

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06917

研究課題名(和文)呼吸中枢における呼吸リズム揺らぎのメカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of rhythm fluctuation in the respiratory center

研究代表者

越久 仁敬 (Oku, Yoshitaka)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20252512

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)：ニューロンとアストロサイトの相互作用で呼吸のゆらぎが作られるという仮説を検証するために、シミュレーションとトランスジェニックマウスを用いた動物実験を行った。

シミュレーションでは、呼吸ゆらぎはアストロサイトからニューロンへの作用強度に応じて大きくなったが、呼吸ゆらぎとアストロサイト活動の経時的な相関は明らかではなかった。動物実験でも、呼吸ゆらぎの大きさと緩徐なアストロサイト活動の大きさは相関していたが、呼吸ゆらぎとアストロサイト活動の経時的な相関は認めなかった。

呼吸ゆらぎにアストロサイト活動が何らかの関与していることは示されたが、その関係は非常に非線形で、関係性を明示することは困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、神経系はニューロンから構成されるという、いわゆるニューロンドクトリンが見直され、脳機能はニューロンとグリア細胞(アストロサイト)の協調した活動から生まれるという新たな認識が生まれている。本研究も、そのような認識のもとにたてられた仮説を検討するものであった。研究の結果、呼吸ゆらぎに対するアストロサイト活動の影響は非常に複雑であり、関係性を明らかにするには、新たな解析方法の開発が必要とされることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To test the hypothesis that the interaction between neurons and astrocytes produces fluctuations in respiration, we conducted simulations and animal experiments using transgenic mice.

In the simulation, respiratory fluctuations increased according to the strength of the action from astrocytes to neurons, but the temporal correlation between respiratory fluctuations and astrocytic activity was not clear. Animal experiments also found a correlation between the magnitude of respiratory fluctuations and the magnitude of slow astrocytic activity, but no temporal correlation was observed between respiratory fluctuations and astrocytic activity.

Although it was shown that astrocytic activity was somehow involved in respiratory fluctuations, the relationship was very nonlinear, and it was difficult to clarify the relationship.

研究分野：呼吸生理学

キーワード：ニューロン-グリア相互作用 呼吸中枢 呼吸リズム カルシウムイメージング ネットワークシミュレーション

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

呼吸のリズムは一定ではなく、常に変動していて一つとして同じ呼吸はない。呼吸の揺らぎの一部は、血中の O_2 や CO_2 分圧を一定に保つための化学性調節や、肺・胸郭に存在する機械的受容器を介する神経性調節、さらには大脳皮質および大脳辺縁系による行動性調節によって形成されることは既に知られている。しかし、それらの調節機構をすべて取り除いて、吸息リズム形成の中核である preBötzinger complex (preBötC)のみを脳スライスとして取り出しても、やはり呼吸リズムは揺らいでいる。その揺らぎが生じるメカニズムは未だ十分解明されていない。また、心拍の揺らぎの代表である呼吸性洞性不整脈の生理的役割は換気血流比の安定化であるとされる (Hayano et al, Circulation, 1996) が、呼吸そのものの揺らぎの生理的役割に関しては未解明である。呼吸の揺らぎは何のためにあるのか、その間に答えるには呼吸の揺らぎのメカニズムが明らかにされる必要があると考え、本研究を実施した。

2. 研究の目的

我々は、preBötC に吸索性ニューロン活動と不規則に同期するアストロサイトが 10%程度存在すること、細胞内 Ca^{2+} 濃度がゆっくり (<0.03 Hz)と変動するアストロサイトが同期したクラスターを形成していることから、吸索性ニューロンとアストロサイトクラスターが相互に影響しあうことで呼吸の揺らぎが作られるとの仮説を提唱した (Oku et al, Resp Physiol Neurobiol, 2015)。本研究課題は、このニューロン-グリア相互作用が呼吸の揺らぎを生み出しているという仮説を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ニューロン-グリアネットワークのモデリングとシミュレーション

