

令和元年6月21日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01393

研究課題名(和文) 除皮質灌流標本を用いた呼吸/循環と歩行の間の自律機能のメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of autonomous function between the brainstem and the spinal cord with using a decerebrated and arterially perfused in situ preparation

研究代表者

矢澤 格 (Yazawa, Itaru)

星薬科大学・先端生命科学研究所・客員研究員

研究者番号：40360656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：諸事情により人工血液を導入した新灌流標本システムの完成には至らなかった。ここでは、研究課題に並行して行った研究の一つである「中枢神経系ネットワークによる機能形成に対するミクログリアの関与」を報告する。ミクログリアは中枢神経系のネットワークの形態形成に生涯関与することは知られている。そこで、Interferon Regulatory Factor 8に関連したミクログリアが欠損したマウスに現行の灌流システムを適用し、LPGを構成する下位脊髄神経回路網から産生される出力の生後変化を電気生理学的に調べた。その結果、このミクログリアの欠損により脊髄神経回路網の機能の成熟が阻害される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果の学術的意義は、生後間もない時期～成体期の齧歯類に本方法論が適用できることから本方法論を用いてさまざまな分野の研究活動が行えること、IRF8に関連するミクログリアの欠損が下位脊髄神経回路網で産生される運動機能の成熟を阻害する可能性があること、今回の研究で使用した遺伝子改変動物は慢性骨髄性白血病の疾患モデルであることから慢性骨髄性白血病患者の下位脊髄神経回路網から産生される機能が未成熟である可能性があること、などが挙げられる。社会的意義は、免疫不全により中枢神経障害や運動障害が引き起こされる可能性があるため、まずは、免疫と神経には関連性があることが認知されることである。

研究成果の概要(英文)：Due to various reasons, it did not lead the completion a new perfusion system in which artificial blood was introduced to the perfused preparation. However, here, we report “involvement of microglia in the formation of functions produced by neural networks in the central nervous system (CNS)” which is one of the studies conducted in parallel with the research subjects.

It is known that microglia are poised to play important roles in shaping the developing CNS and contributing to overall nervous system function through a lifetime. We applied the current perfusion system to mice lacking microglia associated with interferon regulatory factor 8 and electrophysiologically examined postnatal changes in neural output generated from the neural network of the lower spinal cord that constitutes LPG. As a result, it was shown that this microglial defect might inhibit the normal maturation of the function generated by the neural network of the lower spinal cord constituting LPG.

研究分野：自律神経系、生理学

キーワード：Autonomous function Perfused preparation Spinal cord Locomotion Brainstem Respiration Microglia

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、自身が開発した”Decerebrate and arterially perfused *in situ* preparation (= 灌流標本)”を齧歯類に適用し、脳幹と脊髄の間で生じる機能的相互作用について研究を行ってきた。なお、体重が約6g以上の齧歯類であればこの方法論の適用は可能である。その結果、以下に記載した”**脳幹と脊髄の間の相補的・機能的な相互作用**”を見出した。①標本を過呼吸状態(= a hyperoxic/normocapnic state)に曝し交感神経トーンを変調させると、この交感神経トーンは脊髄下向路を介して頸髄や腰仙髄の **Forelimb Pattern Generator(FPG)**や **Locomotor Pattern Generator(LPG)** \*を活性化し、上・下肢に自発的に歩行様活動を産生する、②上・下肢の歩行様活動時には、活性化した **LPG** と **FPG** からのインパルスが脊髄上向路を介して脳幹(呼吸/循環中枢や三叉神経系)に影響を及ぼし、一過性に呼吸数上昇や血圧上昇を引き起こす、と同時に歩行リズムに同期した開口運動(= 安静時は吸気時に開口運動、歩行運動時は吸気と呼気時に開口運動)を引き起こすことを示した(= **Spinal feedback メカニズム**)。これらの知見は、**“脳血管疾患による運動機能障害を持った患者に対する睡眠時/無意識下での高圧酸素療法の治療的意義、および、廃用症候群の予防や改善”**を裏付けるものである。

本研究は、灌流標本を用いて”**脳幹と脊髄の間の自律機能**”のメカニズムに関連する中枢神経系の機能的解析を行い、脊髄や脳幹の研究領域に対し新たな研究の方向性を示すと同時に、このメカニズムを利用したリハビリテーション医学の展開に寄与するために企画された。

