

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592214

研究課題名（和文） 延髄呼吸ペースメーカー細胞のリズム形成機構の解明

研究課題名（英文） Ionic channel mechanisms in oscillatory cellular bursting underlying respiratory rhythm.

研究代表者

山西 整 (YAMANISHI TADASHI)

大阪大学・歯学研究科（研究院）・招へい教員

研究者番号：20397780

研究成果の概要（和文）：

本研究は、呼吸運動のリズム形成中枢として知られる延髄 pre-Bötzinger complex 内の「呼吸ペースメーカー細胞」が発振する「リズム」を形成する細胞膜イオン電流メカニズムを明らかにすることを目的とした。コンピュータ上に構築したイオンチャンネルゲーティングモデルをリアルタイムで処理することにより、特定の電位依存性イオンチャンネルを記録中の神経細胞へコンピューショナルに導入することができる「ダイナミッククランプ法」を用いて、持続性 Na⁺ チャンネルが呼吸ペースメーカー細胞のリズム性バースティング活動を構築するために必須の電位依存性イオンチャンネルであることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

The brainstem pre-Bötzinger complex (pre-BötC), the essential excitatory circuit for respiratory rhythm generation, contains a subset of neurons that exhibit intrinsic rhythmic bursting. The burst initiation is considered to rely on the persistent Na⁺ current (I_{NaP}), but cellular mechanisms that regulate burst frequency and duration are unknown. Using whole-cell patch-clamp, computational modeling, and dynamic-clamp, we provide evidence that I_{NaP} regulates all the essential features of rhythmic burst generation. The results show how the kinetic properties of I_{NaP} orchestrate neuronal oscillatory bursting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

呼吸のリズムは、延髄腹外側に存在する pre-Bötzinger complex (pre-BötC) と呼ばれる神経ネットワークによって形成される

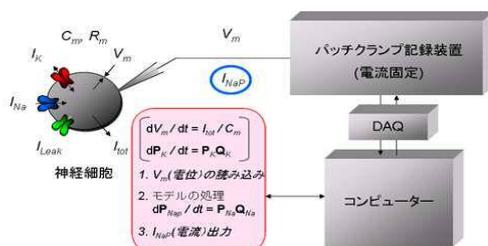
ことが知られている。Pre-BötC では、自らの細胞膜特性で周期性のバースティング活動を発振することができる“ペースメーカー細胞”と“非ペースメーカー細胞”が興奮性シ

ナプスを介してネットワークを形成し、結果としてネットワークレベルで自発的な吸気活動のリズムを発現する。従って、pre-BötC内のペースメーカー細胞は呼吸のリズムを形成する上で非常に重要な役割を果たしていると考えられている。

このリズム性バースティング活動は、持続性 Na⁺電流 (persistent Na⁺ current) と呼ばれる、閾値下で活性を持つ微小な Na⁺電流を薬理的にブロックすることによって消失することから、I_{NaP} が本活動の開始に必須であることが知られている。しかし、薬理的アプローチではバースト活動そのものを遮断するため、「バースト活動 (活動電位の連続発火) の持続時間を決定するメカニズム」、および一つのバースト活動から次のバースト性活動が始まるまでの時間 (サイレントフェイズの時間間隔) を決定するメカニズム、つまり「ペースメーカー細胞が発振する“リズム”を確立するメカニズム」を明らかとすることができなかった。

これらの問題を解決するためには、記録中の細胞上でターゲットとするイオン電流の発現量およびそのキネティック特性を正確に操作する技術が不可欠となるが、これまでそのような操作が可能で実験技術は存在しなかった。

この実験技法上の限界を克服するために、申請者らはコンピュータ上に構築したイオンチャンネルゲーティングモデルをリアルタイムで処理することにより特定の電位依存性イオンチャンネルを記録中の神経細胞へコンピュータシヨナルに導入することができる「ダイナミッククランプ法」によって持続性 Na⁺電流が神経細胞の発火パターン形成に及ぼす影響を解析することのできるシステムを構築した (下図: ダイナミッククランプシステム)。



