

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：82660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17620

研究課題名(和文) ストレス負荷を模した視床下部電気刺激による延髄交感神経中枢の興奮遷延機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of a mechanism of prolonged activation induced by electronic stimulation of hypothalamus

研究代表者

河野 洋介 (KONO, YOSUKE)

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：00747454

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)：ストレスは視床下部および延髄腹側循環調節領域を介して循環応答を惹起させるが、それらの反応はストレス消失後も遷延する。本研究では、これらの遷延性循環応答のメカニズムを解明するため、膜電位イメージング法と神経トレーサーを用いた検討を行った。視床下部背内側核への電気刺激は、延髄腹側循環調節領域の興奮を惹起させ、テタヌス電気刺激はそれらの遷延性興奮を惹起することを明らかにした。視床下部背内側核からの神経投射は、延髄腹側循環調節領域に網状に分布し、特に延髄吻側副外側野においてはチロシンハイドロキシラーゼ陽性細胞の樹状突起に分布していた。また、グリア細胞の循環応答への寄与について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧症は心血管疾患の最大のリスク因子であるが、本態性高血圧発症のメカニズムは明らかでない。身体的あるいは精神的ストレスは血圧上昇・心拍数増加といった循環応答が惹起されるが、ストレス消失後もこれらの循環応答が遷延する場合には、将来、高血圧を発症するリスクが高まることが報告されている。本研究では、精神的ストレスを模した視床下部背内側核へのテタヌス刺激が延髄腹側循環調節領域の遷延性興奮を惹起することを明らかにし、その解剖学的結合およびグリア細胞の関与についての知見を得た。本成果はストレスによる交感神経活動の持続的増強のメカニズムを理解するための解剖学的および病態生理学的基盤となると考える。

研究成果の概要(英文)：Acute psychological stress induces elevation of blood pressure, which persists after the stress is relieved. However, the mechanism of this prolonged responses has not been fully elucidated.

We investigated this issue by functional imaging and tract-tracing in rats. By voltage-sensitive dye imaging, although the activation of the ventral medulla induced by single pulse stimulation of the DMH was brief, tetanic stimulation caused activation of the dorsomedial hypothalamus (DMH) sustained into the post-stimulus phase, resulting in delayed recovery. Tract-tracing revealed DMH neurons projected to the ventral medullary cardiovascular regions with axon terminals in contiguity with tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. The contribution of glial cells to the circulatory response induced by psychological stress was also examined.

研究分野：循環器

キーワード：高血圧 遷延性興奮 視床下部 延髄 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は国民病の一つであり、年間約 10 万人の患者が高血圧症を起因とした疾患により死亡している。高血圧はその原因により分類されるが、特定の原因を有さずに高血圧を呈する本態性高血圧症は、高血圧患者の大半を占める。身体的あるいは精神的なストレスは、交感神経活動の増強を介し、血圧上昇・心拍数増加などの循環反応を惹起する。ストレスが消失しても、上昇した血圧や増加した心拍数はしばらく高値にとどまるが、Steptoe らは、ストレス刺激後の血圧上昇・心拍数増加が長時間持続する場合には数年後に高血圧症を発症しやすいことを報告した。研究代表者はこのストレス後の交感神経興奮の持続メカニズムの解明こそが本態性高血圧症発症の病態解明の鍵であると考えているが、そのメカニズムは解明されていなかった。

ストレスは大脳皮質や辺縁系にて感受・処理され、扁桃体を介して視床下部へ伝達される。視床下部および延髄腹側に存在する細胞群は交感神経活動を介した血圧調節に深く関与することが報告されており、特に、視床下部背内側核 (DMH) はストレスによる神経入力を受け、延髄腹側の交感神経細胞群を介した循環調節に重要な役割を担っていると考えられてきた。また、研究代表者はこれまでに新生ラット摘出脳幹脊髓標本を用いた膜電位イメージング法により、延髄腹側細胞群の活動を時空間的に観察することに成功していた。そこで本研究では、ストレスを模した DMH へ電気刺激がどのような時空間的ダイナミクスを有するかを、摘出視床下部脳幹脊髓標本を用いた膜電位イメージング法によって検討するとともに、DMH から延髄腹側への神経投射を、神経解剖学的手法を用いて検討することとした。

