠は脱同期した低電位の脳波と全身の抗重力筋の弛緩が特徴である。先行研究では Gly^{VMM}がこの筋脱力を誘導すると示唆されてきたが、この筋脱力を制御する正確な神経回路網はこれまで明らかになっていなかった。

そこで本研究ではまずグリシン作動性ニューロン特異的に *Cre* を発現するマウスを作成し(Fig. 1B, Table 3)、投射先に限定せずに Gly^{VMM}の出力先を探索した(Fig. 2A)。Gly^{VMM}は脳幹の体性運動ニューロンや全レベルでの脊髓前角の運動ニューロンに投射するが、眼球運動を司る領域には投射しないことを明らかにした。さらに体性運動ニューロンだけではなく脳内の広範な範囲にその投射を認め、RN や Pn といった運動を制御する脳幹の領域や、覚醒の維持を担う LC、DR といった脳幹網様体賦活系にも投射を確認した(Fig. 2C, Fig. 4C, Table 3)。さらに Gly^{VMM}の中で特に脊髓前角の α motoneurons に投射するニューロン群(Gly^{VMM→AH})をラベルし、その分枝を探索した実験では体性運動ニューロンのみに限局した投射を確認した(Fig. 3D-F, Fig. 4D)。この結果は Gly^{VMM}の中で体性運動ニューロンにのみ限局して投射するグリシン作動性ニューロンが存在することを示している。さらに狂犬病ウイルスベクターを用いた

結果では Gly^{VMM} と Gly^{VMM→AH} はともに DpMe, PAG, SLD, Pn といった脳幹領域から入力を受けることが明らかになったが(Fig. 5A, Fig. 6A)、出発細胞の位置する Gi や GiA/GiV、小脳や前庭ではその割合が両群間で異なることが分かった(Fig. 6D)。これらの結果は Gly^{VMM→AH} は固有の入力源を持つことを示している。

最近の研究では延髄背内側の神経群は動眼神経、滑車神経、外転神経など外眼筋の運動を司る体性運動ニューロンに投射し、レム睡眠時の眼球運動を誘導することが示されている⁷⁹。本研究の結果と合わせて考えるとレム睡眠中に延髄は、腹側部では筋脱力を担い、背側部では眼球運動を担うという異なった役割を持つと考えられる。

5.2 Glu^{SLD}→Gly^{VMM}→体性運動ニューロンの回路が REM-atonia と情動脱力発作を制御する

多くの先行研究では SLD のニューロンがレム睡眠特異的に発火することが示されており、レム睡眠の維持に重要な役割を果たすとされている^{56,59,80}。本研究の改変型狂犬病ウイルスベクター(SAD ΔG(EnvA))を用いた実験では SLD のグルタミン酸作動性ニューロン(Glu^{SLD})が Gly^{VMM→AH} に直接シナプスを形成していることが明らかになった(Fig. 5C-D)。さらに Gly^{VMM} あるいは

Glu^{SLD→VMM} に破傷風毒を発現させ、神経伝達を阻害することで、本来 REM-
atonia が見られるはずのレム睡眠中に異常な筋活動が生じることを見出した
(Fig. 7D,H,M,Q)。先行研究では RNA 干渉によって VMM の抑制性アミノ酸
の小胞輸送体をコードする vGAT の mRNA、あるいは SLD の小胞グルタミン
酸トランスポーターをコードする vGlut2 の mRNA 発現を抑制することで、
REM-atonia が消失することが報告されており^{9,10}、本研究の結果と一致する。

また、ナルコレプシーモデルマウスにおいて Gly^{VMM} を破傷風毒素によって
阻害すると、REM-atonia だけでなくカタプレキシー様行動も強烈に抑制され
ることが分かった(Fig. 8E-H)。イヌを用いた電気生理学実験では延髄正中の同
一のニューロン群がレム睡眠と情動脱力発作で発火することが示されている⁸¹。
本研究の結果から、この発火がレム睡眠とカタプレキシー様行動を誘導す
る神経活動であることが示唆される。

また、Glu^{SLD→VMM} も REM-atonia とカタプレキシー様行動の脱力に重要な役
割を果たすことが示された(Fig. 8L-O)。近年、SLD を含む橋被蓋領域のグル
タミン酸作動性ニューロンを薬理遺伝学的手法によって人為的に興奮させる
と、野生型マウスであってもカタプレキシー様行動が誘導されることが報告さ
れている⁶¹。しかし、これらの領域に抑制性の hM4Di を発現させて人為的に
抑制させた実験ではカタプレキシー様行動は抑制されていない。我々の実験結

果との相違は抑制手段の違いによるものと考えられる。薬理遺伝学的手法では hM4Di の作動薬であるクロザピン N-オキシド (CNO) を投与することによって膜電位を過分極させ、神経活動を抑制するのに対して、本研究で用いた破傷風毒素は神経伝達物質の小胞輸送そのものを阻害するので⁸²、薬理遺伝学的手法よりも強力に神経伝達が阻害されたと考えられる。

5.3 Gly^{VMM} が睡眠覚醒に果たす役割

Gly^{VMM} に破傷風毒素を発現させた実験では筋脱力の消失のみならず覚醒時間の増加とノンレム睡眠とレム睡眠の減少が見られた (Fig. 10)。前述したように順行性トレーサーによる実験では、Gly^{VMM→AH} とは別のグリシン作動性ニューロン群が青斑核や縫線核など覚醒に重要な役割を果たすモノアミン作動性ニューロンの起始核にも投射していることが分かった (Fig. 2C, Fig. 4A, Table 3)。これらの経路はモノアミン作動性ニューロンを抑制することで睡眠を促進する作用がある。最近の研究によれば VMM の GAD2 陽性ニューロンが投射する LC と DR の軸索末端を光遺伝学的手法によって活性化すると、ノンレム睡眠が増加することが示されている⁸³。しかしながら VMM の GAD2 陽性ニューロンを光遺伝学によって抑制しても REM-atonia には影響しないことが報告されており、本研究の研究とは異なる結果である。この相違は、本研究では

VMM の GlyT2 陽性ニューロンを操作したのに対し、先行研究では Gad2 陽性ニューロンを操作しているため、GABA 作動性ニューロンを操作したのかグリシン作動性ニューロンを操作したのかによって結果の相違が生じたと考えられる。延髄のグリシン作動性ニューロンの中には GABA とグリシンをどちらも伝達物質として用いるニューロンが多いとされているものの⁵³、他方で GABA のみあるいはグリシンのみを単独で伝達物質とするニューロンが存在することが示されている^{51,52}。さらに胎生期から生後数週間にかけて GABA とグリシンの双方を伝達物質とするニューロンの一部が、発達の過程で GABA 作動性ニューロンあるいはグリシン作動性ニューロンのどちらかに分化することが示されている^{84,85}。

本研究では Gly^{VMM} の中で LC や DR などのモノアミン作動性ニューロンに投射する群が睡眠覚醒を担うのか、Gly^{VMM→AH} 自体が睡眠覚醒変化も担うのかまでは明らかにしておらず、筋脱力そのものが睡眠覚醒に影響する可能性も考え得る。Gly^{VMM} 内の投射先特異的な操作による睡眠への影響は今後の研究課題としたい。

5.4 α シヌクレイン関連疾患であるレム睡眠行動障害との関連

本研究ではレム睡眠中に筋活動を認めたマウスは、ヒトのパーキンソン病

の前駆病変で見られる RBD を反映したモデルではない。ヒトの正常脳とパーキンソン病患者脳の研究では、 α -シヌクレイン封入体が脳のさまざまな領域に出現し、 α -シヌクレイン沈着のステージが分けられている⁵。脳内の最初の α -シヌクレイン陽性構造は、嗅球または舌咽神経および迷走神経の背側運動核に発生し（第1期）、その後、扁桃体および黒質（第2期）に続いて、延髄および橋の被蓋（第3期）で Lewy 小体が発現する。第4期では側頭葉大脳皮質に達し、大量の α -シヌクレイン陽性アストロサイトが出現する⁸⁶。第5期および第6期には、Lewy 小体および Lewy 神経突起が大脳皮質に広範に出現する。パーキンソン病の硬直、安静時振戦、歩行障害といった症状が現れ始めるのは第3期であるのに対して、RBD は第1期などの初期から出現することが多い。本研究で操作した部位は主に第3期に α -シヌクレインが見られる延髄から橋であり、ヒトの臨床病理像とは相違が生じている。本研究で同定した回路は REM-atonia を誘導する下流の回路であり、ヒトの α -シヌクレイン関連疾患などで見られる RBD の動物モデルと捉えることはできない。しかし、ヒトでも病理学的に α -シヌクレインの集積が見られる以前にすでに橋から延髄腹側に至る神経回路が障害されているために RBD を生じる可能性がある。また、第2期で α -シヌクレインが沈着する扁桃体などの辺縁系が SLD→VMM の上流で筋脱力を制御することも示唆されている(5.6 で議論する)。

5.5 RBD とカタプレキシーの関係

本研究では SLD のグルタミン酸作動性ニューロン→VMM のグリシン作動性ニューロン→体性運動ニューロンという回路($\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$)がカタプレキシー様行動を制御することを示した(Fig. 9)。前項で述べたように RBD は $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}}$ の経路そのもの、あるいはその上流が α シヌクレインの沈着などによって障害され、REM-atonia が破綻する病態であると捉えることができる。一方、カタプレキシーは強い情動によって $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ の経路が駆動され、筋脱力が生じる病態と捉えなおすことができる。すなわち正常に $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ が機能しないのが RBD であるのに対して、覚醒状態では駆動されることのない $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ が強い情動によって機能してしまうのがカタプレキシーであり、対になる疾患と捉えることができる。

では、RBD を併発するナルコレプシー患者の病態はどのように説明できるだろうか。RBD とナルコレプシーを併発する患者は特発性 RBD と比較して発症年齢が若く、異常行動の頻度が少なく、程度も比較的緩徐であることが報告されている⁸⁷⁻⁸⁹。また、皮膚生検による研究では、特発性 RBD 患者では 86.7%(30 人中 26 人)の患者でリン酸化された α シヌクレインの沈着が見られたのに対して、RBD とナルコレプシーを併発する患者では 17 人中 0 人と一人も見られなかったことが報告されている⁸⁸。これらのことから、RBD とナルコ

レプシーを併発する病態は、 α シヌクレイン疾患としての RBD とは異なる病態と考えられる。ナルコレプシー患者ではレム睡眠中に筋肉の攣縮がみられることがあり、これが RBD 様の行動として観測されているのかもしれない⁹⁰。あるいはナルコレプシー患者では、筋脱力を起こさないように $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ を抑制する機構が代償的に強く働くため、レム睡眠中の行動が観察されるという可能性も考えられる。また、背景で述べたようにナルコレプシーは自己免疫疾患であると考えられていることから、視床下部以外の領域も脱落するのかもしれない。いずれにせよナルコレプシーでみられる RBD は独自の病態と考えられる。

背景で述べたように RBD とカタプレキシーはどちらも根本的な治療法は開発されていないため、RBD に対しては SLD を特異的に興奮させること、カタプレキシーに対しては SLD の神経活動を抑える特異的に抑えることが標的になりうるかもしれない。今後、SLD のグルタミン酸作動性ニューロンの神経活動が何によって制御されているのか明らかにしていく必要があるだろう。次項では $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ を制御する領域について考えていきたい。

5.6 オレキシンの下流でカタプレキシーの発動を抑える領域

1.2 で述べたようにカタプレキシーを伴うナルコレプシーはオレキシンの脱

落によって生じることから、 $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ はオレキシン作動性ニューロンの下流に存在するはずである。また、カタプレキシーは強い情動によって駆動されることから大脳辺縁系など情動を制御する領域もこの回路の上流に位置することも考えられる。我々の研究グループの先行研究ではオレキシン受容体欠損マウスの中脳の背側縫線核にオレキシン 2 型受容体を回復させるとカタプレキシー様行動が抑制されることを示した³⁷(Fig. 12A)。一方、青斑核や結節乳頭体核などの神経核にオレキシン受容体を回復させた場合は、睡眠覚醒の分断化は抑えられたものの、カタプレキシー様行動には影響しなかった。また、*orexin-ataxin3* マウスにおいて中脳の背側縫線核から起始するセロトニン作動性ニューロンの扁桃体への軸索末端を光遺伝学手法によって興奮させることでカタプレキシー様行動が抑制されることを示した³⁸。このことから、オレキシン作動性ニューロンが背側縫線核のセロトニン作動性ニューロンを介して扁桃体の過興奮を抑えることでカタプレキシーが抑えられていると考えられる (Fig. 12B)。別のグループの報告では扁桃体中心核(Central amygdala, CeA)の GABA 作動性ニューロン薬理遺伝学的活性によって情動脱力発作の回数が増加することが示されており³⁶、 $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ の回路がカタプレキシーでは扁桃体によって制御される可能性が示唆される。