2. 研究の目的

本研究は、上記のダイナミッククランプ法によって呼吸ペースメーカー細胞のリズム性バースティング活動を構築する電位依存性イオンチャンネルとそのキネティック特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究は、新生仔ラットから抽出し、呼吸中枢と舌下神経運動核および舌下神経運動根を含んだ脳幹スライス標本を用いて、電気生理学的手法によって行った。

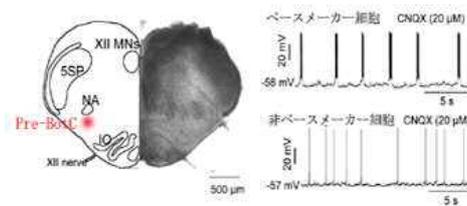


図1 呼吸リズム形成中枢 (pre-BötC) とペースメーカー細胞

このスライス標本上 (下図に示す。同中枢内には呼吸のリズムを形成すると考えられているペースメーカーニューロンと、自身ではリズムを形成しない非ペースメーカーニューロンが混在する。) で、呼吸中枢神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、ボルテージクランプモードにて各種電位波形フォームを用い、持続性 Na⁺電流のチャンネル開閉キネティクスを記録した。それらの記録をもっとも良く説明できるチャンネルゲーティングキネティクスモデルを構築し、持続性 Na⁺チャンネルのチャンネルゲーティングモデルを得た。(下図; モデル構造とパラメータ、右; 呼吸ペースメーカー細胞から計測した I_{NaP} のキネティック特性データ (黒ライン) とモデルによる予測 (緑ライン))

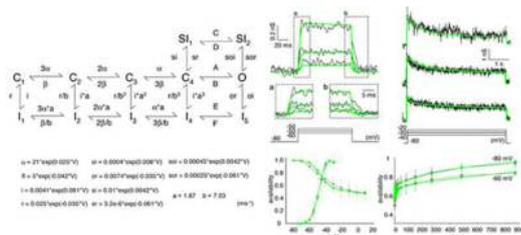


図2 I_{NaP} のチャンネルゲーティングモデルと本モデルを用いたデータフィッティング

同モデルをダイナミッククランプシステム上で用い、呼吸中枢神経細胞上において、持続性 Na⁺電流をコンピュータシヨナルに、リアルタイムノックインおよびノックアウトを行った。

4. 研究成果

初年度の 2010 年度には、非ペースメーカー呼吸中枢神経細胞を対象とし、ホールセルパッチクランプ・ボルテージクランプモードでの記録を用いて、申請者らが数理モデルとして構築した持続性 Na⁺チャンネル数理モデルが実細胞に対してリアルタイムに、実際の持続性 Na⁺チャンネルと同様のチャンネル開閉キネティック特性を示すかどうかを検討した。結果、細胞に適応したボルテージフォームに対する電流反応の持続性 Na⁺電流成分は、チャンネルモデルがリアルタイムでシミュレートした電流応答と非常に類似しており、本数理モデルが、リアルタイムに実細胞上でアーティフィシャルな持続性 Na⁺として働くことが確認された。

2011 年度には、まず、持続性 Na⁺チャンネルのチャンネル開閉キネティック特性の中でも特に、「非活性化からの回復」プロセス

について、より実験数を増して検討を加えた。これは、この持続性 Na⁺チャンネルの「非活性化からの回復」プロセスが、過去の（他研究施設を含めた）研究にてほとんど詳しい検討がなされたことのなかった特性であることに加えて、呼吸ペースメーカー細胞のリズム性バースト活動の周期、つまり呼吸のリズムそのものを形成するのに必須であると考えられたからである。本プロジェクトではカレントクランプモードで記録した細胞膜電位の変化 (ΔV) の情報を基に、コンピュータ上に構築したイオンチャンネルの数理モデルをリアルタイムに演算し、これを人工的なチャンネルとして実細胞上で操作するため、キネティック特性において誤差の大きいモデルを使用すると、それによって得たデータの信頼性が著しく減少する。研究結果をより信頼性の高いものとするために、持続性 Na⁺チャンネルの「非活性化からの回復」プロセスを再検討した。検討の結果、申請者らが構築したオリジナルの持続性 Na⁺チャンネルモデルは対象とする神経細胞の「非活性化からの回復」プロセスに対して、実細胞上では全体的にわずかに小さい時定数を示すことが明らかとなった。これらの実験結果から得られたキネティック特性を元に、再度数理モデルのパラメータセットの探索を行った結果、実細胞上にて「非活性化からの回復」プロセスを十分に満足のいく精度で再現することができるモデルを再構築した。