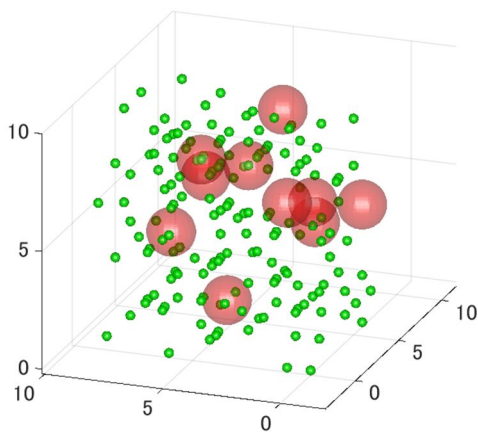


図 1. ニューロン-グリアネットワークモデルの模式図。160 個のニューロン (小ビーズ) と、それぞれが独立したカルシウム振動する 10 個のアストロサイトクラスター (ボール) が相対距離 $10 \times 10 \times 10$ の空間に配置される。

preBötC において吸息リズムを形成するニューロン-グリアネットワークの数学モデルを作り、ニューロン-グリア相互作用が吸息リズムとその揺らぎにどのような影響を及ぼすのかを推定した。preBötC において隣接するアストロサイトは、ニューロン活動とは独立して同期したカルシウムオシレーションを呈し、局所的なクラスターを形成している (Hartel et al, Glia, 2009; Oku et al, Respir Physiol Neurobiol, 2016; Forsberg et al, Elife, 2017)。そこで、本研究では呼吸ニューロンネットワークがアストロサイトクラスターとともに空間に埋め込まれたモデル (図 1) を考える。具体的には、160 個のニューロン (興奮性ニューロン 80 個、抑制性ニューロン 80 個) が 10 個のアストロサイトクラスターとともに相対距離 $10 \times 10 \times 10$ の空間に埋め込まれたモデルを仮定した。呼吸ニューロンネットワークモデルは、以前に我々が開発したモデル (Lal et al, PLoS One, 2017) を用いた。このネットワークモデルは、Butera モデル Type 1 ニューロン (Butera et al, J Neurophysiol, 1999) から構成され、各ニューロン間の結合は 1 (結合あり) あるいは 0 (結合なし) を要素とする Adjacency 行列によって表現される。

アストロサイトモデルは、Li-Rinzel モデル (Li and Rinzel, J Theor Biol, 1994) を用いた。このモデルは、小胞体膜を通した Ca^{2+} の流入と流出に伴う細胞内カルシウム濃度変化のみを考慮したものであり、細胞外のグルタミン酸あるいは ATP が、代謝型グルタミン酸受容体あるいは P2Y プリン受容体と結合することによって、細胞内の IP_3 産生を増加させ、その IP_3 が小胞体膜上の IP_3 受容体と結合することによって小胞体から Ca^{2+} が放出されて細胞内カルシウム濃度が変動する。Li-Rinzel モデルでは、 IP_3 受容体における抑制性の Ca^{2+} 結合部位の結合係数によってカルシウムオシレーションが発生する。

本ニューロン-グリアネットワークモデルにおいては、吸索性ニューロンのバースト発火に伴ってシナプス間隙に放出されるグルタミン酸が、アストロサイトの代謝型グルタミン酸受容体を活性化し、細胞内カルシウム濃度に影響する一方、アストロサイトクラスターのカルシウム活動に伴ってアストロサイトから放出される ATP (Gourine et al, Science, 2010) や D-セリン (Beltrán-Castillo et al, Nat Commun, 2017) などのグリア伝達物質 (gliotransmitter) がニューロン活動に影響すると仮定した。予備的なシミュレーションにおいて、これらのニューロン-グリア

相互作用が全くない時には、それぞれの呼吸ニューロンは規則正しく活性化され、呼吸リズムの揺らぎは起こらないことを確認した(図2)。従って、本モデルにおいては、呼吸の揺らぎはニューロン-グリアネットワークの相互作用のみから生じる。