では、扁桃体は REM-atonia をも制御する領域なのだろうか。fMRI や遠赤外

線を用いたヒトのイメージング実験では、レム睡眠中に扁桃体が賦活することが知られており⁹¹、レム睡眠中も扁桃体の賦活によってカタプレキシー同様に $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ が駆動され、REM-atonia が生じると考えられる。一方でオレキシンノックアウトマウスの扁桃体を破壊した実験ではカタプレキシー様行動が強力に抑制されたものの、レム睡眠を含む睡眠覚醒への影響はなかったという報告があることから³⁵、扁桃体の神経活動はカタプレキシーを発動するが、レム睡眠の構築や REM-atonia には関わらないとする仮説も存在する。

5.7 $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ を制御する領域

次に、REM-atonia とカタプレキシーにおいて $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ を駆動する領域は異なるのか否かを検討した。最近の報告では、中脳水道灰白質側腹部 (vlPAG) から起始し、LDT と SLD に投射する GABA 作動性ニューロンの軸索末端を光遺伝学的手法によって興奮させるとレム睡眠が抑制されることが示されている⁷¹。カルシウムイメージングを用いた報告によれば中脳水道灰白質側腹部 (vlPAG) の GABA 作動性ニューロンはレム睡眠中に活動が低下することも示されている⁷¹。これらの結果は、vlPAG の GABA 作動性ニューロンが $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ の回路を抑制することによって筋脱力を抑制する可能性を示唆している。

vIPAG の GABA 作動性ニューロンとカタプレキシーの関係についてはほとんど報告がないが、vIPAG は CeA から密な入力を受けることが知られる⁹²⁻⁹⁵。CeA の GABA 作動性ニューロンは vIPAG の GABA 作動性ニューロンを脱抑制することによって $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ を駆動させ、カタプレキシーを駆動させるのかもしれない(Fig. 12C)。今後 vIPAG の GABA 作動性ニューロンの活動阻害や人為的興奮などの操作によってカタプレキシー様行動への影響を検討すべきである。

さらに、vIPAG は扁桃体だけでなく外側視床下部のオレキシン作動性ニューロンからも密な入力を受けることが知られている^{22,96}。オレキシンは背側縫線核を介して扁桃体の興奮を抑えるだけでなく、vIPAG を介して $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ の回路を抑制することによって筋脱力を防いでいるのかもしれない(Fig. 12D)。

vIPAG 以外に $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ を制御する領域として考えられるのは LDT のアセチルコリン作動性ニューロンである。RBD 患者の一部でアセチルコリンエステラーゼ阻害薬が奏功すること²¹や、動物の橋被蓋にカラバコールを投与するとレム睡眠が誘導されること⁵⁷などからアセチルコリンは長年レム睡眠の制御因子として考えられてきた^{57,97,98}。本研究の cTRIO による実験で VMM の上流として標識された SLD の入力細胞はアセチルコリン作動性ニュー

ロンではなくグルタミン酸作動性ニューロンであるが、LDTのアセチルコリン作動性ニューロンに隣接している(Fig. 5C,D)。そのため、LDTがその直下に位置するSLDを直接制御し、筋脱力を制御することも考えうる^{55,99}。

6. 結論

本研究では SLD のグルタミン酸作動性ニューロン→VMM のグリシン作動性ニューロン→体性運動ニューロンという回路網がレム睡眠とカタプレキシーに共通して駆動される回路であることを明らかにし、さらに外眼筋の運動を司る体性運動ニューロンにはその支配が及んでいないことを見出した。この知見は、レム睡眠を定義づける急速眼球運動と抗重力筋の弛緩という特徴に一致する。レム睡眠の生理学的な役割や、関連疾患である RBD やナルコレプシーの病態を理解するうえでも、この回路が描写されたことの意義は大きい。

加えて、VMM のグリシン作動性ニューロンは睡眠覚醒の構築にも大きく寄与することが分かった。さらに体性運動ニューロンに投射するニューロン群は縫線核や青斑核に投射するグリシン作動性ニューロン群とは異なる集団を形成する。

7. 図表

AAV	力価 (genome copy/ml)
<i>AAV10-CAG-FLEX (Frt) -TVA-mCherry</i>	4.0×10^{13}
<i>AAV10-CAG-FLEX (Frt) -RG</i>	1.0×10^{13}
<i>AAV10-EF1a-FLEX (loxP) -EYFP</i>	5.8×10^{13}
<i>AAV8-hSyn-FLEX (loxP) -hM3Dq-mCherry</i>	2.0×10^{13}
<i>AAV2-hSyn-FLEX (loxP) -TeNTLC-P2A-EYFP</i>	2.6×10^{13}
<i>AAV10-CAG-FLEX (Frt) -EYFP</i>	2.8×10^{13}
<i>AAV2-CAG-FLEX (Frt) -TeNTLC-P2A-EYFP</i>	3.5×10^{12}

Table 1. 本研究で用いたアデノ随伴ウイルスベクターの力価

一次抗体	メーカー	使用濃度
Rat anti-GFP	ナカライテスク	1:1000
Goat anti-mCherry	SICGEN	1:1000
Rabbit anti-red fluorescent protein	Rockland	1:1000
Goat anti-choline acetyltransferase	Millipore	1:500
Rabbit anti-tryptophan hydroxylase 2	Abcam	1:500
Mouse anti-tyrosine hydroxylase	Santa Cruz	1:2000

二次抗体	メーカー	使用濃度
Alexa Fluor 488 donkey anti-rat	Thermofisher	1:1000
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse	Thermofisher	1:1000
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit	Thermofisher	1:1000
Alexa Fluor 594 donkey anti-goat	Thermofisher	1:1000
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit	Thermofisher	1:1000
Alexa Fluor 647 donkey anti-goat	Abcam	1:1000

Table 2. 本研究で用いた抗体

Brain region (number of animals)	GlyT2 mRNA-expressing neurons in TdTomato expressing neurons	TdTomato-expressing neurons in GlyT2 mRNA-expressing neurons
PnO/PnC (<i>n</i> = 2)	97.2% (106/109 cells)	99.1% (106/107 cells)
SPO/RPO/LSO/MVPO/LVPO (<i>n</i> = 2)	97.6% (123/126 cells)	99.2% (123/124 cells)
GiA/GiV (<i>n</i> = 3)	95.3% (285/299 cells)	97.9% (285/291 cells)
Gi (<i>n</i> = 3)	95.5% (126/132 cells)	99.2% (126/127 cells)
DPGi (<i>n</i> = 2)	95.8% (46/48 cells)	100% (48/48 cells)
LPGi (<i>n</i> = 2)	96.2% (126/131 cells)	100% (126/126 cells)
Renshaw cells in sp7 and sp8 (<i>n</i> = 2)	91.7% (121/132 cells)	100% (121/121 cells)
Dorsal horn neurons in sp3 and sp4 (<i>n</i> = 2)	93.8% (226/241 cells)	98.7% (226/229 cells)

Table 3. *GlyT2-iCre;Ai9* マウスの脳幹の各領域における TdTomato 陽性細胞と GlyT2 陽性細胞の共発現の割合

DPGi, dorsal paragigantocellular nucleus;

DPO, dorsal periolivary region;

Gi, gigantocellular reticular nucleus;

GiV, gigantocellular reticular nucleus, ventral part;

LPGi, lateral paragigantocellular nucleus;

LVPO, lateroventral periolivary region;

LSO, lateral superior olive;

MVPO, medioventral periolivary region;

PnC, pontine reticular nucleus, caudal part;

PnO, pontine reticular nucleus, oral part;

RPO, rostral periolivary region;

sp3, laminae 3 in the spinal cord;

SPO, superior paraolivary nucleus.

		mCherry-positive axons arising from Gly ^{VMM}	TVA-mCherry-positive axons arising from Gly ^{VMM→AH}
Oculomotor nucleus	3N	-	-
Trochlear nucleus	4N	-	-
Motor trigeminal nucleus	Mo5N	+++	+++
Abducens nucleus	6N	-	-
Facial nucleus	7N	+++	+++
Accessory nerve nucleus	11N	+++	+++
Hypoglossal nucleus	12N	+++	+++
Cervical anterior horn	Cervical AH	+++	+++
Thoracic anterior horn	Thoracic AH	+++	+++
Lumber anterior horn	Lumber AH	+++	+++
Medial septum nucleus	MS	+	-
Medial/lateral preoptic nucleus	MPO/LPO	+	-
Lateral hypothalamus	LH	+	-
Zona incerta	ZI	+	-
Centrolateral thalamic nucleus	CL	+	-
Mediodorsal thalamic nucleus	MDL	+	-
Anterior pretectal nucleus	APT	+	-
Red nucleus	RN	++	-
Superior colliculus	SC	+	-
Intercollicular nucleus	InCo	+	-
Ventrolateral periaqueductal gray	vIPAG	++	-
Dorsal raphe nucleus	DR	+	-
Locus coeruleus	LC	++	-
Deep mesencephalic nucleus	DpMe	+	-
Sublaterodorsal tegmental nucleus	SLD	++	-
Pontine reticular nucleus	PnO/PnC	++	-
Intermediate reticular nucleus	IRT	++	-
Vestibular nucleus	Ve	++	-
Parabrachial nucleus	PB	+	-
Parvicellular reticular nucleus	PCRT	+	-
Reticulotegmental nucleus	RtTg	+	+
External cuneate nucleus	ECu	++	-

