

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15208

研究課題名（和文）体性感覚認知における脳内酸素濃度変動及びその制御機構の生理的意義

研究課題名（英文）Physiological significance of brain oxygen levels and their regulatory mechanisms in higher brain functions

研究代表者

中尾 章人（Nakao, Akito）

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：30748926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトを含む好気性生物の生存において、体内の酸素センシングは必要不可欠である。脳への酸素供給は特に重要であるとされているが、脳活動に伴うような穏やかな低酸素に関してはあまり研究されてこなかった。本研究では、申請者が独自に見出したTRPA1カチオンチャンネルタンパク質を介した分子メカニズムを起点に、脳高次機能における脳内酸素濃度変動及びその制御機構の生理的意義の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脳における穏やかな低酸素に着目しており、既存の酸素研究に新たな視点を提供する。また、比較的早いタイムスケールの酸素センシングの分子実体に迫ることにより、高頻度にみられる睡眠時無呼吸症候群や高山病などの低酸素が関与する疾患の発症・病態に関する新しい分子生物学的な知見が得られ、将来的に新たな創薬のターゲットを提示できる可能性を有する。

研究成果の概要（英文）：Oxygen sensing within the body is essential for the survival of aerobic organisms, including humans. While the supply of oxygen to the brain is considered particularly important, the impacts of physiological hypoxia induced by brain activity have not been elucidated. Based on the unique molecular mechanism involving the TRPA1 cation channel protein, this study revealed a part of the physiological significance of fluctuations in brain oxygen levels and their regulatory mechanisms in higher brain functions.

研究分野：生理学、神経科学、分子生物学

キーワード：低酸素 イオンチャンネル 酸素センシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酸素は好気性生物の生存に必須である。諸器官の中で特に酸素消費量が高い脳においては、細胞の置かれる酸素環境が重要となる。しかし、脳活動によって引き起こされる脳内酸素濃度変動及びその制御機構の詳細は未だ不明である。細胞の活動などで誘導されるような生理的条件下における低酸素は、それ自体が細胞の代謝エネルギー状態を規定し、細胞の"振る舞い"を決定づけるため極めて重要である。

酸素に関する研究としては、2019年ノーベル生理学・医学賞の受賞対象となった hypoxia-inducible factor (HIF) を介した応答が記憶に新しいが、一連の研究は極端な低酸素条件 (具体的な実験条件としては、細胞を 1% 酸素条件下で 4 時間インキュベートなど) で行われており、虚血などの病的な低酸素状態以外の生理的な酸素濃度変動の生物学的意義は、脳高次機能の文脈において未解明であった。

申請者は、脳幹におけるアストロサイトが TRPA1 カチオンチャンネルタンパク質の酸素依存的な代謝を介したユニークな分子メカニズムで、生理的に起こり得る穏やかな低酸素を感知することを明らかにした (\*Uchiyama, \*Nakao et al., Curr. Biol. 2020. \*co-first author)。また TRPA1 が呼吸制御の神経可塑性に寄与し得ること (Fukushi et al., Front. Physiol. 2021)、及びアストロサイト特異的 TRPA1 欠損マウスが低酸素環境において動き続けて気絶すること (未発表データ) から、TRPA1 の脳内酸素センサーとしての高次機能への寄与が強く示唆されており、まさに生理的低酸素の脳高次機能における生物学的意義の解明の端緒をつかんだところであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、行動に伴う脳活動によって引き起こされる生理的な低酸素に着目し、体性感覚認知などの脳高次機能に伴う脳内酸素濃度変動及びその制御機構の生理的意義を追究する。これまでに生理的条件下で起こり得る穏やかな低酸素に関してはほとんど研究されていないが、申請者が独自に見出したアストロサイトに発現する TRPA1 の酸素センシングメカニズムを足掛かりとし、生理的な低酸素の脳高次機能における生物学的意義を明らかにする。