\*FPGとLPGは、それぞれ上位と下位の脊髄に存在する左右の交互活動の産生に必要な神経ネットワーク/システムと概念的に考えられている。

### 2. 研究の目的

上記知見は通常体温(37°C)ではなく超低体温下(26°C)で得られたものであるため、通常体温の生体でこの”**脳幹と脊髄の間の自律機能**”が引き起こされる生理条件は今のところ不明である。また、現行の灌流システムで使用している灌流液は、主に血漿成分からなる灌流液に酸素/二酸化炭素ガスを溶解させたものである。この灌流液は、ヘモグロビンに比べ酸素運搬能が低い。そのため、標本を長時間管理するためには単位時間当たりの灌流流量を高く設定する必要がある。その結果、時間経過と共に標本の全身性浮腫が進行し標本の活きが悪くなる、外因性光学的イメージングで用いる色素の染まりの悪さなど、今後研究を展開していく上で改善すべき点が多くある。

本研究では、(1)上記の問題点を解消するために優れた酸素運搬能を有する人工血液を現行の灌流標本に導入し、単位時間当たりの灌流流量を減らして標本の管理を行い、全身性浮腫の軽減と生体と同じ体温下で実験を行うことができる「人工血液を導入した新しい除皮質全身灌流標本システム」を作成すること、(2)”**脳幹と脊髄の間の自律機能**”が引き起こされる生理条件を電気生理学的解析で見出すこと、(3)この”**脳幹と脊髄の間の自律機能**”に関連する中枢神経系を光学的解析によって可視化すること、を主たる目的とした。

しかし、以前使用した **Biopure** 社以外の人工血液の研究計画が諸事情により進まなかったため、本研究と並行して **developing cord** や **en-broc** 標本を用いた脊髄や脳幹(呼吸中枢)のリズム産生に関する基礎研究、灌流標本を用いた脊髄神経回路網の生後発達変化におけるグリア細胞の役割や呼吸中枢の薬物に対する効果などの電気生理学的・光学的解析を行った。

### 3. 研究の方法

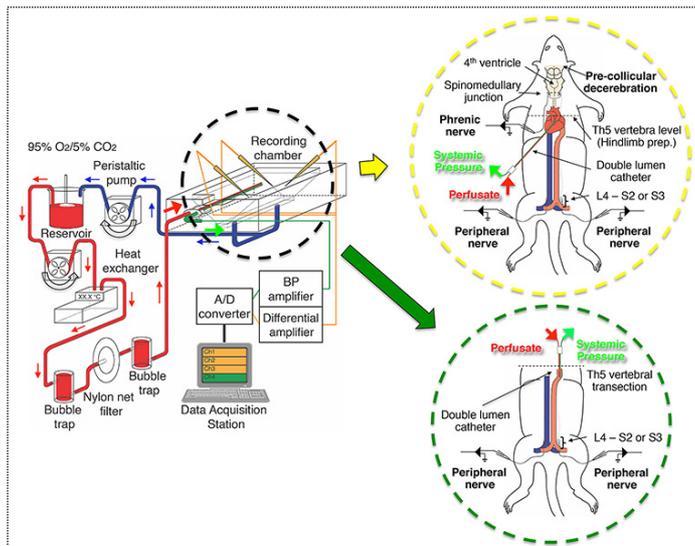


図1：灌流回路(左)と灌流標本(右上：除皮質灌流標本、右下 hindlimb 標本)を示す。

灌流標本を用いた研究方法についてのみ記載する。

左図に示すように、齧歯類から灌流標本(除皮質灌流標本、あるいは hindlimb 標本)を作成し、体外循環法を適用して標本を管理した。吸気活動の指標として横隔神経から細胞外記録によって神経活動を導出した。心臓血管中枢(循環中枢)の活動指標として血圧を活動指標とした。下肢の歩行様活動は左右腓骨神経、左右脛骨神経のいずれかから細胞外記録によって神経活動を導出した。

### 4. 研究成果

ここでは、以下の研究成果を記載する。

- 脊髄神経回路網の生後発達変化におけるグリア細胞の役割について：  
慢性骨髄性白血病のモデル動物である翻訳因子 **Interferon Regulatory Factor 8** が欠損した **IRF8-related microglial cell** が機能していない **IRF8 KO** 成体マウス(P11~12週令)の下位脊髄神経回路網(LPGを構成する神経回路網)の機能が正常発達しているかどうかを調査した。