Table 4. Gly^{VMM} に起始する mCherry 陽性軸索ならびに Gly^{VMM→AH} の分枝として見られた mCherry 陽性軸索

-, 軸索が見られなかった領域; +, 1~3 本程度のわずかな軸索が見られた領域; ++, 密な軸索が見られた領域; +++, 非常に密な軸索が見られた領域

Figure.1

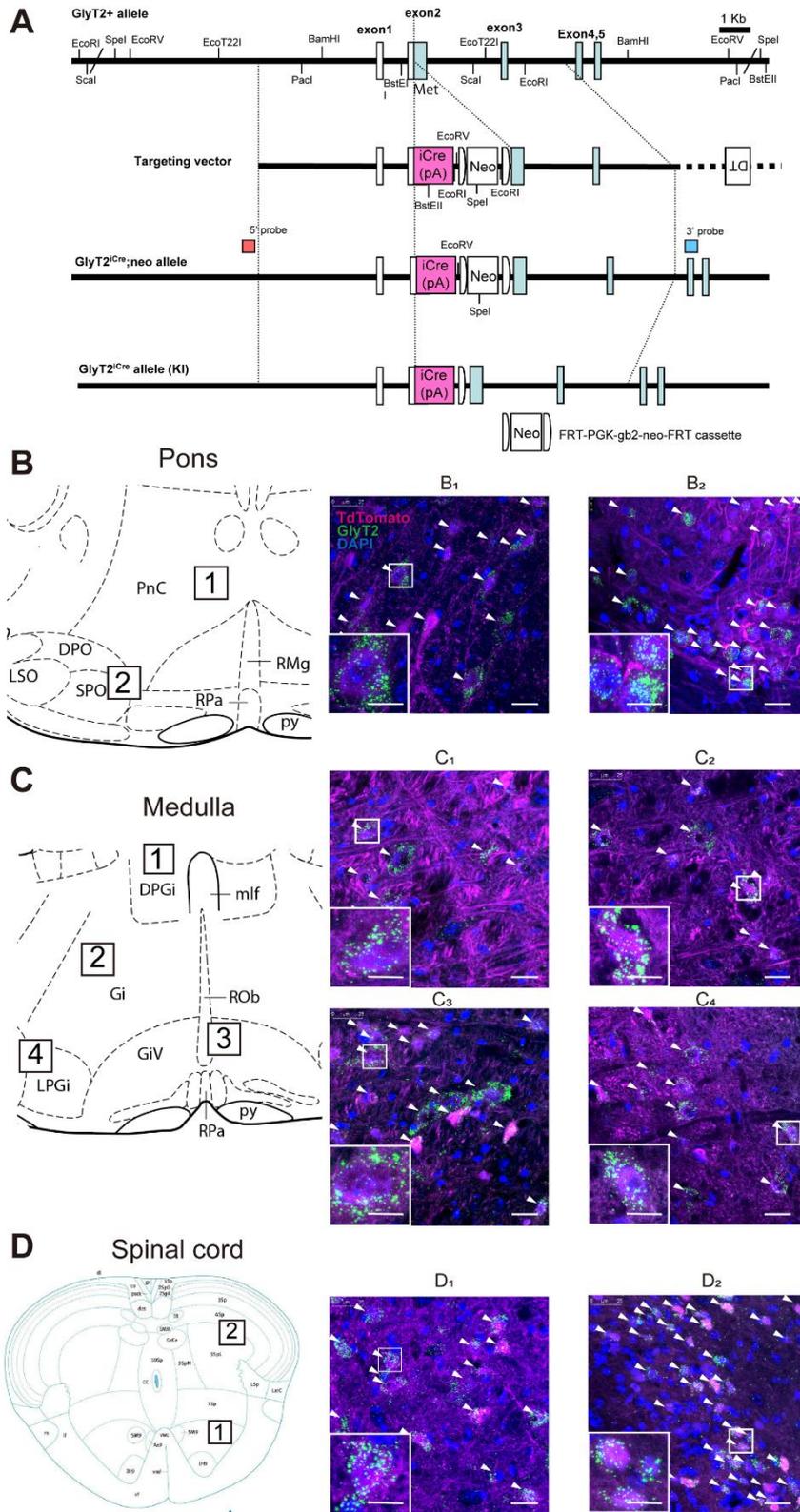


Figure 1. グリシン作動性ニューロン特異的に組み換え酵素 *iCre* を発現するマウスの作製

A, *GlyT2-iCre* マウスを得るまでの遺伝子導入過程。 **B**, *GlyT2-iCre;Ai9* マウスの橋、延髄、脊髄における *in situ* hybridization を用いた代表的な染色像。 Scale bar, 10 μ m.

Figure 2.

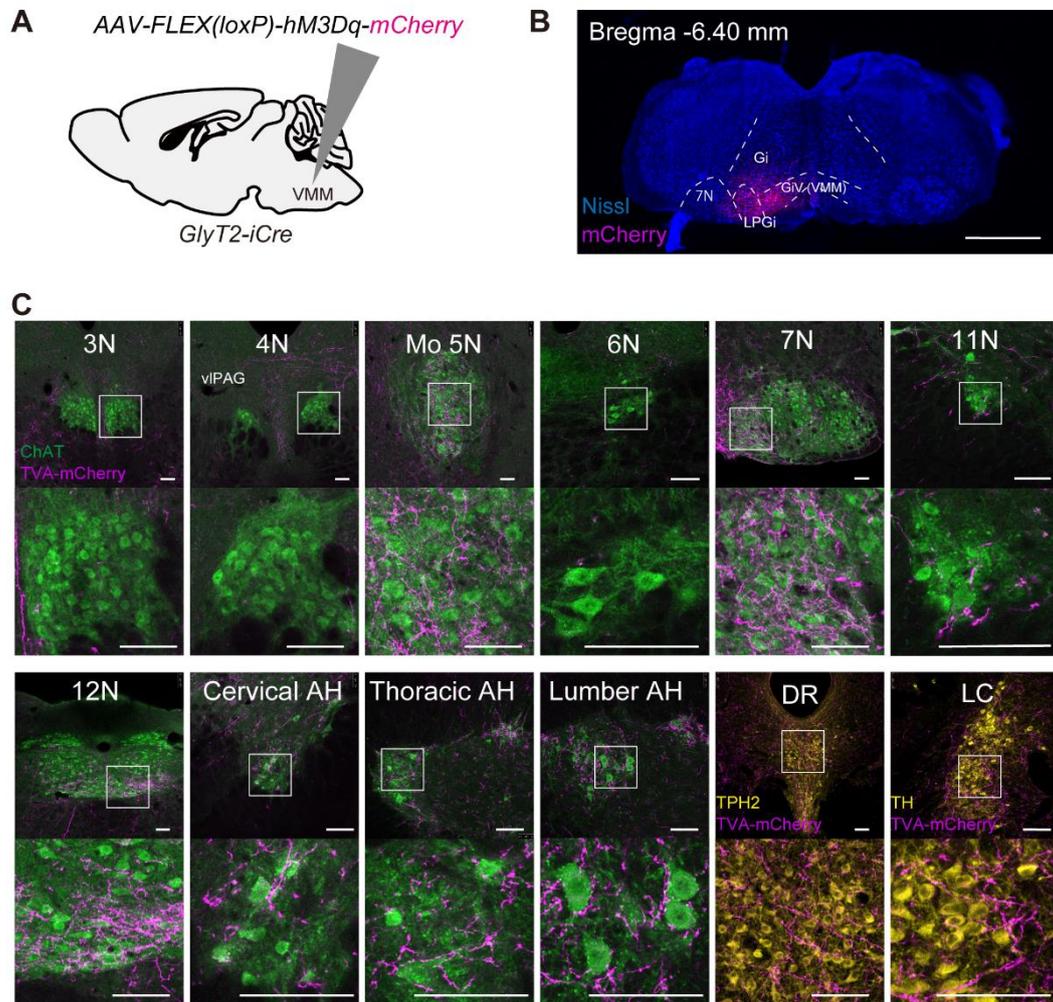


Figure 2. Gly^{VMM} の出力先

A, *GlyT2-iCre* マウスの片側 VMM に *AAV8-hSyn-FLEX (loxP)-hM3Dq-mCherry* を投与した。

B, ウイルスが感染し mCherry を発現する Gly^{VMM} の組織像。Scale bar, 1 mm。

C, 脳および脊髄の各領域における mCherry 陽性軸索(マゼンタ)の組織像。ChAT 陽性の神経は緑色で表す。TPH2 または TH は、それぞれ縫線核(DR)のセロトニン作動性ニューロンあるいは青斑核(LC)のノルアドレナリン作動性ニューロンを染色するために用い、黄色で表す。Scale bar, 100 μ m。

Figure 3.

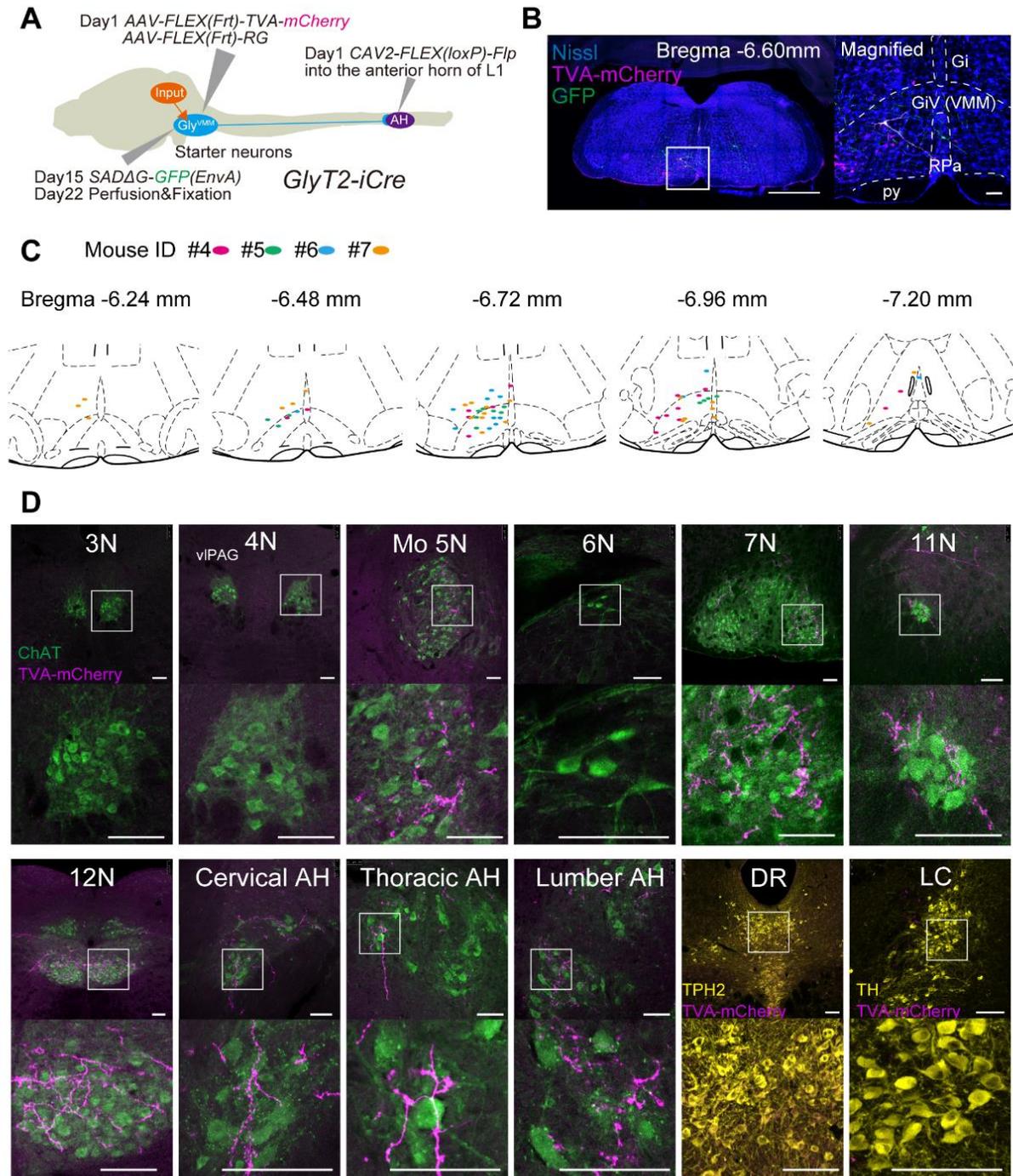


Figure 3. Gly^{VMM→AH} の出力先

A, cTRIO の実験操作手順。GlyT2-*iCre* マウスの L1 レベルの脊髄前角に *CAV2-FLEX(loxP)-Flp* を、VMM に *AAV-FLEX(Frt)-TVA* および *AAV-FLEX(Frt)-RG* を投与した (Day 1)。二週間後、*SADΔG-GFP (EnvA)* を VMM に投与した (Day 15)。

B, VMM における出発細胞。ニッスルは青色で、TVA-mCherry はマゼンタで、*SADΔGFP* は緑色で示す。Scale bar, 1 mm (上段)、100 μm (下段)。

C, 出発細胞が見られた VMM の領域。

D, 脳幹および脊髄の各領域における TVA-mCherry 陽性軸索の組織像。ChAT 陽性ニューロンは緑色、TPH2 あるいは TH 陽性ニューロンは黄色、TVA-mCherry はマゼンタで示す。

Figure 4.