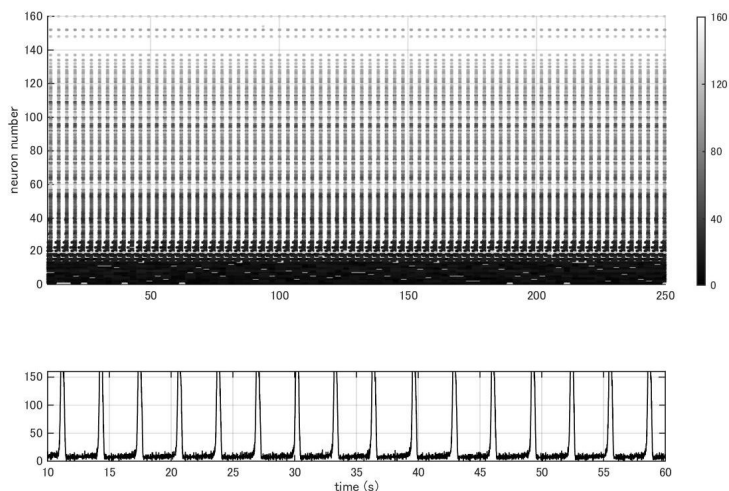


図2. ニューロン-グリア間の相互作用がない場合の呼吸ニューロンネットワーク活動のシミュレーション。上段: ニューロン活動のラスタプロット。各バーストにおけるニューロンの活性化順序がグレースケールで示されている。下段: 発火しているニューロン数の時系列変化。ニューロン-グリア間の相互作用がない場合、それぞれの呼吸ニューロンは規則正しく活性化され、呼吸リズムの揺らぎは起こらない。

(2) preBötC 領域アストロサイトのカルシウムイメージング

動物実験は、当初、グリア細胞特異的タンパク質 GFAP のプロモーターによってカルシウム感受性蛍光タンパク質 CASE12 (Whitaker, Methods Cell Biol, 2010) の発現が制御されるトランスジェニックマウスを用いて行う予定であったが、低 K^+ 人工脳脊髄液に対するアストロサイトの応答が観測される標本と観測されない標本があり、また、グリア細胞のグルタミン酸トランスポーター阻害薬 TFB-TBOA によって代謝型グルタミン酸受容体の活性化を介してアストロサイトのカルシウム活動を増加させても、期待されるようなアストロサイトの応答が観測されなかったため、データを得ることができなかった。何らかの理由で、CASE12 が脳幹スライス標本において十分に機能していないと判断し、以後の解析は、ゲッティンゲン大学との共同研究で得られた別のトランスジェニックマウスを用いて行った。

グリア細胞特異的タンパク質 GLAST (glutamate aspartate transporter) のプロモーターによってカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP3 の発現が制御されるトランスジェニックマウスを用い、preBötC 領域を含み、 K^+ 濃度を上げることによって呼吸性バースト活動を示す脳スライス(呼吸スライス)を作成した。preBötC 領域のフィールド電位により呼吸性バースト活動を記録した。アストロサイトのカルシウム活動は、GCaMP3 を 900 nm のレーザーで励起し、二光子顕微鏡イメージングシステム(TriMScope 1, LaVision BioTec, Germany)を用いて記録した。長時間励起光を照射することによって起こる退色を補正するために、蛍光強度の時系列は蛍光変化率($\Delta F/F$)に変換した。さらに得られた時系列イメージから細胞毎のカルシウム活動を得るために、細胞体を自動認識し、細胞体上に $10 \times 10 \mu m$ の関心領域を設定し、領域内の蛍光強度の平均値を取った。その後、吸息性バースト活動から呼吸リズムとその揺らぎを求め、アストロサイトのカルシウム活動との関係を解析した。

4. 研究成果

(1) ニューロン-グリアネットワークのモデリングとシミュレーション

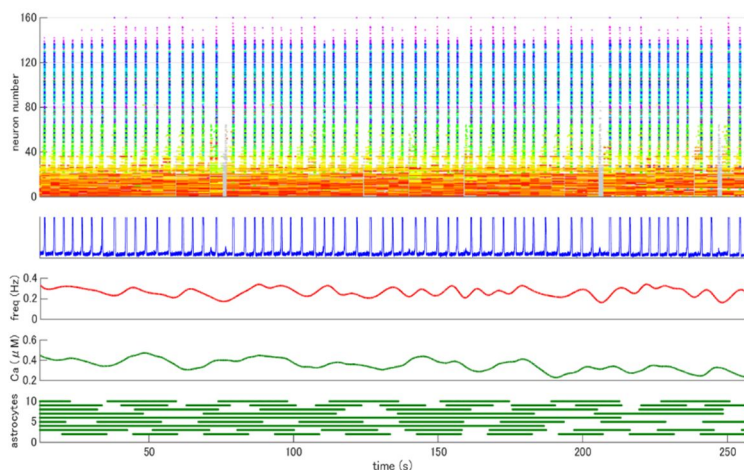


図3. ニューロン-グリア間の相互作用がある場合の呼吸ニューロンネットワーク活動のシミュレーション。上から、ニューロン活動のラスタプロット(カラースケールで活性化順序を表示)、呼吸性バースト活動、瞬間的な呼吸頻度、平均のアストロサイトカルシウム活動、それぞれのアストロサイトクラスターの活性化時系列を示す。

