

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：82660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17386

研究課題名（和文）視床下部と呼吸調節：小児視床下部疾患患者における呼吸障害機構解明への基礎的検討

研究課題名（英文）Hypothalamus and Respiratory Regulation: A Basic Study about the Mechanism of Respiratory Disorders in Pediatric Patients with Hypothalamic Disease

研究代表者

長谷部 洋平（Hasebe, Yohei）

独立行政法人国立病院機構村山医療センター（臨床研究部）・電気生理学研究室・共同研究員

研究者番号：90622374

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新生ラットから作製した間脳-脳幹-脊髄の摘出標本を用いた膜電位イメージング実験を行い、視床下部に呼吸神経出力と同期して活動する領域の存在を同定した。組織解剖学的解析によって、視床下部の室傍核や背内側核と重要な呼吸調節領域である延髄吻腹外側野との間で神経結合があることを確認した。低酸素状態を感知するセンサーであるアストロサイト特異的TRPA1チャネルを欠いたマウスを用い、低酸素後の呼吸増強の持続にはアストロサイト特異的TRPA1チャネル受容体は関与していないこと、アストロサイトは他の機序によって低酸素後も呼吸増強を持続させている事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢性肺胞低換気症候群やROHHAD症候群など、原因不明の小児呼吸調節障害の病態が視床下部の機能不全である可能性が指摘されているが、その詳細は明らかでない。本研究では、この問題の解明に資する、視床下部と延髄呼吸中枢の機能的、解剖学的結合の詳細が示された。また、呼吸中枢における神経細胞の持続的な活動にアストロサイトやミクログリアの役割が重要視されているが、本研究では、小児呼吸器疾患を有する患者が遭遇する低酸素状態に注目し、実験による検討を行った結果、アストロサイトが低酸素曝露中および曝露後の呼吸応答を担っていることが示された。これらの成果は小児における呼吸調節の機序解明の一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：I identified regions in the hypothalamus that are rhythmically active in synchrony with neural respiratory output using the diencephalon-lower brainstem-spinal cord preparation of rats. By histoanatomical analysis, I revealed neuronal connections between the paraventricular/dorsomedial nuclei of the hypothalamus and the rostral ventrolateral medulla that plays crucial roles in respiratory regulation. Secondly, we investigated the role of the astrocytic TRPA1 channels, a putative ventilatory hypoxia sensor, in post-hypoxic persistent respiratory augmentation (PHRA) using astrocyte-specific Trpa1 knockout mice, and clarified that astrocytic TRPA1 channels are not directly involved in PHRA, indicating that astrocytes mediate PHRA by mechanisms other than TRPA1 channels.

研究分野：小児循環器、自律神経

キーワード：小児 視床下部 呼吸循環調節 アストロサイト

## 研究成果報告内容ファイル(アップロードファイル)

### 1. 研究当初の背景

視床下部の機能不全をきたす小児疾患では、低換気とそれによる低酸素状態が見られるが、視床下部の機能不全で呼吸障害が起こる機序は不明であり、その治療法も確立していない。また、視床下部が呼吸調節機構において果たす役割も解明されていない。研究代表者は新生ラットよりの摘出間脳-脳幹-脊髄標本を用いた実験によって視床下部が呼吸促進性の役割を担っていることを示す結果を得たことから、視床下部が呼吸調節機構において重要な役割を果たしているとの仮説を立てた。本研究は視床下部の機能不全を呈する小児疾患が呼吸障害を起こす機序を解明することを究極の目的としつつ、そのための基礎的検討として、呼吸調節における視床下部の役割の解明を目指した。

### 2. 研究目的

先天性中枢性肺胞低換気症候群(CCHS)は、PHOX2B 遺伝子変異による視床下部・延髄の機能不全と低換気を呈する先天性疾患である。ROHHAD 症候群は、視床下部の機能不全を特徴とし、肥満、中枢性低換気を呈する小児疾患である。これらの疾患では、ともに視床下部が障害され、低換気症状を呈するが、そもそも視床下部が呼吸調節に果たす役割は、未解明である。本研究は、CCHS や ROHHAD 症候群などの小児疾患において視床下部の機能不全が呼吸障害を起こす機序の解明を究極の目的としつつ、その基礎的検討として視床下部が呼吸調節において果たす役割の解明を目指した。具体的には、視床下部で呼吸リズムに同期して活動する領域を同定し、同定した領域が延髄呼吸リズム形成機構と神経結合を行っていることを解剖学的に確認することを目的とした。さらに、これらの小児呼吸器疾患を有する患者がしばしば遭遇する低酸素状態に注目し、低酸素曝露後の呼吸応答機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