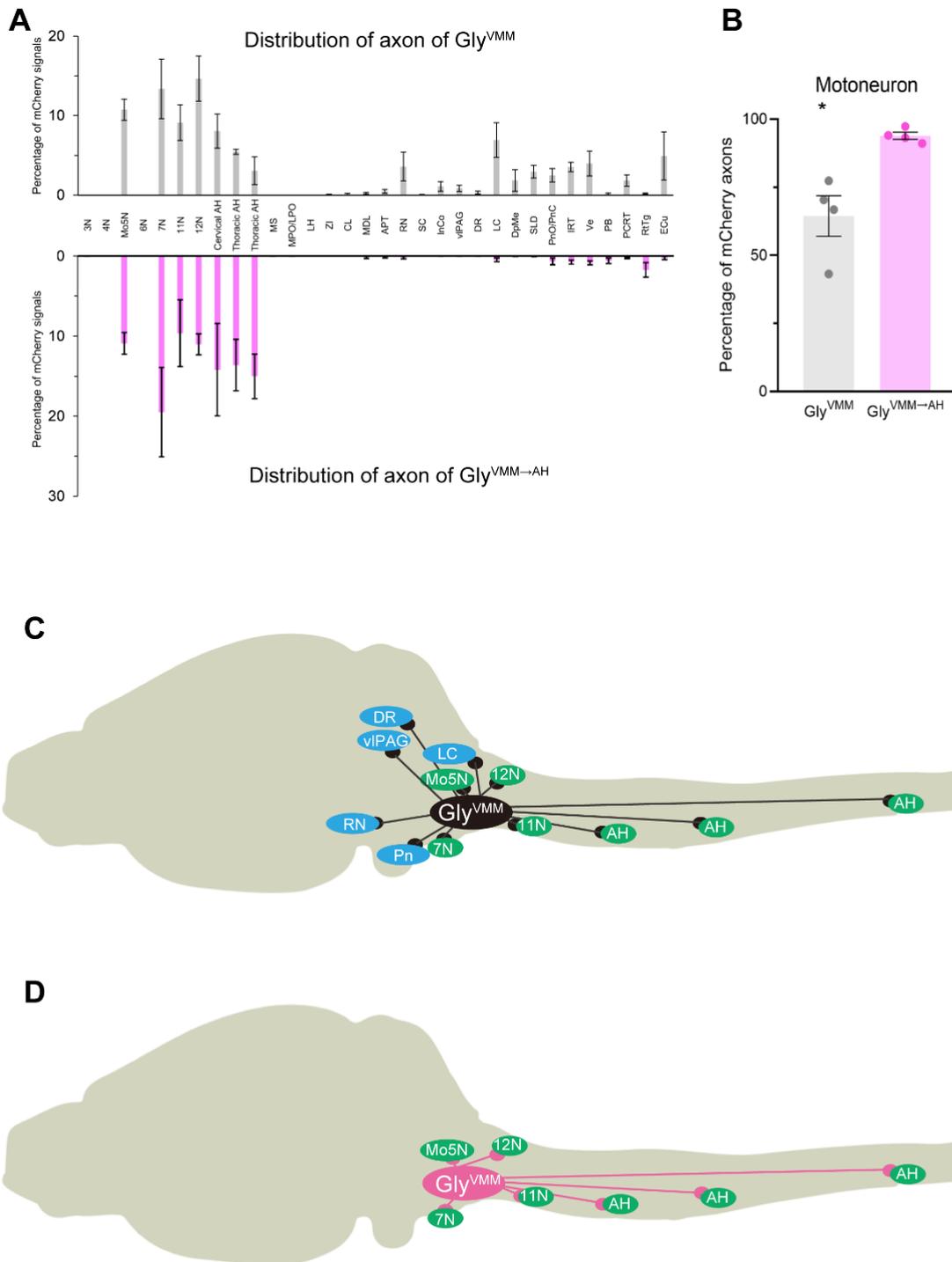


Figure 4. Gly^{VMM} と Gly^{VMM→AH} の出力先の比較

A, Gly^{VMM} (上段) および Gly^{VMM→AH} (下段) の出力先における mCherry シグナルの割合をパーセンテージで表す。各群 $n = 4$ 。

B, 運動ニューロンにおける mCherry 陽性領域の Gly^{VMM} および Gly^{VMM→AH} の比較。

* $p < 0.05$. Unpaired t -test.

C, Gly^{VMM} の出力先は体性運動ニューロンだけでなく、脳内の広範な領域に読んだ。

D, Gly^{VMM→AH} の出力先は体性運動ニューロンに限局した。

Figure 5.

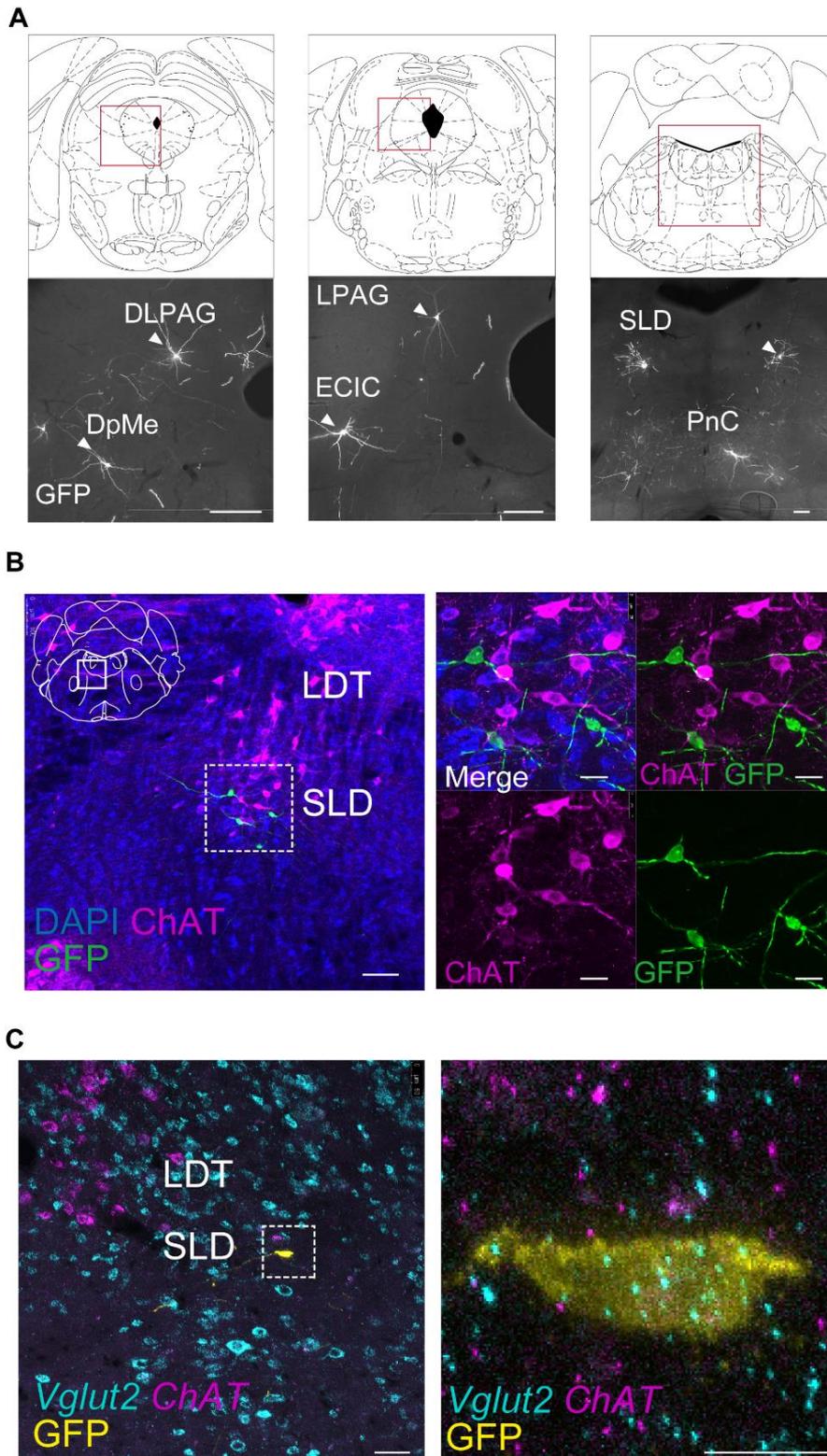


Figure 5. Gly^{VMM→AH} の逆行性経シナプストレーシング

A, cTRIO (Fig.3)における Gly^{VMM→AH} への入力細胞。Scale bar, 200 μ m。

B, SLDに見られた入力細胞における免疫組織化学的染色像。ニッスル (青)、GFP (緑)、ChAT (マゼンタ)。右側に拡大像を示す。Scale bar, 50 μ m (左), 25 μ m (右)。

C, *in situ* hybridization による SLDに見られた入力細胞の染色像。Vglut2 (シアン)、ChAT (マゼンタ)、GFP (緑)。右側に拡大像を示す。Scale bar, 50 μ m (左), 25 μ m (右)。

Figure 6.

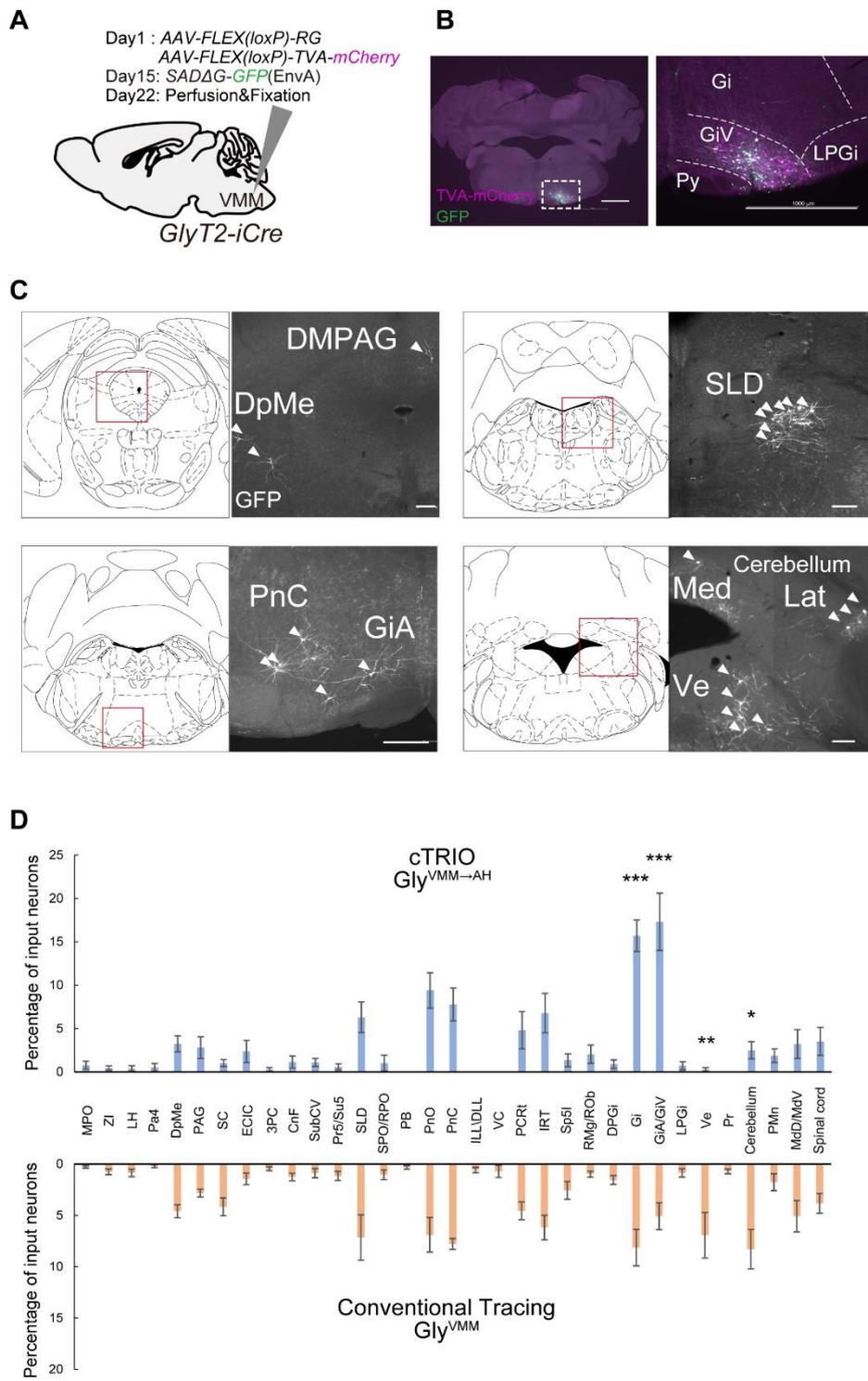


Figure 6. Gly^{VMM} の逆行性経シナプストレーシング

- A**, 狂犬病ウイルスベクターを用いた従来型の逆行性トレーシングの実験操作手順。TVA と RG を VMM のグリシン作動性ニューロン特異的に発現させる (Day 1)。二週間後、SAD Δ G-GFP (EnvA) を同じ箇所微量投与する (Day 15)。
- B**, VMM における出発細胞。TVA-mCherry はマゼンタで SAD Δ G-GFP は緑色で表す。Scale bar, 1 mm。
- C**, 従来型の逆行性トレーシングにおける Gly^{VMM} の入力細胞 (white)。Scale bar, 200 μ m。
- D**, Gly^{VMM \rightarrow AH} (上段) および Gly^{VMM} (下段) の入力細胞の分布。各群 4 匹の平均値 (\pm 標準誤差) を表す。two-way ANOVA with post-hoc Bonferroni's multiple-comparison test による検定。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ 。

Figure 7.

