

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03151

研究課題名(和文) 運動時の交感神経活性を担う中枢回路の解明：遺伝子導入を用いた先端技術の活用

研究課題名(英文) Central circuitries underlying sympathetic adjustments to exercise

研究代表者

木場 智史 (Koba, Satoshi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40565743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：運動時交感神経活性の脳メカニズムの解明を目指した。中脳 延髄の中枢経路を同定した。この経路は運動興奮性であり、延髄でのグルタミン酸放出を介して運動・交感神経活性を、さらに歩行・循環反応生成能を持つことを示した。さらに、歩行時の四肢の運動制御・循環反応の生成に必要であることも見出した。中脳 延髄経路はセントラルコマンドの中枢回路の一端であると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

19世紀末には議論されていた運動時交感神経活性の脳メカニズムは、現在も未解明である。運動発現のために生じる脳活性(セントラルコマンド, CC)は自律神経系も制御すると考えられる。本研究では遺伝子工学を用いた先端技術を融合させたin vivo生理実験から、CCの脳内回路の一端を解明した。本成果は、古典課題「運動時交感神経活性の脳メカニズムの解明」を解決へと導くだけでなく、Exercise is medicineの根幹メカニズムの解明にも資する。

研究成果の概要(英文)：The results showed that midbrain neurons projecting the medulla, that are excited by exercise, are capable of eliciting locomotor and cardiovascular responses via sympatho-motor activation. Further, these neurons were required for fine regulation of motor coordination and autonomic cardiovascular adjustments during locomotor exercise. The study demonstrated a part of central circuitries for central command.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：セントラルコマンド 光遺伝学 交感神経系 運動神経系 中脳 延髄 歩行 血圧

1. 研究開始当初の背景

運動時交感神経活性の根源は脳にある。脳がどのように作動して運動時交感神経活性を引き起こすかは、19世紀末以来の運動生理学における未解決課題である [Johansson, *Scand Arch Physiol*, 1893]。にも関わらず、現在でも未解決である。運動発現のために高位中枢より生じる神経信号(セントラルコマンド, CC)は、交感神経活性も引き起こす。研究代表者は、交感神経プレモータ神経を多く含み、また CC によって興奮する延髄吻側腹外側野 (RVLM) が、交感神経活性を担うことを明らかにしていた (Koba et al. *J Physiol* 2014; Kumada, Koba et al., *Auton Neurosci*, 2017)。ただし運動時交感神経活性は全ての神経回路が保たれた脳が担う生命現象であり、個々の脳部位が独立に担うわけではない。すなわち運動時交感神経活性を担う脳メカニズムを理解するには、CC が下降して交感神経に至るまでの中枢回路の情報は必要である。しかし、中枢回路の研究自体がない。

そこで本研究では運動時交感神経活性の脳メカニズムを科学の言葉で明文化することを目指し、CC の中枢回路を解明する。運動時において RVLM 神経の興奮性を制御する上位脳領域を探索し、その投射経路による CC 機能生成における役割を調査する。

2. 研究の目的

RVLM を制御する上位脳領域 X の探索、および X→RVLM 経路の機能解明

3. 研究の方法

ラット脳に対する神経トレーサ実験・組織学的解析、ラット *in vivo* 生体信号記録、光遺伝学、行動解析、等の実験生物学的手法を駆使し、上記目的の達成を目指した。具体的な実験手順は、「4. 研究成果」内に結果とともに記した。

4. 研究成果

まず、ラット RVLM に逆行性神経トレーサであるコレラ毒素サブユニット b (CTb, 蛍光色素 Alexa 共役) を注入し、蛍光標識された神経細胞体を全脳調査した。本研究では中脳楔状核・脚橋被蓋野 (cnf/PPTg) において蛍光標識された細胞体の存在を確認し、この領域を研究対象とした。興味深いことに、PPTg は多数のコリン作動性神経を含有するにも関わらず、Alexa 共役の CTb 陽性細胞とコリン作動性神経とはほとんど一致しないことを組織学的に確認した。これらの結果から、cnf/PPTg から RVLM へは投射神経が存在し、それらはコリン作動性ではないと考えられた。この結果を追試するために、ラット cnf/PPTg にレポータータンパク質 tdTomato を発現させる順行性アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を注入し、RVLM を含む脳組織を組織学的に解析した。RVLM において検出された cnf/PPTg からの tdTomato 陽性軸索ブートンには小胞性グルタミン酸輸送体 2 が発現しており、またそのブートンはアドレナリン作動性 RVLM C1 神経と近接することを見出した。すなわち、中脳から延髄へのグルタミン酸作動性の神経投射の存在を示した。