また、交感神経の持続興奮のメカニズムについてはニューロンのみでは十分に論証し得ないことから、近年、その役割が再確認されつつあるグリア細胞に着目した。特にアストロサイトは記憶や学習、神経障害性疼痛といったシナプス可塑性が関与する脳神経活動に深く関与することが報告されている (Ikeda et al, *Pain*. 154:2836-2843 (2013). Padrashri et al, *Neural Plast.* 2015:938023-11 (2015). Ota et al, *Neural Plast.* 2013:185463-11 (2013).)。また、研究代表者の研究グループに属する長谷部らは、ラットにストレス刺激を与えた際の循環動態の変化を測定し、アストロサイトの阻害剤である Arundic acid の前投与によりストレス刺激後の血圧の回復が有意に早いことを報告し、急性ストレス後の血圧上昇の持続においてアストロサイトが関与している可能性を提唱していた。そこで本研究では、ストレス負荷時の循環応答に対するグリア細胞の関与についても検討することとした。

2. 研究の目的

ストレス負荷を模した視床下部 DMH への電気刺激による延髄腹側循環調節領域の時空間的ダイナミクスを検討し、ストレスに対する交感神経の持続興奮メカニズムを検討すること。

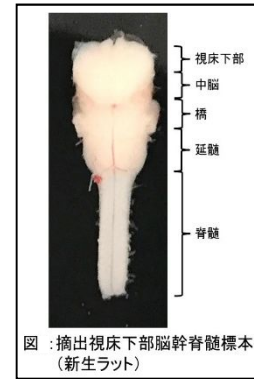
3. 研究の方法

A. 新生ラット摘出視床下部脳幹脊髓標本を用いたイメージング実験

イメージング実験では、新生ラット摘出視床下部脳幹脊髓標本を用い、視床下部刺激時の延髄腹側細胞群活動を時空間的に検証する。本実験では、生体でのストレス刺激を視床下部電気刺激により模し、刺激終了後の細胞群活動の経過を解析・検証した。

標本の作成：深麻酔下の新生ラット（0-3日齢）から視床下部～頸髄を一塊として摘出する。標本の視床下部吻側端は、循環調節領域として知られている視床下部DMHとした（図）。摘出した標本を膜電位感受性色素（Di2-ANEPEQ）で染色し、腹側を上にして計測用チェンバーに微小ピンで固定する。チェンバーを酸素化人工脳脊髄液で灌流し、その生存性を維持する。標本が生存性を維持していることは、第4頸髄前根の自発性の吸気性神経出力を測定することにより確認した。

蛍光膜電位イメージング法：DMH電気刺激により興奮・脱分極する延髄腹側領域を蛍光膜電位イメージング法により同定する。標本に緑色励起光を当て、膜電位応答を反映する590 nm以上の波長の赤色蛍光を落射蛍光顕微鏡に接続した膜電位イメージングシステムMiCAM ULTIMA（BrainVision社製）を用いて計測し、得られた信号を同社のソフトウェアBV Analyzerを用いて解析した。



B. 視床下部 DMH から延髄への解剖学的結合様式の解明

視床下部 DMH から延髄への投射経路を同定するため、神経トレーサーを用いて解剖学的結合様式を検討した。

順行性神経トレーサーを用いた実験

若年 Wistar ラット（週齢 8-10）を用い、深麻酔下に順行性トレーサー-Biotin Dextran Amine (BDA) を視床下部 DMH 領域に注入する。1 週間生存後に脳を摘出し、30 μm 厚にスライスした標本を作製する。顕微鏡下に BDA 標識神経を観察する。また、免疫染色法を用い、チロシンヒドロキシラーゼ陽性神経を染色し、DMH からの BDA 標識神経との解剖学的結合を検討した。

逆行性神経トレーサーを用いた実験

若年 Wistar ラット（週齢 8-10）を用い、全身麻酔下に逆行性トレーサー-Fluorogold (FG) を延髄吻側腹外側野 (RVLM) に注入する。7-10 日生存後に脳を摘出し、と同様の方法で標本を作製する。顕微鏡下に視床下部における FG 標識神経の分布を観察した。

C. 低酸素負荷に対する循環応答に関するマイクログリアの役割の検討

オスの Wistar ラット（週齢 23-26）を用い、深麻酔下に血圧測定用圧トランスデューサを腹部大動脈に留置し、血圧測定用テレメーター送信機（Kaha Sciences 社）を腹腔内に留置する。術後 1 週間以上の回復期間の後、ラットを呼吸測定用チャンバーに入れ、無麻酔非拘束下に呼吸数・一回換気量・血圧・心拍数を測定する。