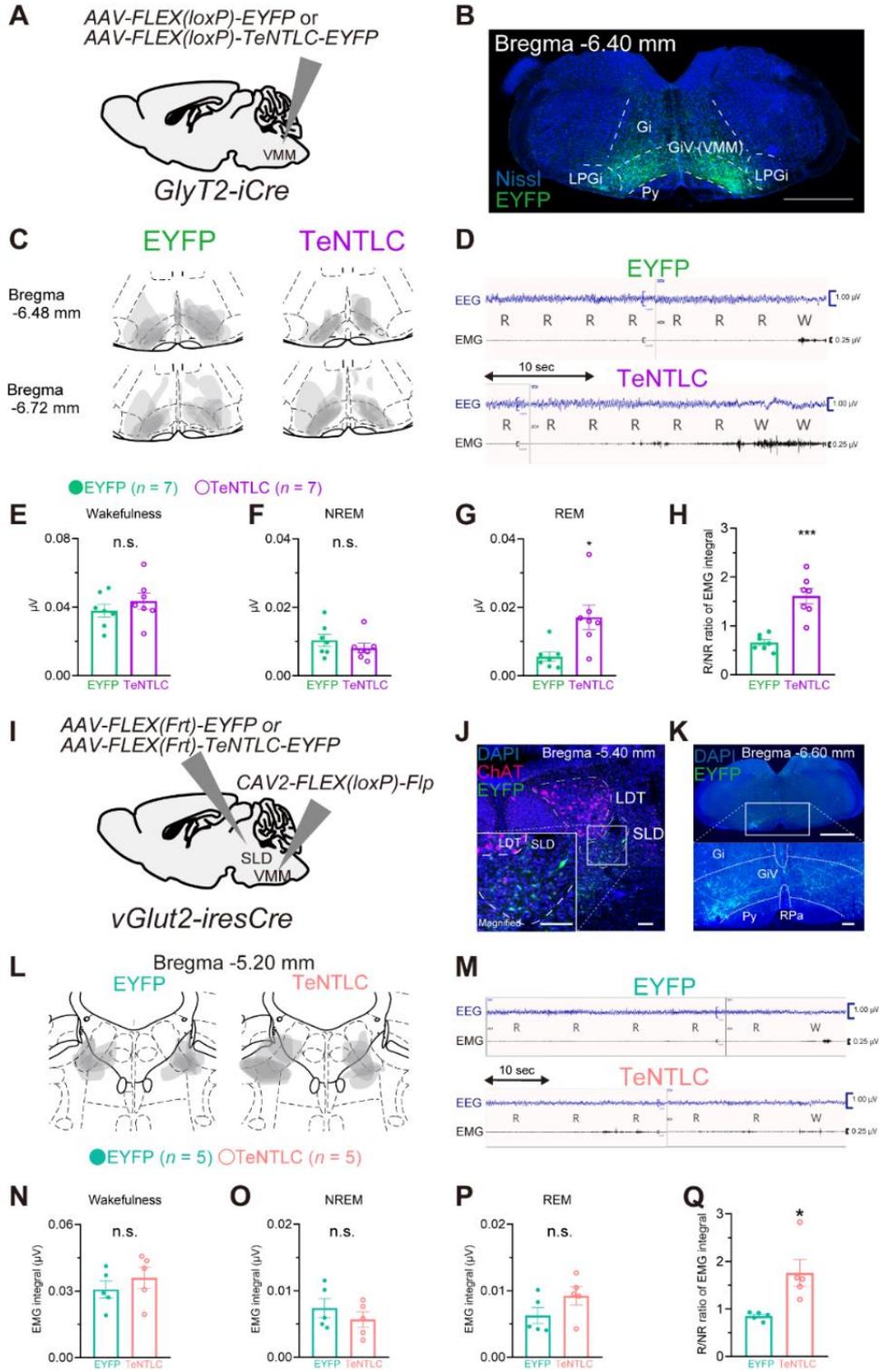


Figure 7. Gly^{VMM} および Glu^{SLD→VMM} の神経伝達の阻害は REM-atonia を抑制した。

A, ウイルス投与の実験操作。AAV2-*hSyn-FLEX (loxP)-TeNTLC-P2A-EYFP* または AAV10-*EF1a-FLEX (loxP)-EYFP* を *GlyT2-iCre* マウスの両側 VMM に投与した。

B, VMM における EYFP 陽性細胞の組織像。Scale bar, 1 mm。

C, EYFP 陽性細胞が観察された VMM の領域を示す。各群 $n = 7$ 。

D, レム睡眠の脳波 (青) および筋電 (黒) の波形。対照群 (上段) および 破傷風毒素を発現する群 (下段)。

E-G, 覚醒 (**E**)、ノンレム睡眠 (**F**)、およびレム睡眠 (**G**) における筋電積分値。

H, 筋電積分値のレム睡眠/ノンレム睡眠比。

I, *vGlut2-iresCre* マウスの SLD に AAV-CAG-*FLEX(Frt)-TeNTLC-P2A-EYFP* または AAV-CAG-*FLEX (Frt)-EYFP* を、VMM に *CAV2-FLEX (loxP)-Flp* を投与した。

J, SLD における EYFP 陽性細胞の組織像を示す。ChAT はマゼンタで EYFP は緑色でニッスルは青色で示す。左下に拡大像を示す。Scale bar, 100 μ m。

K, VMM における EYFP 陽性の軸索。Scale bar, 1mm (上段)、100 μ m (下段)。

L, SLD における EYFP 発現が見られた範囲。各群 $n = 5$ 。

M, レム睡眠の脳波 (青) および筋電 (黒) の波形。対照群 (上段) および 破傷風毒素を発現する群 (下段)。

N-P, 覚醒 (**N**)、ノンレム睡眠 (**O**)、and レム睡眠 (**P**) における筋電積分値。

Q, 筋電積分値のレム睡眠/ノンレム睡眠比。

数値は平均値(±)標準誤差で表記した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Unpaired t -test。

Figure 8.

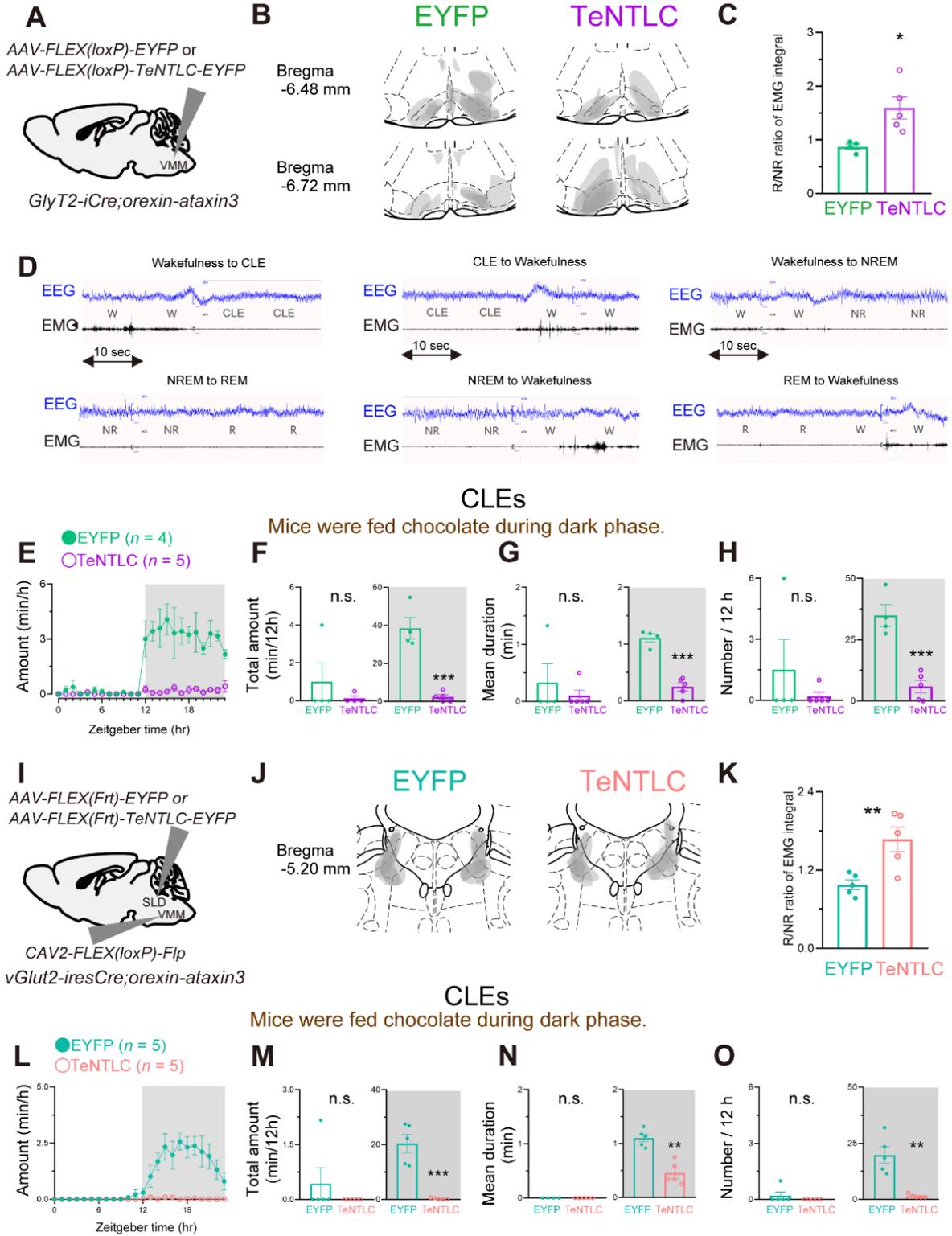


Figure 8. Gly^{VMM} および Glu^{SLD→VMM} の神経伝達の阻害はナルコレプシーモデルマウスにおいてカタプレキシー様行動を抑制した。

A, ウイルス投与の実験操作。GlyT2-*iCre*; *orexin-ataxin3* マウスの VMM に AAV2-*hSyn-FLEX (loxP)*-*TeNTLC-P2A-EYFP* または AAV10-*EF1a-FLEX (loxP)*-*EYFP* を投与した。

B, VMM において EYFP の発現が見られた範囲。EYFP, $n = 4$; TeNTLC, $n = 5$ 。

C, 筋電積分値のレム睡眠/ノンレム睡眠比。

D, 各ステージ間における脳波(青)および筋電(黒)の代表的な波形を示す。覚醒からカタプレキシー様行動 (CLE)への移行 (上段左)、CLE から覚醒への移行 (上段中)、覚醒からノンレム睡眠 (上段右)、ノンレム睡眠からレム睡眠 (下段左)、ノンレム睡眠から覚醒 (下段中)、レム睡眠から覚醒 (下段右)。

E, 1時間ごとの CLE が占める時間の 24 時間プロット。

F, 明期および暗期における CLE の総時間。

G, 明期および暗期における CLE の平均持続時間。

H, 明期および暗期における CLE の発生回数。

I, *vGlut2-iresCre*; *orexin-ataxin3* マウスの SLD に AAV2-*CAG-FLEX (Frt)*-*TeNTLC-P2A-EYFP* または AAV10-*CAG-FLEX (Frt)*-*EYFP* を、VMM に AAV2-*FLEX (loxP)*-*Flp* を投与した。

J, SLD における EYFP の発現が見られた範囲。各群 $n = 5$ 。

K, 筋電積分値のレム睡眠/ノンレム睡眠比。

L, 1時間ごとの CLE が占める時間の 24 時間プロット。

M, 明期および暗期における CLE の総時間。

N, 明期および暗期における CLE の平均持続時間。

O, 明期および暗期における CLE の回数。

数値は平均値(±)標準誤差で表記した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 単一変数の比較は Unpaired *t*-test で、複数の変数の比較は Bonferroni の多重比較検定を用いた。

Figure 9.