次に、この中脳→延髄経路は随意運動によって活性化するかを検証した。ラット RVLM に GFP を発現させる逆行性 AAV を注入した。随意的にトレッドミル走行を行うようにそれらのラットを 2~3 週間トレーニングした。実験日には随意的トレッドミル走行を 40 分行わせ、その後直ちに抜脳した。免疫染色法によって cnf/PPTg 領域にある GFP 陽性神経における Fos タンパク質 (神経興奮マーカー) の発現を可視化し、定量評価した。非運動対照ラット群と比較して運動群では、GFP 陽性細胞における Fos 発現が三倍程度上昇することを見出した【図 1】。すなわち、この中脳→延髄経路は随意走行によって活性化すること示した。

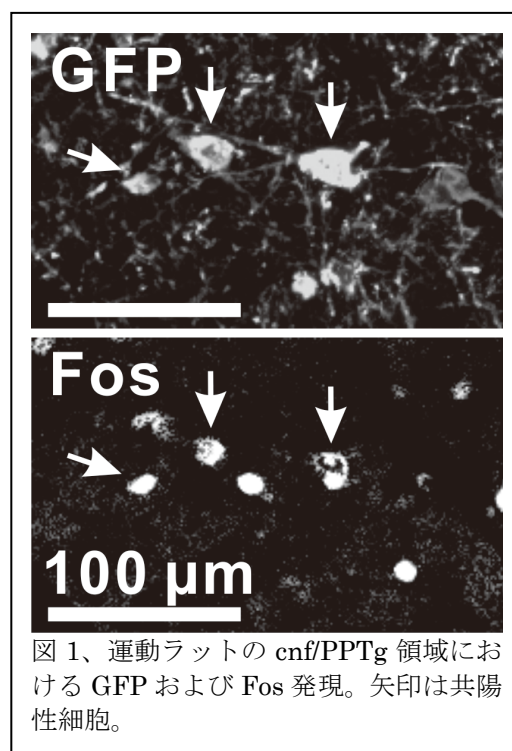


図 1、運動ラットの cnf/PPTg 領域における GFP および Fos 発現。矢印は共陽性細胞。

この中脳→延髄経路による交感神経活性能を調査した。光遺伝学を用いてこの経路を選択的に刺激した際の腎交感神経活動を観察したところ、有意な活性反応が引き起こされた。RVLMにAMPA/NMDA受容体阻害薬を局所注入することで、この腎交感神経活性が抑制された。すなわち、この中脳→延髄経路はグルタミン酸を放出することによって交感神経活性を引き起こすことを示した。

CCは交感神経系と運動神経系の両方の活性を引き起こすとされる。そこでこの中脳→延髄経路による運動神経活性能も調査した。除脳ラットの中脳→延髄経路を選択的に光遺伝学刺激したところ、腎交感神経活性だけでなく腰髄前根神経(交感神経節前線維を含まない)の電気活動も上昇した【図2】。さらにRVLMにAMPA/NMDA受容体阻害薬の局所注入は、腰髄前根神経活性も抑制した。これらの結果から、この中脳→延髄経路はグルタミン酸を放出することによって交感神経活性および運動神経活性を引き起こす、すなわちCC機能の生成能がある、ことを示した。

以上の結果を踏まえ「この中脳→延髄経路は歩行および昇圧・頻脈応答の生成能を持つ」との仮説を立て、検証した。この中脳→延髄経路を光遺伝学刺激するためにラット脳に逆行性AAVを注入、光ファイバを留置し、また覚醒下で動脈圧・心拍数を無線記録するためにラット腹腔内にKaha社テレメトリ送信器を留置した。そして外径1.4メートル、内径1メートルの円形トラックフィールド内に設置した。覚醒・自由行動ラットの中脳→延髄経路を光遺伝学刺激すると、歩行および昇圧・頻脈応答が生成された【図3】。すなわち、この中脳→延髄経路は歩行運動時のCCを機能生成するのに十分であることを示した。

最後に、随意走行中の歩行制御・循環制御に対する中脳→延髄経路の活性抑制の影響を調査した。この中脳→延髄経路を光遺伝学抑制するため、Cre/loxp系を用いて青光感受性陰イオンチャンネル*iCholc*を発現させるための順行性・逆行性AAVをラット脳に注入し、また光ファイバを留置した。ラット腹腔内に動脈圧測定のためのテレメトリ送信器を留置した。ケージ内に設置した水平ホイールを随意走行しているラットの中脳→延髄経路を光遺伝学抑制すると、歩行が抑制され動脈圧が低下した。この降圧作用は、非運動時には認められなかった。すなわち、中脳→延髄経路は歩行運動時のCCを機能生成するのに必要であることを示した。