具体的には、脳内酸素センサー TRPA1 を欠損したマウスを用いた行動解析を通じて、生理的な低酸素感知がどのような脳高次機能に関与するのかを行動学的に明らかにし、さらに神経基盤となるシナプス可塑性を評価する。また、リン光イメージングを用いて脳の各領域から単離したアストロサイトの細胞内酸素濃度分布を評価し、各脳領域における生理学的な低酸素環境及びその分子メカニズムに関する手掛かりを得る。さらに、免疫蛍光染色法により TRPA1 の脳内発現分布を探究し、脳内酸素濃度制御機構の分子メカニズム明らかにする。以上のように、本研究では脳内酸素センサー TRPA1 を基軸に、脳高次機能に伴う脳内酸素濃度変動及びその制御機構の生理的意義を追究する。加えて、低酸素研究で問題となるのが酸素濃度の時空間的な制御であることから、ツールの開発も同時に行う。

### 3. 研究の方法

生理的条件下における脳内酸素濃度変動及びその制御機構の生物学的意義の探索のため、脳内の酸素センサー TRPA1 を欠損させたマウスを用いて行動生理学的な評価を行う。具体的には、感覚・知覚、運動、情動、睡眠・リズム、注意、学習・記憶、社会的行動などさまざまな行

動カテゴリーのテストを組み合わせることで、行動生理学的スクリーニングを行う (Nakao et al., Front. Behav. Neurosci. 2015, Trung et al., Sci. Rep. 2021, Nakao et al., Channels 2022)。本研究では特に体性感覚認知に着目する。加えて、脳高次機能の神経基盤とされているシナプス可塑性に対し低酸素が及ぼす影響を、脳スライスを用いた海馬の多点細胞外電位記録により評価する。

各脳領域から単離したアストロサイトの細胞内酸素測定のための酸素プローブとしては、リン光寿命によって酸素濃度を定量可能な BTPDM1 を使用した (Yoshihara et al., Anal. Chem. 2015)。このプローブは Ir 錯体をベースとしており、酸素濃度依存的にリン光の寿命が変化するものである。リン光強度とは対照的に、リン光寿命はプローブ濃度に依存しないパラメーターであり、プローブの拡散が制限され取り込み量(濃度)が低い組織深部においても酸素濃度の定量が可能であることが期待されることから、将来的に組織深部のイメージングも見据えた二光子励起顕微鏡とリン光寿命測定装置を組み合わせた実験系の構築も行う。

脳内の酸素濃度制御機構の分子基盤を明らかにする上で、TRPA1 の脳内の発現分布は重要な手掛かりとなる。脳内における TRPA1 の発現に関して、申請者が明らかにした脳幹の呼吸中枢 (\*Uchiyama, \*Nakao et al., Curr. Biol. 2020. \*co-first author)を含む領域以外にも発現の報告がなされているが、ほぼ全ての報告でノックアウトマウスを用いたネガティブコントロールが置かれていないことから、偽陽性のシグナルを拾っている可能性があり、真偽の程は定かではない。したがって本研究においては、まず脳部位によってそれぞれ染色条件の最適化を行い、ネガティブコントロールとして *Trpa1* 欠損マウスを使用することで真のシグナルを検出すると同時に、遺伝子改変マウスによる評価も行うことで、TRPA1 の脳内発現パターンを明らかにする。

#### 4 . 研究成果

脳内酸素濃度変動の制御機構の生理的意義の探索のため、脳内の酸素センサータンパク質 TRPA1 を欠損したマウス (*Trpa1* cKO)を用いた行動学的なスクリーニングを行った。特に本研究で着目している感覚に関連する項目を詳細に述べる。感覚・知覚に関連するテストとして、ホットプレートテスト及び聴覚性驚愕反応/プレパルス抑制テストを行ったが *Trpa1* cKO マウス群とコントロール群との差異は認められなかった。オープンフィールドテストにおいては、立ち上がり行動の有意に減弱及び、測定時間の前半において中央区画滞在時間の有意に減弱が観察された。これらの結果と、不安様行動を評価する明暗選択箱テスト及び高架式十字迷路テストにおいて変化がなかったことを併せて考慮すると、*Trpa1* cKO マウスは明るさや高さに対してではなく新規環境等の特定の環境に対する不安様行動は亢進している可能性が示唆された。ポーソルト強制水泳テストでは 1 日目の測定後半で有意に無動時間の減少が、尾懸垂テストでは測定前半で有意に無動時間の減少が観察された。これらの結果は申請者が見出していた *Trpa1* cKO マウスが低酸素環境下で動き続けて気絶する知見 (未発表データ)と一致する結果であり、*Trpa1* cKO マウスは水や低酸素等の特定のストレスを感知できていないことが示唆された。また、興味深いことに日単位での空間記憶の変化も観察された。