呼吸に同期して活動する視床下部領域の同定: 新生ラットより作成した摘出間脳-脳幹-脊髄標本を用い、標本の腹側表面および標本を様々なレベルで水平断した断面で膜電位イメージング解析を行い、呼吸に同期して活動する視床下部領域の探索を行った。さらに膜電位イメージング解析に用いた標本の組織学的解析を行い、呼吸に同期した活動を呈した領域の解剖学的同定を行った。上記により同定した領域と延髄の呼吸リズム形成機構との解剖学的結合様式を、順行性神経トレーサー(ビオチン化デキストランアミン・BDA)、逆行性トレーサー(フルオロゴールド・FG)を用いて解析した。具体的には、深麻酔下で若齢ラットの延髄背部を露出し、呼吸リズム形成領域である延髄 preBotzinger Complex (preBotC)領域に BDA の微量注入を行った。当該ラットを 1 週間後に安楽死させ、灌流固定後に視床下部を含む脳幹を摘出した。固定された摘出高位脳幹を薄切後、延髄 preBotC ニューロンが投射する視床下部の領域を解剖学的に解析した。同様の手技を用いて FG を膜電位イメージングで同定した視床下部の呼吸関連領域に注入し、preBotC ニューロンが投射する視床下部の領域を同定した。これらの領域と膜電位イメージング法による解析で同定された視床下部の呼吸関連領域とが一致するかを検討した。

低酸素換気応答機構の解析: 視床下部に機能障害を有する小児呼吸器疾患患者は低酸素状態に遭遇することが多く、また低酸素呼吸応答が減弱していることが多いが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、若齢ラットを用い、呼吸測定を行いつつ、低酸素負荷に対する呼吸の応答性を解析し、視床下部を含む生体の低酸素性呼吸調節機構を検討した。具体的には無麻酔の成体マウスを用い、全身プレチスモグラフィを用いて低酸素性換気反応を調べた。低用量(100mg/kg)と高用量(300mg/kg)のアストロサイト阻害剤である Arundic acid を腹腔内投与する前後に、マウスを低酸素状態下に置き、呼吸状態の変化を確認した。さらにアストロサイト特異的 Trpa1 ノックアウト (asTrpa1<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、低酸素センサーであるアストロサイト TRPA1 チャンネルの低酸素換気応答における役割を調べた。以上の実験結果を総合的に検討し、視床下部は呼吸調節において呼吸出力を安定化させるとともに低酸素曝露時には呼吸の抑制を防ぐなどの重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、小児視床下部疾患患者において呼吸障害・自律神経障害が惹起される病態生理機構を考察するための基礎的知見を提供した。

#### 4. 結果

新生ラットの摘出間脳-脳幹-脊髄標本を用いた膜電位イメージング実験で、視床下部において呼吸神経出力と同期して活動する領域を同定し、視床下部で呼吸調節に関与していると想定される領域(PVN、DMH)から延髄において呼吸調節を担っていると考えられる領域(腹外側延髄やRVLM)への神経投射をラットの脳での組織解剖学的解析により確認した。