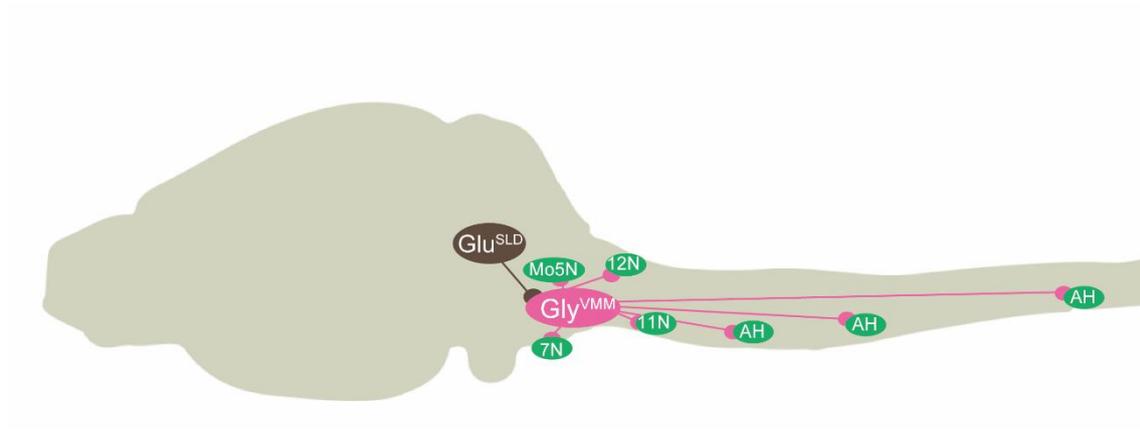


Figure 9.

SLD のグルタミン酸作動性ニューロン→VMM のグリシン作動性ニューロン→体性運動ニューロンという神経回路が REM-atona およびカタプレキシーを制御する。

Figure 10.

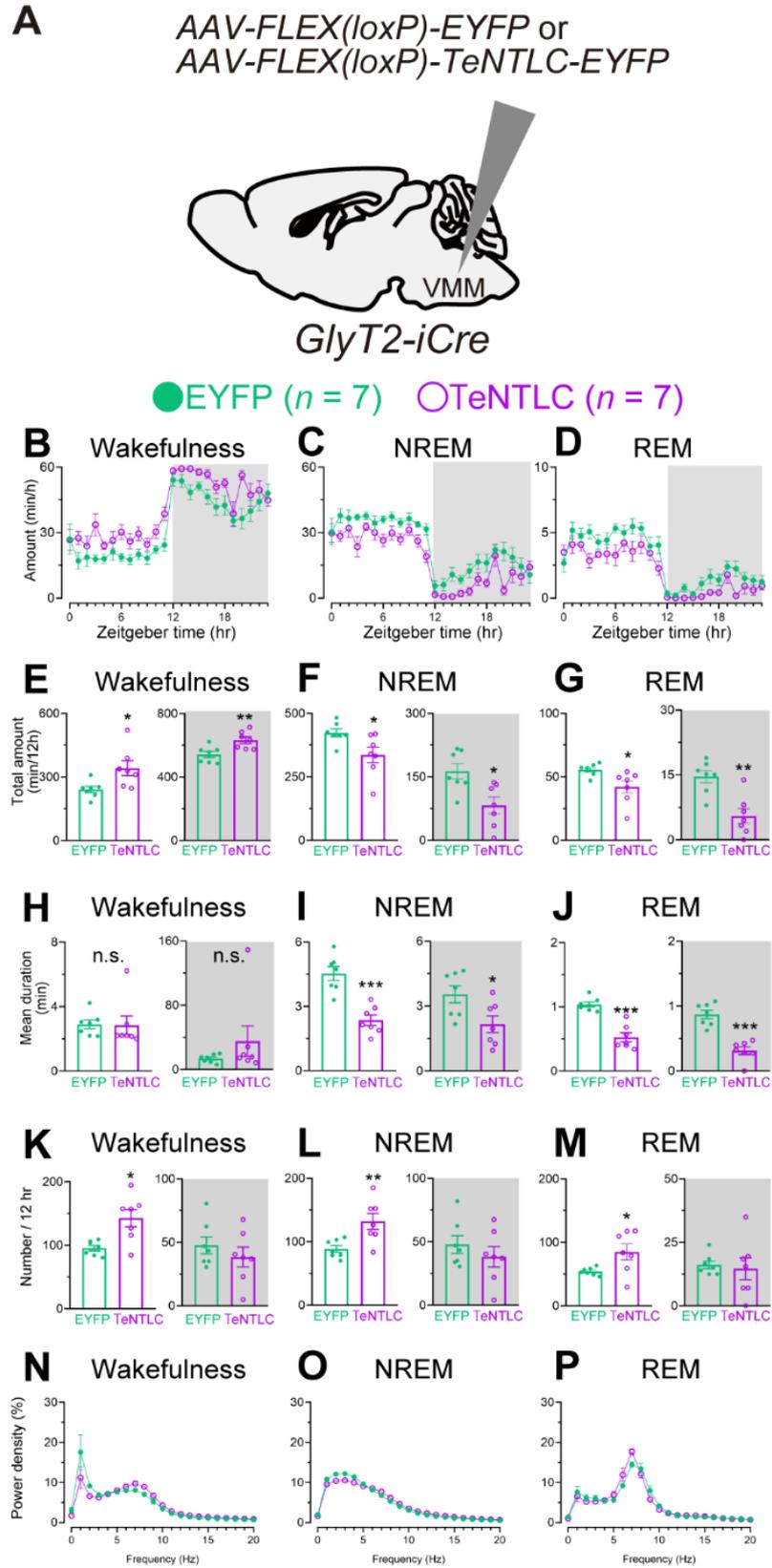


Figure 10. Gly^{VMM} の活動阻害は覚醒時間を増やし、ノンレム睡眠およびレム睡眠時間を減少させた。

A, AAV 投与の実験操作。

B-D, 覚醒 (*B*)、ノンレム睡眠 (*C*) およびレム睡眠 (*D*) の 1 時間あたりに占める時間の 24 時間プロット (各群 $n = 7$)。

E-G, 明期・暗期における覚醒 (*E*)、ノンレム睡眠 (*F*)、およびレム睡眠 (*G*) の総時間。

H-J, 明期・暗期における覚醒 (*H*)、ノンレム睡眠 (*I*)、およびレム睡眠 (*J*) の平均持続時間。

K-M, 明期・暗期における覚醒 (*K*)、ノンレム睡眠 (*L*)、およびレム睡眠 (*M*) の発生回数。

N-P, 覚醒 (*N*)、ノンレム睡眠 (*O*)、およびレム睡眠 (*P*) における脳波の周波帯域の比較。

数値は平均値(±)標準誤差で表記した。 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 単一変数の比較は Unpaired t -test で、複数の変数の比較は Bonferroni による多重比較検定を用いた。

Figure 11.

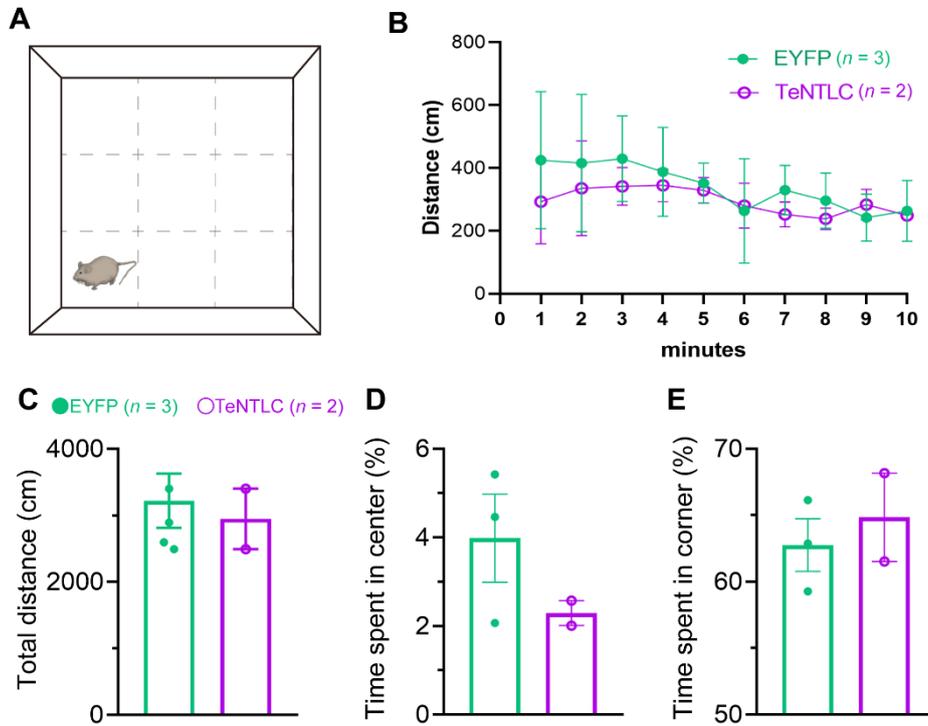


Figure 11. Gly^{VMM} を活動阻害したマウスにおけるオープンフィールドテストの予備実験データ

A, マウスを照度が一定の 40cm×40cm の白い箱の中に入れ、10 分間自発的な行動を測定した。中央の 1 ブロックを中央区間(center)、四隅の 4 ブロックを四隅区間(corner)と定義した。

B, 10 分間の移動距離を 1 分ごとにプロットしたグラフ。

C, 10 分間の総移動距離。

D, 中央区画に滞在した時間の割合(%)。

E, 四隅区画に滞在した時間の割合(%)。

Figure 12.

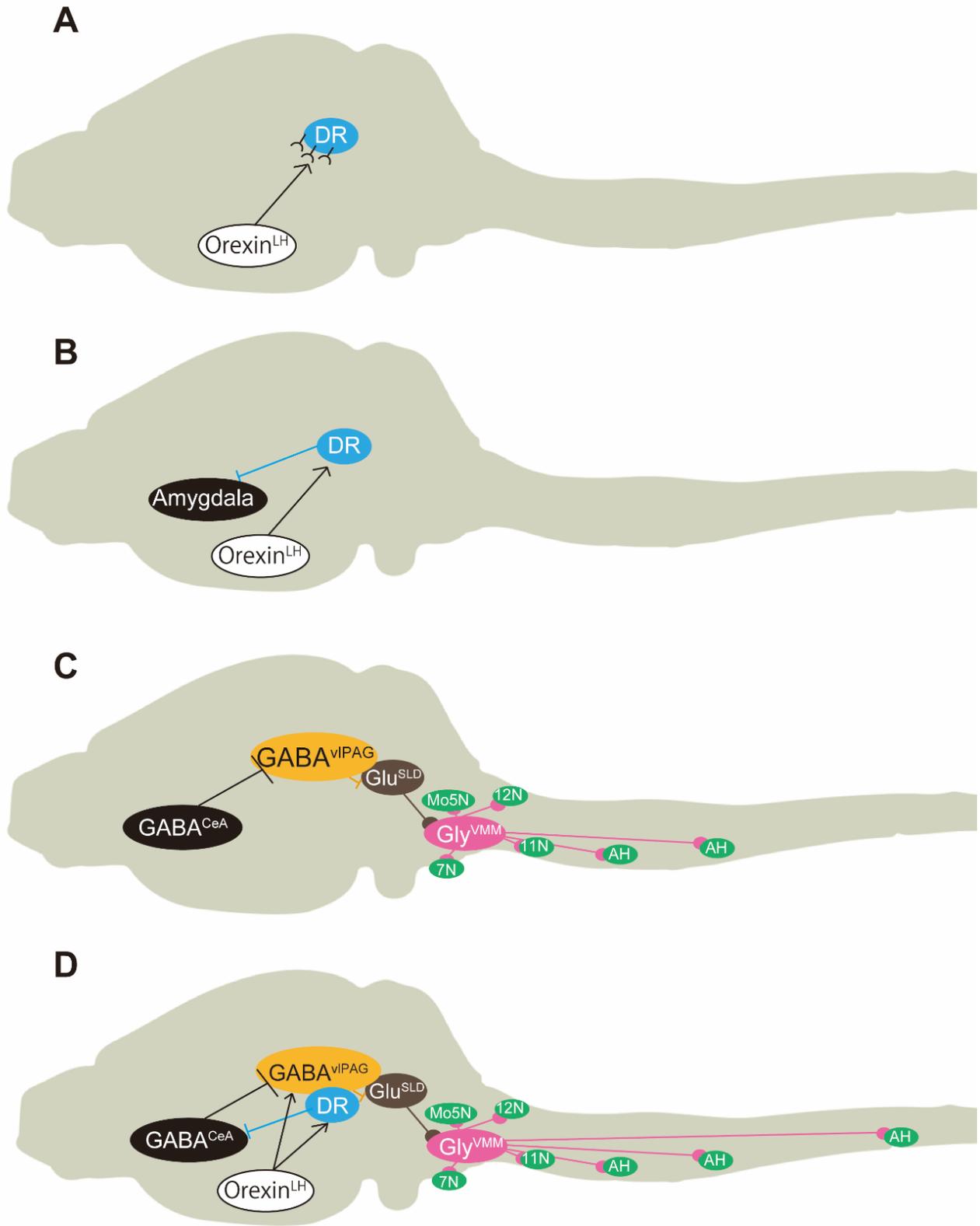


Figure 12. 脳内でカタプレキシー様行動を抑制する領域と $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}}$ の関係