アストロサイトと呼吸ニューロンの相互作用を考慮したニューロンネットワークのシミュレーションでは、相互作用が全くない時には、それぞれの呼吸ニューロンは規則正しく活性化され、呼吸リズムの揺らぎは起こらなかったのに対して、相互作用がある場合には、呼吸リズムの揺らぎが生じた(図3)。

変動係数 (CV = 標準偏差 / 平均) で評価した呼吸ゆらぎの大きさは、アストロサイトから呼吸ニューロンへの作用強度に応じて大きくなった(図4)。呼吸ゆらぎとアストロサイトクラスターのカルシウム変動のパワースペクトル分布は、ほぼ一致した。これらの特性は、ニューロン間の結合をランダムと仮定したモデル(図4A,B)よりも、ニューロン群が同期してバースト活動するようニューロン間結合を最適化したモデル(図4C,D)において顕著であった。

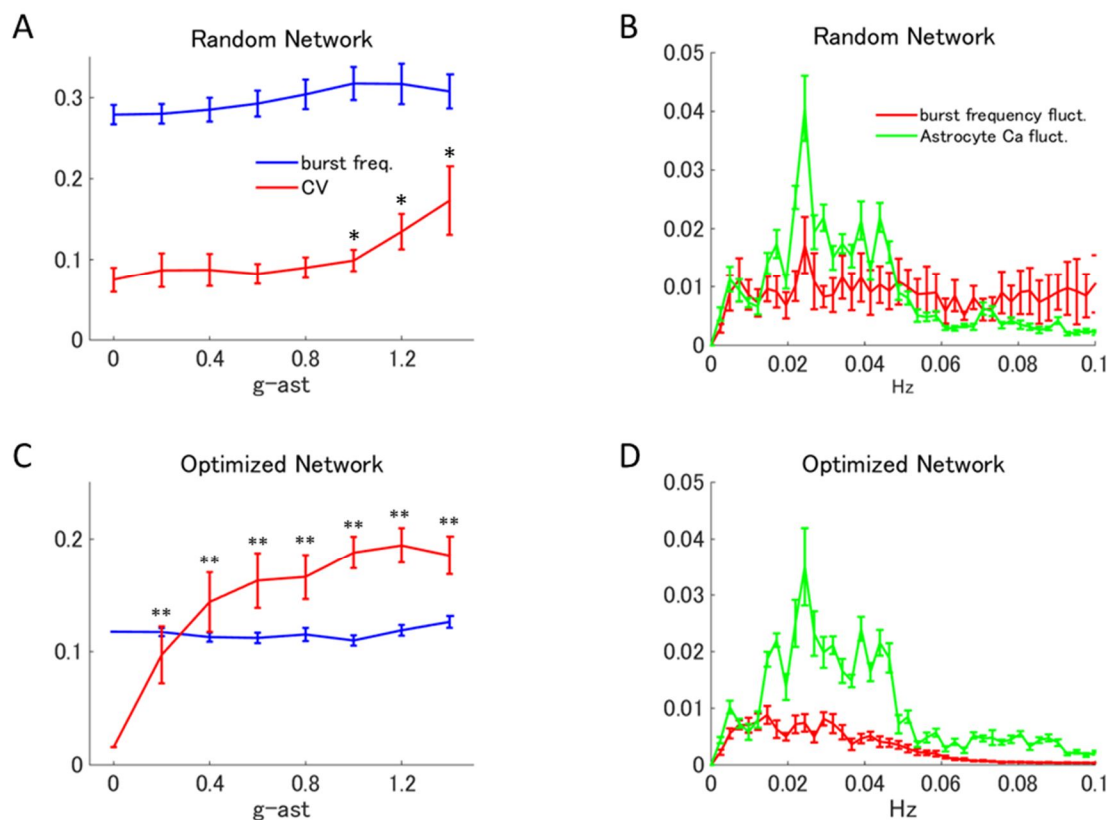


図3. A, C: グリア伝達物質を介したアストロサイトから呼吸ニューロンへの作用強度を示すスケール因子 g_{-ast} と、呼吸数 (burst freq., 青線) および呼吸ゆらぎの変動係数 (CV, 赤線) との関係図。B, D: 呼吸ゆらぎ (burst frequency fluct., 赤線) とアストロサイトクラスターのカルシウム変動 (Astrocyte Ca fluct., 黄緑線) のパワースペクトル分布。A, B はニューロン間の結合をランダムと仮定したモデルを用いたシミュレーション、C, D はニューロン群が同期してバースト活動するようニューロン間結合を最適化したモデルを用いたシミュレーション。それぞれ、10個のネットワーク結合と細胞配置の異なるモデルを生成し、シミュレーション結果を平均した。エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