まず、正常に生後発達をした下位脊髄神経回路網から産生される神経活動を調べた。

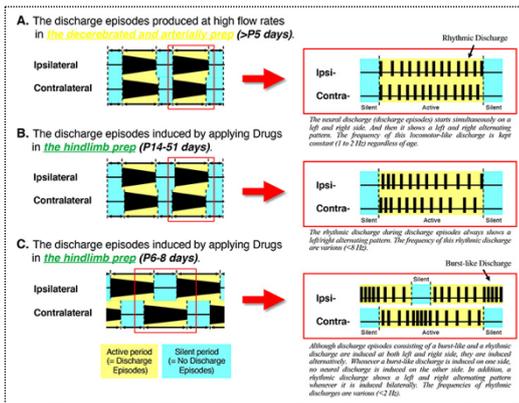
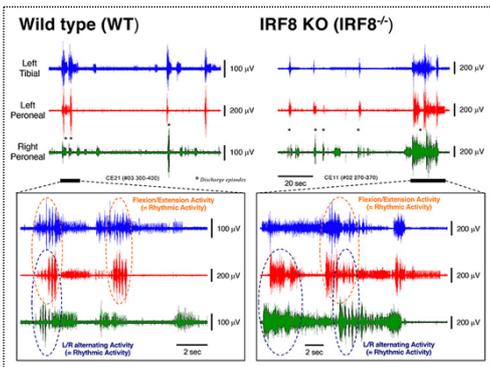


図2：下位脊髄神経回路網で産生され、左右の末梢神経から細胞外記録によって導出される discharge episode のパターンを正常な生後発達変化(左)と、discharge episode 内の神経活動(右)の典型例の模式図を示す。**A**：自発的に歩行様活動を誘発させるために毎分の灌流量を高値に設定し、生後5日以上のマウスから作成された除皮質灌流標本で得られたもの、**B**：歩行様活動を誘発させるためにセロトニン、NMDA、ノルアドレナリン(あるいはドーパミン)を生後14~51日目のマウスから作成された hindlimb 標本に適用して得られたもの、**C**：Bと同様の薬剤を生後6~8日目のマウスから作成された hindlimb 標本に適用して得られたもの、を示す。

Hyperoxia/normocapnea によって引き起こされる除皮質灌流標本の discharge episode は、変調した交感神経トーンが脊髄下向路を介して下位脊髄にある LPG を活性化し、その結果、産生された神経活動である。この discharge episode は、マウスの週令に関係なく左右の末梢神経からほぼ同時に導出されたのちに静止するパターンが繰り返され、そして discharge episode 内ではリズムカルな放電活動(歩行様活動)が誘発されることがわかった。薬剤の投与によって LPG を活性化した結果、引き起こされる Hindlimb 標本の神経活動では、生後14~51日目の下位脊髄神経回路網から誘発される discharge episode は、除皮質灌流標本で得られた結果と同じように左右両側でほぼ同時に起こったのちに静止するパターンが繰り返されるが、生後6~8日令では左右交互に起こることがわかった。また、Hindlimb 標本の薬剤の投与によって誘発される discharge episode 内の神経活動は、いずれもリズムカルな放電活動(歩行様活動)が誘発されることがわかった。

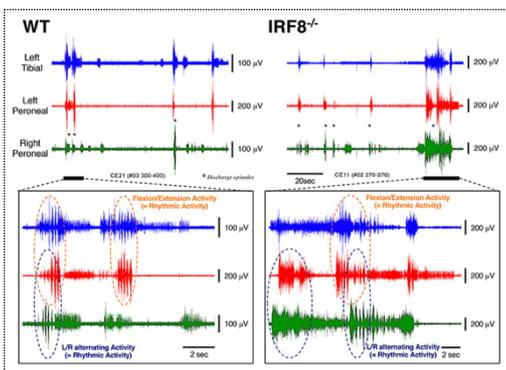
成体の野生型と IRF8 KO マウスから作成された除皮質灌流標本の下位脊髄神経回路網から産生される discharge episode のパターンと discharge episode 内の神経活動を調べた。



野生型と IRF8 KO マウスから作成された標本で産生された discharge episode 内の神経活動から、左右交互運動や屈伸運動は保持されていた。しかし、IRF8 KO マウスの discharge episode パターンは生後6~8日目の正常な下位脊髄神経回路網で産生されるパターンと類似していた。

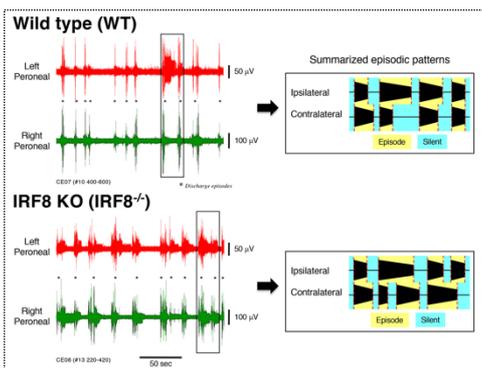
図3：成体の野生型(左)と IRF8 ノックアウトマウス(右)から作成された除皮質灌流標本の左脛骨神経、左右腓骨神経から細胞外記録により導出された神経活動の例を示す。