ベースラインの測定を終えたのち、低酸素負荷を行った。また、マイクログリアの活性抑制剤である、ミノサイクリンを腹腔内に投与し、低酸素ストレス負荷時の呼吸・循環応答の変化について検討した。

D. 急性低酸素負荷後の呼吸増強の持続に関するアストロサイトの役割の検討

急性低酸素負荷は、換気量を増加させるが、低酸素負荷終了後もしばらく換気量は増加している。この低酸素負荷後の持続的な呼吸増強 (PHRA) のメカニズムは不明である。そこで、PHRA に関するアストロサイトの役割を検討した。

無麻酔の成体マウスを呼吸測定用チャンバーに入れ、低酸素混合ガス (7% O₂, 93% N₂) を 2 分間吸入させたのち、10 分間室内気にて呼吸を行うことにより、PHRA を惹起させた。PHRA に対するアストロサイトの関与を検討するため、アストロサイト阻害剤である Arundic acid を低用量および高用量で腹腔内投与しその変化を検討した。また、アストロサイトの低酸素センサーとして報告されている TRPA1 チャンネルが PHRA 惹起にどのように関与しているのかを検討するため、

アストロサイト特異的 *Trpa1* ノックアウトマウス(*asTrpa1^{-/-}*)と *Trpa1* flox マウス(*Trpa1^{flox}*)を用いて同様の検討を行った。

4. 研究成果

膜電位イメージング法を用いた実験では、視床下部 DMH への電気刺激により、延髄腹側細胞群の興奮を時空間的に観察し得た。延髄腹側循環調節領域(延髄吻側腹外側野 RVLM、延髄尾側腹外側野 CVLM、延髄吻側腹内側野 RVMM、縫線核 RP)において、興奮の様子を単パルス刺激とテタヌス刺激にて比較したところ、テタヌス刺激では刺激終了後からの回復が有意に遅く、視床下部 DMH へのテタヌス電気刺激によって遷延性の興奮が惹起されることを明らかにした。逆行性神経トレーサーを用いた実験では、DMH から RVLM へ投射する FG 標識ニューロンは、同側優位性を示しながら両側 DMH で観察された。また、順行性トレーサーを用いた検討では、DMH から延髄へ投射する BDA 標識ニューロンの軸索および神経終末は、同側優位性をもって延髄の両側に網状に分布していた。DMH からの BDA 標識ニューロンは、RVLM においてチロシンヒドロキシラーゼ陽性ニューロンの樹状突起近傍に直接投射していることを明らかにした。これらの知見について、学術誌『Scientific Reports』にて報告した。

低酸素負荷に対するマイクログリアの生理学的実験では、ミノサイクリン投与の有無による低酸素負荷に対する平均血圧や心拍数の変化変動を来たさなかった。一方で、ミノサイクリン投与により、低酸素負荷時の分時換気量の変化を有意に抑制した。これらの知見について、現在学術誌へ投稿中である。

PHRA に対するアストロサイトの役割の検討では、アストロサイト阻害剤である Arundic acid の投与により、PHRA は有意に抑制された。このことはアストロサイトが PHRA 発現に関与していることを示すが、*Trpa1^{flox}* マウス、*asTrpa1^{-/-}* マウスともに PHRA は顕著にあり、PHRA にはアストロサイトの低酸素センサーである TRPA1 チャネル以外のメカニズムが関与していることが示された。これらの知見について、学術誌『Frontiers in Physiology』にて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

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 Fukushi Isato, Kono Yosuke, Takeda Kotaro, Yokota Shigefumi, Onimaru Hiroshi, Pokorski Mieczyslaw, Okada Yasumasa	4. 巻 34
2. 論文標題 Astrocytes play an active role in persistence of respiratory augmentation in the recovery phase after hypoxic exposure	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.s1.03235	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 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, 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 757731
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 該当する

[学会発表] 計10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 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 Yoshizawa M, Fukushi I, Takeda K, Kono Y, Hasebe Y, Koizumi K, Toda T, Okada Y
2. 発表標題 Microglial Involvement in Stress induced Prolonged Sympathetic Nervous Excitation in Rats
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総会
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総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Isato FUKUSHI, Yosuke KONO, Shigefumi YOKOTA, Kotaro TAKEDA, Itaru YAZAWA, Hiroshi ONIMARU, Yasumasa OKADA.
2. 発表標題 The diencephalon augments respiration in the isolated diencephalon-lower brainstem-spinal cord preparations of newborn rats.
3. 学会等名 第6回日本呼吸理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019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		
ポーランド	University of Opole	The Jan Dlugosz University	