低酸素状態における、換気応答の機序を検討する実験では、Arundic acidによって低酸素換気応答は抑制された。アストロサイト特異的Trpa1ノックアウト(asTrpa1-/-)マウスでは、低酸素換気応答が減弱していた。しかし、低酸素負荷終了後に持続する換気増強の程度に差はみられなかった。この結果から、アストロサイト特異的TRPA1は低酸素後の持続的換気増強には直接には関与していないことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukushi Isato, Takeda Kotaro, Pokorski Mieczyslaw, Kono Yosuke, Yoshizawa Masashi, Hasebe Yohei, Nakao Akito, Mori Yasuo, Onimaru Hiroshi, Okada Yasumasa	4. 巻 12
2. 論文標題 Activation of Astrocytes in the Persistence of Post-hypoxic Respiratory Augmentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.757731	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 Kono Yosuke, Yokota Shigefumi, Fukushi Isato, Arima Yosuke, Onimaru Hiroshi, Okazaki Shuntaro, Takeda Kotaro, Yazawa Itaru, Yoshizawa Masashi, Hasebe Yohei, Koizumi Keiichi, Pokorski Mieczyslaw, Toda Takako, Sugita Kanji, Okada Yasumasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural and functional connectivity from the dorsomedial hypothalamus to the ventral medulla as a chronological amplifier of sympathetic outflow	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70234-4	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 該当する
1. 著者名 Okada Yasumasa, Yoshizawa Masashi, Fukushi Isato, Takeda Kotaro, Kono Yosuke, Hasebe Yohei, Koizumi Keiichi, Toda Takako	4. 巻 34
2. 論文標題 Role of Microglia in Ventilatory and Blood Pressure Responses to Acute Hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fasebj.2020.34.s1.02871	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 Yoshizawa Masashi, Fukushi Isato, Takeda Kotaro, Kono Yosuke, Hasebe Yohei, Koizumi Keiichi, Toda Takako, Okada Yasumasa	4. 巻 34
2. 論文標題 Microglial Involvement in Stress induced Prolonged Sympathetic Nervous Excitation in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fasebj.2020.34.s1.02865	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 Fukushi Isato, Yokota Shigefumi, Takeda Kotaro, Terada Jiro, Umeda Akira, Yoshizawa Masashi, Kono Yosuke, Hasebe Yohei, Onimaru Hiroshi, Pokorski Mieczyslaw, Okada Yasumasa	4. 巻 1795
2. 論文標題 Dual orexin receptor blocker suvorexant attenuates hypercapnic ventilatory augmentation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148061 ~ 148061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2022.148061	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 Fukushi Isato, Ikeda Keiko, Takeda Kotaro, Yoshizawa Masashi, Kono Yosuke, Hasebe Yohei, Pokorski Mieczyslaw, Okada Yasumasa	4. 巻 17
2. 論文標題 Minocycline prevents hypoxia-induced seizures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2023.1006424	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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Fukushi I, Takeda K, Pokorski M, Kono Y, Yoshizawa M, Hasebe Y, Nakao A, Mori Y, Onimaru H, Okada Y
2. 発表標題 Astrocytes mediate the post-hypoxic persistent respiratory augmentation
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉沢雅史, 福土勇人, 河野洋介, 長谷部洋平, 小泉敬一, 武田湖太郎, 岡田泰昌, 戸田孝子
2. 発表標題 ストレス刺激による循環応答におけるマイクログリアの関与
3. 学会等名 第54回小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshizawa M, Fukushi I, Takeda K, Kono Y, Hasebe Y, Koizumi K, Toda T, Okada Y
2. 発表標題 Role of microglia in sustenance of stress-induced sympathetic excitation in rats
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukushi I, Kono Y, Takeda K, Yokota S, Onimaru H, Pokorski M, Okada Y
2. 発表標題 Astrocytes play an active role in persistence of respiratory augmentation in the recovery phase after hypoxic exposure
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okada Y, Yoshizawa M, Fukushi I, Takeda K, Kono Y, Hasebe Y, Koizumi K, Toda T
2. 発表標題 Role of Microglia in Ventilatory and Blood Pressure Responses to Acute Hypoxia
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉沢 雅史、福士 勇人、河野 洋介、長谷部 洋平、小泉 敬一、戸田 孝子、岡田 泰昌
2. 発表標題 ストレス刺激後に遷延する血圧上昇・脈拍増加応答に対するマイクログリア抑制の効果
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉沢 雅史、福士 勇人、河野 洋介、長谷部 洋平、小泉 敬一、戸田 孝子、岡田 泰昌
2. 発表標題 急性エアジェットストレス負荷によるラット交感神経興奮の持続におけるマイクログリアの役割
3. 学会等名 第72回日本自律神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田泰昌、長谷部洋平、河野洋介、吉沢雅史、横田茂文、福士勇人、小泉敬一、戸田孝子
2. 発表標題 ストレス刺激に伴う血圧上昇の遷延メカニズム
3. 学会等名 第72回日本自律神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Hasebe, Yosuke Yamada, Yuki Maebayashi, Tamao Shinohara, Atsushi Nemoto, Atsushi Naito
2. 発表標題 Clinical course of Congenital Central hypoventilation Syndrome in infant
3. 学会等名 Oxford Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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
---------	---------