成体の野生型と IRF8 KO マウスから作成された Hindlimb 標本の下位脊髄神経回路網から薬剤投与によって誘発される discharge episode のパターンと discharge episode 内の神経活動を調べた。



野生型と IRF8 KO マウスから作成された標本で産生された discharge episode 内の神経活動から、左右交互運動や屈伸運動は保持されていた。しかし、IRF8 KO マウスの discharge episode パターンは生後6~8日目の正常な下位脊髄神経回路網で産生されるパターンと類似していた。

図4：成体の野生型(左)と IRF8 ノックアウトマウス(右)からなる hindlimb 標本に歩行様活動を誘発させるためにセロトニン、NMDA、ノルアドレナリンを適用し、左脛骨神経、左右腓骨神経から細胞外記録により導出された神経活動の典型例を示す。



IRF8 KO マウスで産生される神経活動は、正常な生後6~8日目の下位脊髄神経回路網で産生されるパターンが混在していた。

図5：成体の野生型(左)と IRF8 ノックアウトマウス(右)から作成された除皮質灌流標本の左右腓骨神経から細胞外記録により導出された discharge episode(左)と discharge episode のパターン(右)の例を示す。

以上から、IRF8-related microglia の欠損によって正常な LPG を構成する脊髄神経回路網による機能の成熟が阻害される可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) S. Kotani, I. Yazawa, H. Onimaru, M. Izumizaki. An aromatic substance, eugenol induces distinct depressant effects on respiratory activity in different postnatal development stages of the rat. *Neuroscience Research* (査読有り) *in press*  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.06.001>
- (2) I. Yazawa. A study on functional interactions between the CNS using a decerebrated & artificially perfused *in situ* preparation. *J. Neurology and Neurophysiology* (査読有り) **10**, 2019, 33.  
DOI: 10.4172/2155-9562-C2-100
- (3) M. Tani, I. Yazawa, K. Ikeda, K. Kawakami, H. Onimaru. Long-lasting facilitation of respiratory rhythm by treatment with TRPA1 agonist, cinnamaldehyde. *J. Neurophysiology* (査読有り) **114**, 2015, 989-998.  
DOI: 10.1152/jn.00282.2105

[学会発表] (計 18 件)