2012年度には、新生仔ラットから抽出した延髄スライス標本内で機能的に活動を継続している呼吸中枢神経細胞に対して、アーティフィシアルな持続性 Na⁺電流のノックインおよびノックアウトを行った。

呼吸ペースメーカー細胞に対して、ダイナミッククランプシステムによって持続性 Na⁺電流のノックアウトを行ったところ、細胞は周期性バースト活動形成能を失い、単発性の発火のみを示すことが明らかとなった。この効果は、ダイナミッククランプによる持続性 Na⁺電流のノックアウトを解除すると消失し、細胞は再度周期性のバースト活動形成を行うことが確認された。

次に呼吸中枢内の非ペースメーカー細胞に対して、持続性 Na⁺電流のノックインを行った。非ペースメーカー細胞は自身では周期性のバースト活動形成能を持たない細胞として知られている。持続性 Na⁺電流のノックインを行うと、ペースメーカー細胞と非常に類似した特長を持つ周期性バースト活動の形成が認められた。ペースメーカー細胞との類似は、バースト活動の特徴だけでなく、その周期性にも強く認められた。

これらの結果の詳細な解析を行うことによって、呼吸ペースメーカー細胞のリズムは、持続性 Na⁺チャンネルの「非活性化からの回

復」プロセスに依存することを明らかとした。

実データに基づいた数理モデルを用いて、リアルタイムにてコンピューショナルにイオン電流をノックイン、ノックアウトする手法は、これまで一般的に行われてきた薬理学的アプローチの限界を克服するものである。本研究によって、これまで得られることのなかった、呼吸ペースメーカーニューロンにおける持続性 Na⁺チャンネルの詳細なチャンネル開閉キネティクス、それを詳細に説明し得る数理モデルが明らかとなったばかりではなく、持続性 Na⁺チャンネルの「非活性化からの回復」プロセスが呼吸ペースメーカー細胞のリズム形成に必須であることを示すことができた。

以上の成果は、呼吸活動の生理学のイオンチャンネルメカニズムを理解する上で非常に大きな成果であったと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①Ishimoto S, Wada K, Tanaka N, Yamanishi T, et al. Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology. 40, (2012), 1011-1019.

②Yamanishi T, Nishio J, et al. Early two-stage double opposing Z-plasty or one-stage push-back palatoplasty?: comparisons in maxillary development and speech outcome at 4 years of age. Annals of Plastic Surgery. 66, (2011), 148-153.

[学会発表] (計2件)

①青海哲也、山西 整、原田 丈史ら、Working Heart Brainstem Preparation を用いた嚥下活動の解析、第57回日本口腔外科学会総会・学術大会、2012. 10. 20、パシフィコ横浜会議センター、弘前大学

②山西 整、原田 丈史ら、不確縫線核ニューロンによる呼吸恒常性の維持機構、第55回日本口腔外科学会総会・学術大会、2010. 10. 17、幕張メッセ、東京歯科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 整 (YAMANISHI TADASHI)

大阪大学・歯学研究科 (研究院)・招へい教員

研究者番号: 20397780

(2) 研究分担者

宮 成典 (MIYA SHIGENORI)

大阪大学・歯学研究科 (研究院)・助教

研究者番号：00397762

(2011年度まで研究分担者として参画)

(3)研究分担者

谷口 佳孝 (TANIGUCHI YOSHITAKA)

大阪大学・歯学研究科 (研究院)・招へい
教員

研究者番号：10551468

(4)研究分担者

谷口 佳孝 (TANIGUCHI YOSHITAKA)

大阪大学・歯学研究科 (研究院)・招へい
教員

研究者番号：10551468

(5)研究分担者

石橋 美樹 (IHSIBASHI MIKI)

大阪大学・歯学研究科 (研究院)・招へい
教員

研究者番号：40412051