しかし、最大相互相関係数 (CC_{max}) で評価した呼吸ゆらぎ (瞬間的な呼吸頻度) とアストロサイトカルシウム変動の間の相関は、アストロサイトから呼吸ニューロンへの作用強度に応じて必ずしも大きくなり、大きなばらつきがあった。Cross recurrence plot を用いた呼吸ゆらぎとアストロサイト活動の非線形同期の定量解析では、ニューロン グリア間の相互作用がない場合でも、ネットワークが偶発的に非線形同期しているかのような振る舞いをするのがあり、呼吸ゆらぎとアストロサイトカルシウム変動の非線形な関係性を明示することはできなかった。

(2) preBötC 領域アストロサイトのカルシウムイメージング

呼吸スライス preBötC 領域アストロサイトのカルシウム活動を解析したところ、一部のアストロサイトでは緩徐なカルシウム振動の上に一過性の速いカルシウム振動が観測されたが、ほとんどのアストロサイトでは、緩徐で不規則なカルシウム振動のみが観測された(図4)。そこで、以降の解析では、低域通過フィルタ処理を行い、緩徐なカルシウム変動と呼吸ゆらぎの関係について検討した。瞬間的な呼吸頻度を指標として計測した呼吸ゆらぎと緩徐なアストロサイトカルシウム変動は、ともに 0.01Hz あたりに変動の周波数パワーがあった(図5A)。瞬間的な呼吸頻度と緩徐なアス

トロサイトカルシウム変動との間には、ほぼ相関を認めなかった ($CC_{max} = 0.0062 \pm 0.30SD$, $n=18$)。すなわち、呼吸のゆらぎとアストロサイトカルシウム活動との間に、線形の関係性は認められなかった。しかし、0-0.04Hz 帯域における呼吸ゆらぎとアストロサイトの平均カルシウム変動のパワーは、有意に相関しており (図 5 B)、呼吸ゆらぎにアストロサイトカルシウム変動が非線形に関係していることが示唆された。