- (1) I. Yazawa, Y. Yoshida, R. Yoshimi, M. O'Donovan, K. Ozato. Immature network function of the adult lumbosacral cord by loss of interferon regulatory factor 8 (IRF8).  
The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (Kobe, Japan) 2019/03/28~31
- (2) Y. Okada, I. Yazawa, K. Takeda, S. Okazaki, M. Uchiyama, Y. Kurita, I. Fukushi, S. Yokota, Y. Mori, H. Onimaru. Symposium: "Adaptation mechanisms to external or internal environmental changes of respiratory system" Hypoxic responses of the respiratory system.  
The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (Kobe, Japan) 2019/03/28~31  
Society for Neuroscience 2015 Annual Meeting (Chicago, USA) 2015/10/17~21
- (3) I. Fukushi, Y. Kono, K. Takeda, S. Okazaki, S. Yokota, I. Yazawa, H. Onimaru, Y. Okada. Astrocytes mediate persistent respiratory augmentation in the recovery phase after hypoxic exposure.  
The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (Kobe, Japan) 2019/03/28~31
- (4) I. Yazawa. Symposium: "Exploring the new innovations in the field of Neurology" A study on functional interactions between the CNS using a decerebrated & artificially perfused *in situ* preparation.  
23rd International Conference on Neurology & Neurophysiology & 24th International Conference on Neurology and Neuroscience (Edinburgh, Scotland) 2019/03/18~19 (招待講演)
- (5) I. Fukushi, M. Uchiyama, Y. Kurita, I. Yazawa, S. Okazaki, Y. Kono, K. Takeda, H. Onimaru, Y. Mori, Y. Okada. Astrocytic activation is necessary for hypoxic respiratory facilitation.  
Asian Pacific Society of Respirology (Taipei, Taiwan) 2018/11/29~12/2
- (6) I. Fukushi, M. Uchiyama, Y. Kurita, I. Yazawa, S. Okazaki, Y. Hasebe, Y. Kono, S. Yokota, K. Takeda, Y. Mori, H. Onimaru, Y. Okada. Significance of astrocytic activation in hypoxic respiratory responsiveness in the *in vitro* medulla-spinal cord preparation of the newborn rat.  
Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting (San Diego, USA) 2018/11/3~7
- (7) C. Vivar, I. Yazawa, I. Fukushi, S. Okazaki, Y. Okada. A computational approach for understanding the role of astrocytes in neuronal firing pattern modulation in the pre-Bötzinger Complex during hypoxia.  
第41回日本神経科学学会大会 (神戸) 2018/07/26~29
- (8) I. Fukushi, Y. Kohno, S. Yokota, K. Takeda, S. Okazaki, I. Yazawa, H. Onimaru, Y. Okada. The role of the diencephalon in the central control of respiration investigated with the isolated diencephalon-lower brainstem-spinal cord preparation.  
第41回日本神経科学学会大会 (神戸) 2018/07/26~29
- (9) Y. Okada, I. Yazawa, K. Takeda, S. Okazaki, M. Uchiyama, I. Fukushi, S. Yokota, Y. Mori, M. Pokorski, H. Onimaru. Symposium: "Protective mechanisms against hypoxia: from molecules to whole body" Central mechanism of hypoxic respiratory regulation.  
第95回日本生理学会大会 (高松) 2018/03/28~30
- (10) I. Yazawa, S. Okazaki, I. Fukushi, Y. Kono, K. Takeda, S. Yokota, H. Onimaru, Y. Okada. Rhythmic activity of astrocytes synchronized with alternating motor output during fictive locomotion.  
Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting (Washington DC, USA) 2017/11/11~15
- (11) Y. Okada, I. Yazawa, S. Okazaki, S. Yokota, K. Takeda, H. Someya, Y. Tamura, H. Onimaru. Symposium: "Rhythm and pattern generation II" Respiratory modulation of astrocytes in the ventrolateral medulla of the isolated brainstem-spinal cord of the neonatal rat.  
The 14th Oxford Breathing Meeting (Oxford, UK) 2017/09/17~21
- (12) S. Okazaki, Y. Mikami, I. Yazawa, K. Takeda, H. Onimaru, Y. Okada. Astrocytic and neuronal rhythmic activities synchronized with locomotor-like motor output: calcium imaging in the lumbar cord of neonatal rat.  
第40回日本神経科学学会大会 (幕張) 2016/07/20~23
- (13) Y. Okada, I. Yazawa, K. Takeda, S. Okazaki, Y. Tamura, H. Onimaru. Respiratory activities of medullary neurons and astrocytes in the isolated brainstem-spinal cord analyzed by Ca imaging.  
第94回日本生理学会大会 (浜松) 2016/03/28~30

- (14) S. Okazaki, H. Mikami, I. Yazawa, K. Takeda, H. Onimaru, Y. Okada. Detecting causal influences among the locomotion-like cellular Ca & output neural activities in the lumbar spinal cord using state-space modeling.  
第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2016/03/28~30
- (15) Y. Okada, I. Yazawa, K. Takeda, S. Okazaki, Y. Tamura, H. Onimaru. Symposium: “Multi-level understanding of the respiratory neuron network function: from microcircuit in medullary slices to freely moving conscious animals” Respiratory activities of medullary neurons and astrocytes in the isolated brainstem-spinal cord analyzed by Ca imaging.  
第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2016/03/28~30
- (16) I. Yazawa. Symposium: “Multi-level understanding of the respiratory neuron network function: from microcircuit in medullary slices to freely moving conscious animals” A decerebrates & artificially perfused *in situ* preparation for the study of respiratory neuron network.  
第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2016/03/28~30 (招待講演)
- (17) Y. Okada, Y. Oku, T. Sasaki, C. Vivar, S. Yokota, K. Takeda, I. Fukushi, I. Yazawa, H. Someya, Y. Tamura. A novel model of respiratory rhythm generation: a mechanism by interaction of intrinsically oscillating astrocytes and neurons.  
Society for Neuroscience 2015 Annual Meeting (Chicago, USA) 2015/10/17~21
- (18) I. Yazawa. Reciprocal functional interactions between the respiration/circulation center, the upper spinal cord, and the trigeminal system.  
第 38 回日本神経科学学会大会 (神戸) 2015/07/28~31

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：塩田清二  
ローマ字氏名：Shioda, Seiji  
所属研究機関名：星薬科大学  
部局名：先端生命科学研究所  
職名：教授  
研究者番号 (8 桁)：80102375

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。