また、脳高次機能の神経基盤とされているシナプス可塑性に低酸素が及ぼす影響を、脳スライスを用いた海馬の多点細胞外電位記録による電気生理学的解析により評価した (Nakao et al., Channels 2022)。脳スライスを用いた実験では、95%酸素 5%二酸化炭素をバブリングした溶液を用いることが一般的であり、生理的条件と比較すると極端に酸素濃度が高い条件である。予備的な検討の結果、少しでも酸素濃度を下げると鋭敏かつ大きく応答が減弱することから、改めて神経活動における酸素供給の重要性を示唆する結果となった。

細胞内酸素濃度の測定系として、組織深部のイメージングを見据えた二光子励起顕微鏡とリ

ン光寿命測定装置を組み合わせた実験系を確立した。アストロサイトの脳内酸素センサーとしての機能に着目し、脳の様々な領域から単離したアストロサイトの細胞内酸素濃度分布を評価するため、周囲の酸素濃度変化に伴う細胞内リン光寿命変化を評価したところ、由来する脳部位によって細胞内酸素濃度分布が異なることが明らかとなった。これにより、脳の各領域ごとのアストロサイトの酸素感受性及び周囲環境の生理的な酸素濃度の異種性が示された。

脳内酸素濃度制御機構の脳高次機能に与える影響の検討のため、低酸素感受性チャネル TRPA1 の脳内における詳細な分布を免疫蛍光染色法により評価した。TRP チャネルを含むチャネルタンパク質は疎水性領域が比較的多い膜タンパク質であり、免疫組織染色が一般的に難しいことが知られているため、まずは脳部位によってそれぞれ染色条件の最適化を行うことで実験系を確立し、並行して遺伝子改変マウスによる評価も遂行した。これらの評価により、低酸素感受性チャネル TRPA1 が一次体性感覚野において発現、さらには特定の錐体細胞層に存在することを見出した。これは従来の報告とは異なる興味深い TRPA1 の発現パターンである。各脳領域から単離したアストロサイトの細胞内酸素濃度分布と TRPA1 の発現パターンと併せて考えると、各脳領域によって酸素感知の分子メカニズムが異なり、TRPA1 以外の酸素センシングメカニズムの存在が強く示唆された。一方で低酸素感受性チャネル TRPA1 の普遍的な酸素センシングの分子メカニズムの寄与を示唆するデータも得ている。

低酸素研究で問題となるのが酸素濃度の時空間的な制御である。光によって時空間的に低酸素環境を制御可能な新たな試薬の開発を行った。狙った場所に、望んだタイミングで低酸素環境を作り出す光感受性の酸素スカベンジャーの開発に成功し、細胞レベルで TRPA1 の活性を時空間的に制御することに成功した (Ieda, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2023)。このように光によって酸素を消費できるような試薬は前例がないため、低酸素研究における強力なツールとして期待される。

以上のことにより、体性感覚認知における脳内酸素濃度変動及びその制御機構の生理的意義の一端を明らかにした。

#### <引用文献>

Fukushi et al., *Front. Physiol.* 12:757731 (2021)

Ieda et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 62(20):e202217585 (2023)

Nakao et al., *Front. Behav. Neurosci.* 9, 141 (2015)

Nakao et al., *Channels* 16, 113-126 (2022)

Trung et al., *Sci. Rep.* 11, 2039 (2021)