以上の結果より、グルタミン酸作動性のcnf/PPTgからRVLMへの投射経路は、歩行運動のために発生するCCの中枢回路の一端であると結論した。歩行運動中の交感神経活性だけでなく、四肢の運動制御にも、この中枢経路が重要な役割を果たすと考えられる。

本計画の成果を受け、CCの中枢回路の全貌解明を目指し、本研究の調査対象としたcnf/PPTgを制御する上位脳領域の探索も行った。いくつかの脳領域に着目し、CC機能を生成し得ることを予備的に見出している。今後はcnf/PPTgからRVLMへの投射経路の上位脳領域を精査し、将来的にはCCの発生脳領域および発生メカニズムの全貌解明研究を目指す。

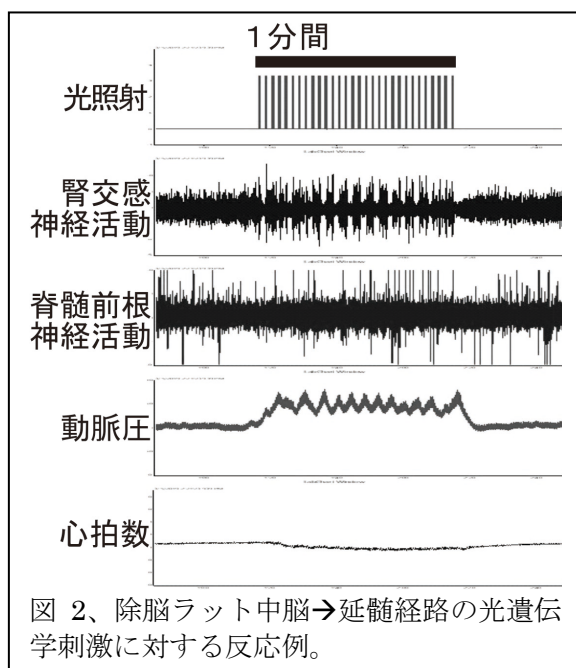


図2、除脳ラット中脳→延髄経路の光遺伝学刺激に対する反応例。

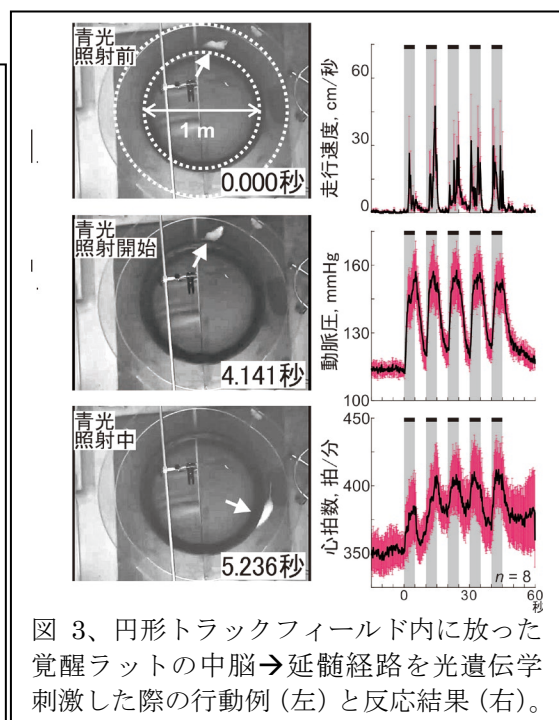


図3、円形トラックフィールド内に放った覚醒ラットの中脳→延髄経路を光遺伝学刺激した際の行動例(左)と反応結果(右)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koba Satoshi, Hisatome Ichiro, Watanabe Tatsuo	4. 巻 69
2. 論文標題 Augmented fear bradycardia in rats with heart failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 875 ~ 883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-019-00698-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koba Satoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Angiotensin II, Oxidative Stress, and Sympathetic Nervous System Hyperactivity in Heart Failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Yonago Acta Medica	6. 最初と最後の頁 103 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2018.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koba Satoshi, Hanai Eri, Kumada Nao, Kataoka Naoya, Nakamura Kazuhiro, Watanabe Tatsuo	4. 巻 596
2. 論文標題 Sympathoexcitation by hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4581 ~ 4595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP276223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koba Satoshi, Hanai Eri, Kumada Nao, Watanabe Tatsuo	4. 巻 319
2. 論文標題 Sympathoexcitatory input from hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to rostral ventrolateral medulla is enhanced after myocardial infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H1197 ~ H1207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00273.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木場 智史、奈良井 絵美	4. 巻 58
2. 論文標題 セントラルコマンド機能を生成する脳幹神経回路	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 101 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32272/ans.58.1_101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木場 智史	4. 巻 70
2. 論文標題 痛みの働き	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 体育の科学	6. 最初と最後の頁 704~708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Satoshi Koba, Nao Kumada
2. 発表標題 Sympathetic and motor activation by midbrain neurons projecting to the ventral medulla
3. 学会等名 11th congress of the international society for autonomic neuroscience、米国ロスアンゼルス市 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 交感神経の制御基盤：光遺伝学を用いた中枢回路の解明
3. 学会等名 Summer Conference of Autonomic Cardiology、福岡県福岡市 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 セントラルコマンド機能を生成する脳幹神経と神経伝達物質
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会、茨城県つくば市（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 セントラルコマンド機能を生成する脳幹神経の存在
3. 学会等名 第72回自律神経学会総会、福岡県北九州市（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe
2. 発表標題 Effect of ionotropic glutamate receptor blockade in rat RVLM on sympathomotor activation by mesencephalic locomotor neurons projecting to the RVLM