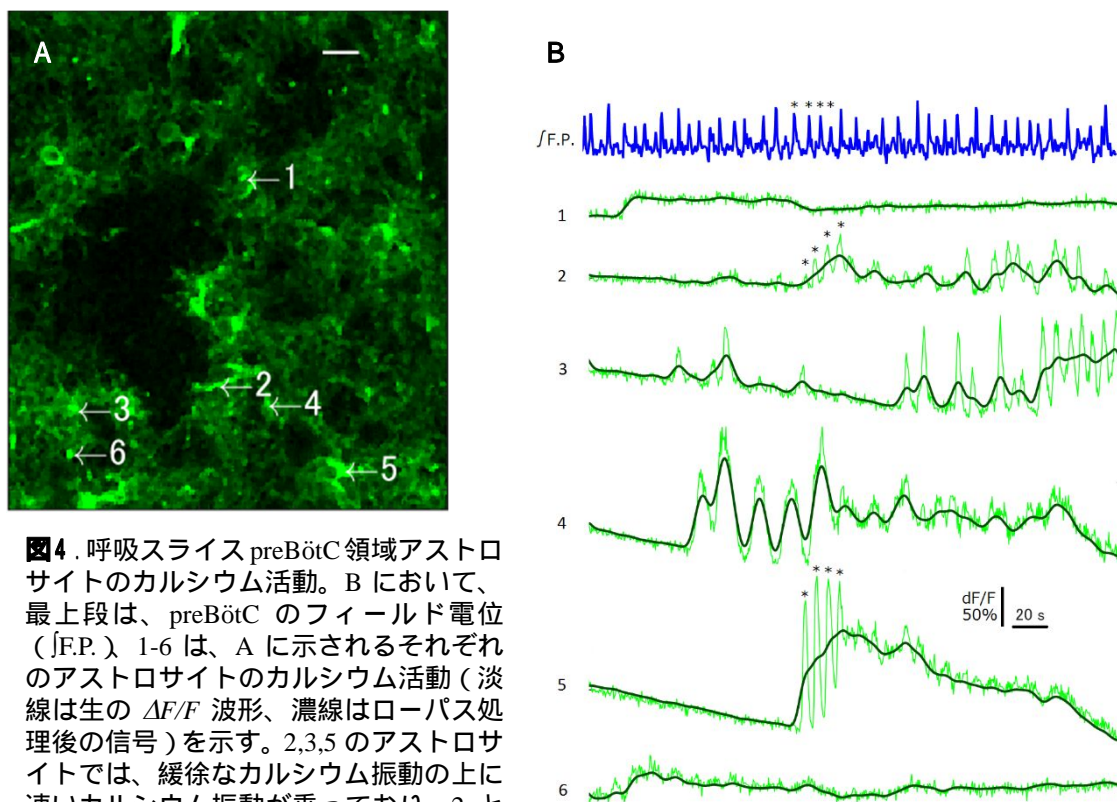


図4 呼吸スライス preBötC 領域アストロサイトのカルシウム活動。B において、最上段は、preBötC のフィールド電位 (F.P.) 1-6 は、A に示されるそれぞれのアストロサイトのカルシウム活動 (淡線は生の $\Delta F/F$ 波形、濃線はローパス処理後の信号) を示す。2,3,5 のアストロサイトでは、緩徐なカルシウム振動の上に速いカルシウム振動が乗っており、2 と 5 のアストロサイトではアスタリスク (*) で示される速いカルシウム振動が同期している。

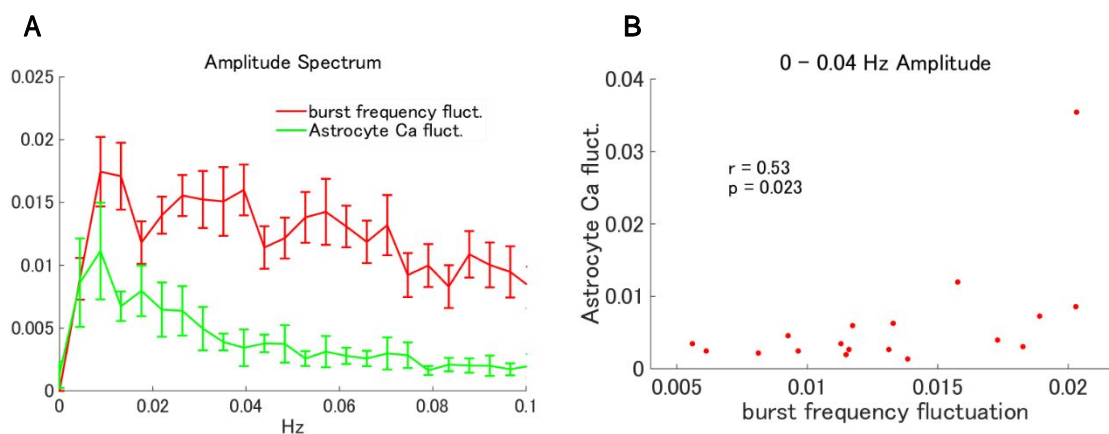


図5 A: 呼吸ゆらぎ (burst frequency fluct., 赤線) とアストロサイトの平均カルシウム変動 (Astrocyte Ca fluct., 黄緑線) のパワースペクトル分布。B: 呼吸ゆらぎとアストロサイトの平均カルシウム変動それぞれの 0-0.04Hz 帯域のパワースペクトル密度の総和の関係図。

以上のように、呼吸ゆらぎにアストロサイトカルシウム変動が何らかの関与していることは示唆されるが、その関係は非常に非線形であり、関係性を明示することは困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Oku Yoshitaka	4. 巻 72
2. 論文標題 Temporal variations in the pattern of breathing: techniques, sources, and applications to translational sciences	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-022-00847-z	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	平田 豊 (Hirata Yutaka) (10441247)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究協力者	尾家 慶彦 (Oke Yoshihiko) (50396470)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	

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		
ドイツ	ゲッティンゲン大学		