Uchiyama\*, Nakao\* et al., *Curr. Biol.* 30(17):3378-3396 (2020) \*co-first author

Yoshihara et al., *Anal. Chem.* 87(5):2710-2717 (2015)

## 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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Murano Tomoyuki, Nakajima Ryuichi, Nakao Akito, Hirata Nao, Amemori Satoko, Murakami Akira, Kamitani Yukiyasu, Yamamoto Jun, Miyakawa Tsuyoshi	4. 巻 119
2. 論文標題 Multiple types of navigational information are independently encoded in the population activities of the dentate gyrus neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2106830119	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 Mori Yasuo, Omori Mizuki, Nakao Akito	4. 巻 107
2. 論文標題 Vital but vulnerable: Human TRPV6 is a trade-off of powerful Ca <sup>2+</sup> uptake and susceptibility to epithelial barrier dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102652 ~ 102652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2022.102652	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 Striessnig Jorg, Nakao Akito, Mori Yasuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Voltage-Gated Ca <sup>2+</sup> Channels. Lessons from Knockout and Knock-in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Voltage-Gated Calcium Channels	6. 最初と最後の頁 255 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-031-08881-0_11	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 Nakao Akito, Hayashida Katsumi, Ogura Hiroo, Mori Yasuo, Imoto Keiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Hippocampus-related cognitive disorders develop in the absence of epilepsy and ataxia in the heterozygous Cacna1a mutant mice tottering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Channels	6. 最初と最後の頁 113 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336950.2022.2072449	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 Isato Fukushi, Kotaro Takeda, Mieczyslaw Pokorski, Yosuke Kono, Masashi Yoshizawa, Yohei Hasebe, Akito Nakao, Yasuo Mori, Hiroshi Onimaru, Yasumasa Okada	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/fph ys.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

1. 著者名 Ieda Naoya, Sawada Masato, Oguchi Runa, Itoh Masato, Hirakata Seina, Saitoh Daisuke, Nakao Akito, Kawaguchi Mitsuyasu, Sawamoto Kazunobu, Yoshihara Toshitada, Mori Yasuo, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 62
2. 論文標題 An Optochemical Oxygen Scavenger Enabling Spatiotemporal Control of Hypoxia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202217585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202217585	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8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Akito Nakao
2. 発表標題 The role of TRPA1 channel in hypoxia sensing
3. 学会等名 The 15th Oxford Conference on Modelling and Control of Breathing (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 泰生、中尾 章人、劉 可、高橋 重成
2. 発表標題 酸素センシングにおけるTRPA1チャネルの普遍的役割
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会/第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 家田直弥、澤田雅人、平形政菜、中尾章人、川口充康、澤本和延、吉原利忠、森泰生、中川秀彦
2. 発表標題 光応答性酸素スカベンジャーの開発とTRPA1 チャネルの光制御
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部 第11回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大森 美ずき、中尾 章人、杉原佑太郎、内田雄太、清中茂樹、森泰生
2. 発表標題 精神疾患関連分子CaV1.2 チャネルの膜発現解析
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 家田直弥、澤田雅人、平形政菜、中尾章人、川口充康、澤本和延、吉原利忠、森泰生、中川秀彦
2. 発表標題 光応答性酸素スカベンジャーの開発と低酸素環境の光制御
3. 学会等名 日本薬学会第143 年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Isato Fukushi, Kotaro Takeda, Mieczyslaw Pokorski, Yosuke Kono, Masashi Yoshizawa, Yohei Hasebe, Akito Nakao, Yasuo Mori, Hiroshi Onimaru, Yasumasa Okada
2. 発表標題 Astrocytes mediate the post-hypoxic persistent respiratory augmentation
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川本倫也、中尾章人、Jose Lopez Barneo、森泰生
2. 発表標題 頸動脈小体の低酸素応答機構におけるTRPA1の役割
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林田克海、中尾章人、吉原亨、浅野雅秀、森 泰生
2. 発表標題 電位依存性カルシウムチャネル 4サブユニットコンディショナルノックアウトマウスの作成及び行動解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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