A, オレキシン受容体欠損マウスの中脳の背側縫線核にオレキシン受容体を回復させるとカタプレキシー様行動が抑制される。

B, *orexin-ataxin3* マウスの背側縫線核のセロトニン作動性ニューロンの扁桃体への軸索末端を光遺伝学的手法によって興奮させるとカタプレキシー様行動の発動が抑えられる。このことからオレキシンは背側縫線核のセロトニン作動性ニューロンを介して扁桃体の興奮を抑えることでカタプレキシーの発動を防いでいると考えられる。

C, $\text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}}$ を制御する上流領域の推測。CeA の GABA 作動性ニューロン (GABA^{CeA}) の興奮によってカタプレキシー様行動が増えることが報告されている。また、vlPAG の GABA 作動性ニューロン ($\text{GABA}^{\text{vlPAG}}$) は扁桃体から密な投射を受けると、さらに vlPAG は橋被蓋に投射し、レム睡眠の発動を抑えることなどを踏まえると、 $\text{GABA}^{\text{CeA}} \rightarrow \text{GABA}^{\text{vlPAG}} \rightarrow \text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ という回路がレム睡眠あるいはカタプレキシーで駆動されるのかもしれない。

D, vlPAG は視床下部のオレキシン作動性ニューロン ($\text{orexin}^{\text{LH}}$) から多くの入力を受けることから、**C** の回路の他に $\text{orexin}^{\text{LH}} \rightarrow \text{GABA}^{\text{vlPAG}} \rightarrow \text{Glu}^{\text{SLD}} \rightarrow \text{Gly}^{\text{VMM}} \rightarrow \text{Mn}$ という回路も考えられる。

8. 謝辞

本研究と論文作成にあたり、ご指導、ご高閲を賜りました櫻井武教授（筑波大学医学医療系）に心から感謝いたします。また実験と論文執筆の指導をして頂いた征矢晋吾助教（筑波大学医学医療系）に深く感謝いたします。

プラスミドコンストラクトの作成など実験のご指導頂いた平野有沙助教、手術などの実験技術をご指導頂いた長谷川恵美助教(ともに筑波大学医学医療系)に心より感謝申し上げます。改変型狂犬病ウイルスベクターの作成などで実験補助頂いた齊藤夕貴博士、プラスミドコンストラクトを提供していただいた櫻井勝康助教と Yoan Cherasse 博士、画像解析をご指導頂いた粕谷昌寿さん(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)に心より感謝申し上げます。

遺伝子改変動物の作製にご協力いただいた崎村健司教授、阿部学准教授(ともに新潟大学脳研究所)に感謝いたします。

脊髄へのウイルス投与の手技をご指導頂きました津田誠教授と古賀啓介助教(ともに九州大学大学院薬学研究科)に感謝いたします。

ともに学生として研究生活を送ってきた高橋徹さん、李若詩さん、富永拡さん、石川ゆいさんに心から感謝します。

学部時代に研究への道を後押ししていただいた柳沢正史教授、入鹿山容子博士(ともに筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)、小川靖裕博士(筑波大学附属病

院総合内科)、村本玄紀博士(慶応義塾大学病院病理診断科)に心から感謝いたします。

最後に、これまで温かく見守ってくれた両親、祖父、そして亡き祖父母に深く感謝いたします。

本研究は、多くの研究助成により実施されたものです。

ここに記して感謝の意を表します。

世界トップレベル研究拠点(WPI)プログラム (睡眠覚醒機構の解明を目指し、基礎から臨床までを網羅する世界トップレベルの睡眠医科学研究拠点)

日本学術振興会・科学研究費補助金

基盤 B (15H03122 ストレスや不安が過覚醒をうむ神経科学的機構の解明、

18H02595 大脳辺縁系と睡眠覚醒制御系との構造的・機能的連関の解明)

新学術領域・ウィルダイナミクス(16H06401 動機付けおよび強化学習に關与する分子・神経基盤の解明)

挑戦的研究(萌芽) (15K12768 カタプレキシーを発動する神経経路の解明)

特別研究員奨励費 (18J21114 オレキシンによる意欲の向上が全身炎症後の活動量の回復促進に果たす役割)

9. 出典

本学位論文では Journal of neuroscience に掲載される予定の論文(JN-RM-0688-20R2)の内容を、Society for Neuroscience からの許可を得て再利用している。

10. 参考文献

1. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 1953;118(3062):273-274.
2. El Mansari M, Sakai K, Jouvet M. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp Brain Res*. 1989;76(3):519-529. doi:10.1007/BF00248908
3. Soja PJ, Lopez-Rodriguez F, Morales FR, Chase MH. The postsynaptic inhibitory control of lumbar motoneurons during the atonia of active sleep: Effect of strychnine on motoneuron properties. *J Neurosci*. 1991;11(9):2804-2811. doi:10.1523/jneurosci.11-09-02804.1991
4. Chase MH, Soja PJ, Morales FR. Evidence that glycine mediates the postsynaptic potentials that inhibit lumbar motoneurons during the atonia of active sleep. *J Neurosci*. 1989;9(3):743-751. doi:10.1523/jneurosci.09-03-00743.1989
5. Holstege JC, Bongers CMH. A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labelling study in rat. *Brain Res*. 1991;566(1-2):308-315. doi:10.1016/0006-8993(91)91715-D
6. Morales FR, Sampogna S, Rampon C, Luppi PH, Chase MH. Brainstem glycinergic neurons and their activation during active (rapid eye movement) sleep in the cat. *Neuroscience*. 2006;142(1):37-47. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.066
7. Vetrivelan R, Fuller PM, Tong Q, Lu J. Medullary circuitry regulating rapid eye movement sleep and motor atonia. *J Neurosci*. 2009;29(29):9361-9369. doi:10.1523/JNEUROSCI.0737-09.2009
8. Lai YY, Kodama T, Schenkel E, Siegel JM. Behavioral response and transmitter release during atonia elicited by medial medullary stimulation. *J Neurophysiol*. 2010;104(4):2024-2033. doi:10.1152/jn.00528.2010
9. Garcia SV, Brischoux F, Clément O, et al. inactivation induces REM sleep without atonia and REM sleep behavior disorder. *Nat Commun*. 2018;9(504):1-11. doi:10.1038/s41467-017-02761-0
10. Garcia SV, Libourel P, Lazarus M, Grassi D. Genetic inactivation of glutamate neurons in the rat sublaterodorsal tegmental nucleus recapitulates REM sleep behaviour disorder. *Brain*. 2017;140(2):414-428. doi:10.1093/aww329
11. Fraigne JJ, Torontali ZA, Snow MB, Peever JH. REM sleep at its core - Circuits, neurotransmitters, and pathophysiology. *Front Neurol*. 2015;6(MAY):1-9. doi:10.3389/fneur.2015.00123
12. Schenck CH, Bundlie SR, Ettinger MG, Mahowald MW. Chronic behavioral disorders of

- human REM sleep: A new category of parasomnia. *Sleep*. 1986;9(2):293-308.
doi:10.1093/sleep/9.2.293
13. Iranzo A, Santamaria J, Tolosa E. Idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder: Diagnosis, management, and the need for neuroprotective interventions. *Lancet Neurol*. 2016;15(4):405-419. doi:10.1016/S1474-4422(16)00057-0
 14. Uchiyama M, Isse K, Tanaka K, et al. Incidental Lewy body disease in a patient with REM sleep behavior disorder. *Neurology*. 1995;45(4):709 LP - 712.
doi:10.1212/WNL.45.4.709
 15. Eisensehr I, Linke R, Noachtar S, Schwarz J, Gildehaus FJ, Tatsch K. Reduced striatal dopamine transporters in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. Comparison with Parkinson's disease and controls. *Brain*. 2000;123(6):1155-1160.
doi:10.1093/brain/123.6.1155
 16. Miyamoto T, Miyamoto M, Iwanami M, et al. Olfactory dysfunction in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Sleep Med*. 2010;11(5):458-461.
doi:10.1016/j.sleep.2009.09.013
 17. Dauvilliers Y, Rompré S, Gagnon JF, Vendette M, Petit D, Montplaisir J. REM sleep characteristics in narcolepsy and REM sleep behavior disorder. *Sleep*. 2007;30(7):844-849. doi:10.1093/sleep/30.7.844
 18. Postuma RB, Gagnon JF, Tuineaig M, et al. Antidepressants and REM sleep behavior disorder: Isolated side effect or neurodegenerative signal? *Sleep*. 2013;36(11):1579-1585.
doi:10.5665/sleep.3102
 19. Schenck CH, Zucconi M, Ferri R. Use of clonazepam in REM sleep behavior disorder is not associated with fall-related injuries. *J Clin Sleep Med*. 2020;16(8):1399-1400.
doi:10.5664/jcsm.8566
 20. Ian R. McGrane, Pharm.D.a, Jonathan G. Leung, Pharm.D., BCPS, BCPPb, Erik K. St Louis, M.D.d, and Bradley F. Boeve MD. Melatonin Therapy for REM Sleep Behavior Disorder: A Critical Review of Evidence Ian. *Sleep Med Rev*. 2016;16(1):19-26.
doi:10.1016/j.sleep.2014.09.011.Melatonin
 21. Jung Y, St. Louis EK. Treatment of REM Sleep Behavior Disorder. *Curr Treat Options Neurol*. 2016;18(11). doi:10.1007/s11940-016-0433-2
 22. Peyron C, Tighe DK, Van Den Pol AN, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 1998;18(23):9996-10015.
doi:10.1523/jneurosci.18-23-09996.1998
 23. Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*. 2000;355(9197):39-40. doi:10.1016/S0140-6736(99)05582-8

24. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*. 2000;27(3):469-474. doi:10.1016/S0896-6273(00)00058-1
25. Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, et al. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol*. 2002;59(10):1553-1562. doi:10.1001/archneur.59.10.1553
26. Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*. 2000;6(9):991-997. doi:10.1038/79690
27. Mignot E, Lin L, Finn L, et al. Correlates of sleep-onset REM periods during the Multiple Sleep Latency Test in community adults. *Brain*. 2006;129(6):1609-1623. doi:10.1093/brain/awl079
28. Hallmayer J, Faraco J, Lin L, et al. Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet*. 2009;41(6):708-711. doi:10.1038/ng.372
29. Fontana A, Gast H, Reith W, Recher M, Birchler T, Bassetti CL. Narcolepsy: Autoimmunity, effector T cell activation due to infection, or T cell independent, major histocompatibility complex class II induced neuronal loss. *Brain*. 2010;133(5):1300-1311. doi:10.1093/brain/awq086
30. Han F, Lin L, Warby SC, et al. Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in china. *Ann Neurol*. 2011;70(3):410-417. doi:10.1002/ana.22587
31. de Zambotti M, Pizza F, Covassin N, et al. Facing emotions in narcolepsy with cataplexy: Haemodynamic and behavioural responses during emotional stimulation. *J Sleep Res*. 2014;23(4):432-440. doi:10.1111/jsr.12133
32. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 1999;98(4):437-451. doi:10.1016/S0092-8674(00)81973-X
33. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 2001;30(2):345-354. doi:10.1016/S0896-6273(01)00293-8
34. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(3):171-181. doi:10.1038/nrn2092
35. Burgess CR, Oishi Y, Mochizuki T, Peever JH, Scammell TE. Amygdala lesions reduce cataplexy in orexin knock-out mice. *J Neurosci*. 2013;33(23):9734-9742. doi:10.1523/JNEUROSCI.5632-12.2013
36. Mahoney CE, Agostinelli LJ, Brooks JNK, Lowell BB, Scammell TE. GABAergic neurons of the central amygdala promote cataplexy. *J Neurosci*. 2017;37(15):3995-4006. doi:10.1523/JNEUROSCI.4065-15.2017