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会、大分県別府市（コロナ禍により誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yui Yamane, Tatsuo Watanabe, Satoshi Koba
2. 発表標題 Fos expression in rat MLR neurons projecting to the RVLM following the voluntary treadmill exercise
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会、大分県別府市（コロナ禍により誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri Hanai, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe, Satoshi Koba
2. 発表標題 Sympathetic nerve response to optogenetic inhibition of PVN-RVLM neurons in anesthetized rats with heart failure
3. 学会等名 Experimental Biology 2018、米国サンディエゴ市（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Koba, Nao Kumada, Eri Hanai, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe
2. 発表標題 Sympathoexcitatory role for neurons projecting from the MLR to the RVLM in rats
3. 学会等名 Experimental Biology 2018、米国サンディエゴ市（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木場智史、熊田奈桜、花井映里、渡邊達生
2. 発表標題 ラット中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野への投射神経の光遺伝学刺激による交感神経活性
3. 学会等名 第73回日体力医学会大会、福井県福井市
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊田奈桜、木場智史、花井映里、渡邊達生
2. 発表標題 ラット中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野への投射神経による交感神経調節
3. 学会等名 第70回日本生理学会中国四国地方会、愛媛県松山市
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊田奈桜、木場智史
2. 発表標題 セントラルコマンドの中樞回路：中脳から延髄への投射神経
3. 学会等名 第46回自律神経生理研究会、東京都新宿区
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木場智史、熊田奈桜、渡邊達生
2. 発表標題 中脳から延髄への投射神経による運動性生体反応の生成
3. 学会等名 第14回環境生理学プレコンgres、兵庫県神戸市
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Koba, Eri Hanai, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe
2. 発表標題 Involvement of PVN neurons projecting to the RVLM in sympathetic dysfunction in heart failure
3. 学会等名 FAOPS2019、兵庫県神戸市（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Hanai, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe, Satoshi Koba
2. 発表標題 Is sympathoexcitation by PVN-RVLM neurons augmented in heart failure?
3. 学会等名 FAOPS2019、兵庫県神戸市（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe
2. 発表標題 Sympathomotor activation by midbrain locomotor neurons is mediated through glutamate release in the rostral ventrolateral medulla
3. 学会等名 Experimental Biology 2020、米国サンディエゴ市（コロナ禍により現地開催中止、誌上に抄録掲載）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良井絵美, 渡邊達生, 木場智史
2. 発表標題 ラット視床下部背側領域による歩行および循環反応の生成
3. 学会等名 第72 回日本生理学会中国四国地方会、コロナ禍によりウェブ開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Emi Narai, Tatsuo Watanabe, Satoshi Koba
2. 発表標題 Sympathoexcitation and locomotion by dorsal hypothalamic neurons
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会の合同大会、コロナ禍によりウェブ開催
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>リサーチマップ https://researchmap.jp/satoshi_koba</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中村 和弘 (Nakamura Kazuhiro) (00548521)	名古屋大学・医学系研究科・教授	実験助言、支援
研究協力者	片岡 直也 (Kataoka Naoya) (20572423)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師	実験助言、支援
連携研究者	山下 哲 (Yamashita Akira) (40740197)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	実験助言

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関