37. Hasegawa E, Sakurai T, Mieda M, et al. Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways. *J Clin Invest*. 2014;124(2):604-616. doi:10.1172/JCI71017.604
38. Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Masseck OA, Herlitze S, Yoshioka M. Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the antiepileptic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(17):E3526-E3535. doi:10.1073/pnas.1614552114
39. Eulenburg V, Armsen W, Betz H, Gomeza J. Glycine transporters: Essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(6):325-333. doi:10.1016/j.tibs.2005.04.004
40. Poyatos I, Ponce J, Aragón C, Giménez C, Zafra F. The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;49(1-2):63-70. doi:10.1016/s0169-328x(97)00124-1
41. Kakizaki T, Sakagami H, Sakimura K, Yanagawa Y. A glycine transporter 2-Cre knock-in mouse line for glycinergic neuron-specific gene manipulation Abbreviations : *IBRO Reports*. 2017;3:9-16. doi:10.1016/j.ibror.2017.07.002
42. Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, et al. Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol*. 2005;482(2):123-141. doi:10.1002/cne.20349
43. Husson Z, Rousseau C V., Broll I, Zeilhofer HU, Dieudonné S. Differential GABAergic and glycinergic inputs of inhibitory interneurons and purkinje cells to principal cells of the cerebellar nuclei. *J Neurosci*. 2014;34(28):9418-9431. doi:10.1523/JNEUROSCI.0401-14.2014
44. Capelli P, Pivetta C, Esposito MS, Arber S. Locomotor speed control circuits in the caudal brainstem. *Nat Publ Gr*. 2017;551(7680):373-377. doi:10.1038/nature24064
45. Renshaw B. Central Effects of Centripetal Impulses In Axons Of Spinal Ventral Roots. *J Neurophysiol*. 1946;9(3):191-204.
46. Foster E, Wildner H, Tudeau L, et al. Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron*. 2015;85(6):1289-1304. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.028
47. Da Conceição EPS, Madden CJ, Morrison SF. Glycinergic inhibition of bat sympathetic premotor neurons in rostral raphe pallidus. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312(6):R919-R926. doi:10.1152/ajpregu.00551.2016
48. Feldman CFY and JL. Efferent projections of excitatory and inhibitory preBötzingler Complex neurons Cindy. *J Comp Neurol*. 2018;8(9):1-7. doi:10.1002/cne.24415.Efferent
49. Zhang Z, Zhong P, Hu F, et al. An Excitatory Circuit in the Periocular Motor Midbrain for Non-REM Sleep Control. *Cell*. 2019;177(5):1293-1307.e16.

- doi:10.1016/j.cell.2019.03.041
50. Weber F, Chung S, Beier KT, Xu M, Luo L, Dan Y. Control of REM sleep by ventral medulla GABAergic neurons. *Nature*. 2015;526(7573):435-438.
doi:10.1038/nature14979
 51. Tanaka I, Ezure K, Kondo M. Distribution of glycine transporter 2 mRNA-containing neurons in relation to glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla. *Neurosci Res*. 2003;47(2):139-151. doi:10.1016/S0168-0102(03)00192-5
 52. Tanaka I, Ezure K. Overall distribution of GLYT2 mRNA-containing versus GAD67 mRNA-containing neurons and colocalization of both mRNAs in midbrain, pons, and cerebellum in rats. *Neurosci Res*. 2004;49(2):165-178. doi:10.1016/j.neures.2004.02.007
 53. Hossaini M, Goos JAC, Kohli SK, Holstege JC. Distribution of glycine/GABA neurons in the ventromedial medulla with descending spinal projections and evidence for an ascending glycine/GABA projection. *PLoS One*. 2012;7(4):1-12.
doi:10.1371/journal.pone.0035293
 54. Jouvet M. Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep. *Arch Ital Biol*. 1962;100:125-206.
 55. Fuller PM, Saper CB, Lu J. The pontine REM switch: Past and present. *J Physiol*. 2007;584(3):735-741. doi:10.1113/jphysiol.2007.140160
 56. Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH. The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: A combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci*. 2002;16(10):1959-1973. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02257.x
 57. George R, Haslett WL, Jenden DJ. A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: Induction of paradoxical sleep. *Neuropharmacology*. 1964;3(6):541-552.
doi:10.1016/0028-3908(64)90076-0
 58. Weng FJ, Williams RH, Hawryluk JM, et al. Carbachol excites sublaterodorsal nucleus neurons projecting to the spinal cord. *J Physiol*. 2014;592(7):1601-1617.
doi:10.1113/jphysiol.2013.261800
 59. Clément O, Sapin E, Bérod A, Fort P, Luppi PH. Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep*. 2011;34(4):0-4. doi:10.1093/sleep/34.4.419
 60. Krenzer M, Anaclet C, Vetrivelan R, et al. Brainstem and spinal cord circuitry regulating rem sleep and muscle atonia. *PLoS One*. 2011;6(10):1-10.
doi:10.1371/journal.pone.0024998
 61. Torontali ZA, Fraigne JJ, Sanghera P, et al. The Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Functions to Couple Brain State and Motor Activity during REM Sleep and Wakefulness

- Article The Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Functions to Couple Brain State and Motor Activity during REM Sleep and Wakefulness. *Curr Biol.* 2019;29:1-11. doi:10.1016/j.cub.2019.09.026
62. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci.* 2010;13(1):133-140. doi:10.1038/nn.2467
 63. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Lowell BB. Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron.* 2011;71(1):142-154. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.028
 64. Takeuchi T, Nomura T, Tsujita M, et al. Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(3):953-957. doi:10.1016/S0006-291X(02)00321-2
 65. Menegas W, Bergan JF, Ogawa SK, et al. Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically distinct subclass. *Elife.* 2015;4(AUGUST2015):1-30. doi:10.7554/eLife.10032
 66. Schwarz LA, Miyamichi K, Gao XJ, et al. Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature.* 2015;524(7563):88-92. doi:10.1038/nature14600
 67. Sakurai K, Zhao S, Takatoh J, et al. Capturing and Manipulating Activated Neuronal Ensembles with CANE Delineates a Hypothalamic Social-Fear Circuit. *Neuron.* 2016;92(4):739-753. doi:10.1016/j.neuron.2016.10.015
 68. Osakada F, Callaway EM. Design and generation of recombinant rabies virus vectors. *Nat Protoc.* 2013;8(8):1583-1601. doi:10.1038/nprot.2013.094
 69. Scammell TE, Willie JT, Guilleminault C, Siegel JM. A Consensus Definition of Cataplexy in Mouse Models of Narcolepsy. *Sleep.* 2009;32(1):111-116. doi:10.5665/sleep/32.1.111
 70. Franklin KBJ, G P. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.*; 2001.
 71. Weber F, Hoang Do JP, Chung S, et al. Regulation of REM and Non-REM Sleep by Periaqueductal GABAergic Neurons. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-13. doi:10.1038/s41467-017-02765-w
 72. Erickson ETM, Ferrari LL, Gompf HS, Anacleto C. Differential Role of Pontomedullary Glutamatergic Neuronal Populations in Sleep-Wake Control. *Front Neurosci.* 2019;13(July):1-16. doi:10.3389/fnins.2019.00755
 73. O'Brien JA, Berger AJ. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol.* 1999;82(3):1638-1641. doi:10.1152/jn.1999.82.3.1638
 74. Goulding M. Circuits controlling vertebrate locomotion: Moving in a new direction. *Nat*

- Rev Neurosci.* 2009;10(7):507-518. doi:10.1038/nrn2608
75. Stanek IV E, Cheng S, Takatoh J, Han BX, Wang F. Monosynaptic premotor circuit tracing reveals neural substrates for oro-motor coordination. *Elife.* 2014;2014(3):1-23. doi:10.7554/eLife.02511
 76. Scammell TE, Arrigoni E, Lipton JO. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron.* 2017;93(4):747-765. doi:10.1016/j.neuron.2017.01.014
 77. Sakai K. Paradoxical (rapid eye movement) sleep-on neurons in the laterodorsal pontine tegmentum in mice. *Neuroscience.* 2015;310:455-471. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.09.063
 78. Oishi Y, Williams RH, Agostinelli L, et al. Role of the medial prefrontal cortex in cataplexy. *J Neurosci.* 2013;33(23):9743-9751. doi:10.1523/JNEUROSCI.0499-13.2013
 79. Gutierrez Herrera C, Girard F, Bilella A, et al. Neurons in the Nucleus papilio contribute to the control of eye movements during REM sleep. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-11. doi:10.1038/s41467-019-13217-y
 80. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature.* 2006;441(7093):589-594. doi:10.1038/nature04767
 81. Siegel JM, Nienhuis R, Fahringer HM, et al. Neuronal activity in narcolepsy: Identification of cataplexy-related cells in the medial medulla. *Science (80-).* 1991;252(5010):1315-1318. doi:10.1126/science.1925546
 82. Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature.* 1992;359(October):832-835.
 83. Zhong P, Zhang Z, Barger Z, et al. Control of Non-REM Sleep by Midbrain Neurotensinergic Neurons. *Neuron.* 2019;104(4):795-809.e6. doi:10.1016/j.neuron.2019.08.026
 84. Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, et al. Developmental switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. *Nat Neurosci.* 2004;7(1):17-23. doi:10.1038/nn1170
 85. Hirrlinger J, Marx G, Besser S, et al. GABA-Glycine Cotransmitting Neurons in the Ventrolateral Medulla: Development and Functional Relevance for Breathing. *Front Cell Neurosci.* 2019;13(November):1-14. doi:10.3389/fncel.2019.00517
 86. Jellinger KA. A critical evaluation of current staging of α -synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2009;1792(7):730-740. doi:10.1016/j.bbadis.2008.07.006
 87. Partinen M, Saarenpää-Heikkilä O, Ilveskoski I, et al. Increased incidence and clinical picture of childhood narcolepsy following the 2009 H1N1 pandemic vaccination

- campaign in Finland. *PLoS One*. 2012;7(3):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0033723
88. Antelmi E, Pizza F, Donadio V, et al. Biomarkers for REM sleep behavior disorder in idiopathic and narcoleptic patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(9):1872-1876. doi:10.1002/acn3.50833
89. Cipolli C, Franceschini C, Mattarozzi K, Mazzetti M, Plazzi G. Overnight distribution and motor characteristics of REM sleep behaviour disorder episodes in patients with narcolepsy-cataplexy. *Sleep Med*. 2011;12(7):635-640. doi:10.1016/j.sleep.2010.12.016
90. Vaňková J, Nevšimalová S, Šonka K, Špačková N, Švejdová-Blažejová K. Increased REM density in narcolepsy-cataplexy and the polysymptomatic form of idiopathic hypersomnia. *Sleep*. 2001;24(6):707-711. doi:10.1093/sleep/24.6.707
91. Maquet P, Peters JM, Aerts J, et al. Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature*. 1996;383(6596):163-166. doi:10.1038/383163a0
92. Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. *J Comp Neurol*. 1991;303(1):121-131. doi:10.1002/cne.903030111
93. Oka T, Tsumori T, Yokota S, Yasui Y. Neuroanatomical and neurochemical organization of projections from the central amygdaloid nucleus to the nucleus retroambiguus via the periaqueductal gray in the rat. *Neurosci Res*. 2008;62(4):286-298. doi:10.1016/j.neures.2008.10.004
94. Tovote P, Esposito MS, Botta P, et al. Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature*. 2016;534(7606):206-212. doi:10.1038/nature17996
95. Han W, Tellez LA, Rangel MJ, et al. Integrated Control of Predatory Hunting by the Central Nucleus of the Amygdala. *Cell*. 2017;168(1-2):311-324.e18. doi:10.1016/j.cell.2016.12.027
96. Sakurai T. The role of orexin in motivated behaviours. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(11):719-731. doi:10.1038/nrn3837
97. Velazquez-Moctezuma J, Shalauta M, Christian Gillin J, Shiromani PJ. Cholinergic antagonists and REM sleep generation. *Brain Res*. 1991;543(1):175-179. doi:10.1016/0006-8993(91)91064-8
98. Van Dort CJ, Zachs DP, Kenny JD, et al. Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(2):584-589. doi:10.1073/pnas.1423136112
99. Peever J, Fuller PM. Neuroscience: A Distributed Neural Network Controls REM Sleep. *Curr Biol*. 2016;26(1):R34-R35. doi:10.1016/j.cub.2015.11.011