

## 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 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890109

研究課題名（和文） 縫線核による中枢神経内呼吸恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文） Research of respiratory response induced by raphe obscurus neurons to hypoxic condition through activating medullary respiratory center.

研究代表者 原田 文司 (HARADA TAKESHI)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00403030

研究成果の概要（和文）：

大脳の呼吸中枢と結合する縫線核神経細胞の中でも、外側亜核と正中亜核では低酸素刺激に対する反応性の違いが見出された。これらは、他の神経細胞からの入力を受けた脱分極変化ではなく、縫線核神経細胞の神経細胞膜特性によるものであった。また、神経細胞末端からのセロトニンの分泌が、呼吸中枢神経細胞の膜特性を変化させ、呼吸ペースメーカー細胞の数を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Raphe nucleus neuron, which is projecting to the respiratory center in the cerebrum, responded to hypoxic stimulation differently between outside sub-nuclei and median sub-nuclei. These changes of the depolarization had not received input from other neuron. These were due to characteristics of membrane of Raphe nucleus neuron. Serotonin from Raphe nucleus neuron terminal controlled number of pacemaker in the respiratory center.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011 年度 | 1,090,000 | 327,000 | 1,417,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,290,000 | 687,000 | 2,977,000 |

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：低酸素センサー、呼吸活動、縫線核、セロトナージックニューロン、パッチクラ  
ンプ

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、新生仔ラットを用いたこれま

での研究において、延髄正中に位置する縫線核セロトナージックニューロンの外側亜集

団が、(1) 低酸素刺激に反応して著しく活動性を上昇すること、(2) 延髄腹側の呼吸中枢ニューロンへ直接投射していることを見出した。縫線核セロトナージックニューロンは、投射軸索末端のシナプスよりセロトニンを放出することによって、呼吸中枢神経細胞膜のリーク電流を減少させ脱分極に導くことが見出されている。つまり、縫線核セロトナージックニューロンから分泌されたセロトニンは呼吸中枢を活性化し呼吸運動を賦活化すると考えられる。よって、上記のプレリミナリーなデータは、この縫線核セロトナージックニューロンが呼吸運動に対する中枢神経内の低酸素センサーとして機能していることを示唆しているため、本研究では「縫線核セロトナージックニューロンの亜集団が低酸素環境への暴露によって、呼吸活動を不活化する」という仮説を検証することを目的とした。

これまで、縫線核セロトナージックニューロンが  $\text{CO}_2/\text{H}^+$  感知能を持つことは知られているものの、低酸素感知機能を持つとする報告はない。さらに、生体内の低酸素センサーとしては、これまで頸動脈小体のグロムス細胞および肺上皮細胞は同定されているものの、中枢神経内に同定されたものは無かった。本研究の仮説が検証されると、「呼吸運動の低酸素応答メカニズム」と「縫線核セロトナージックニューロンによる呼吸調節」という2つの知識が繋がり、睡眠時無呼吸症候群や乳幼児突然死症候群などの病態の解明の一助となると考えられた。

## 2. 研究の目的

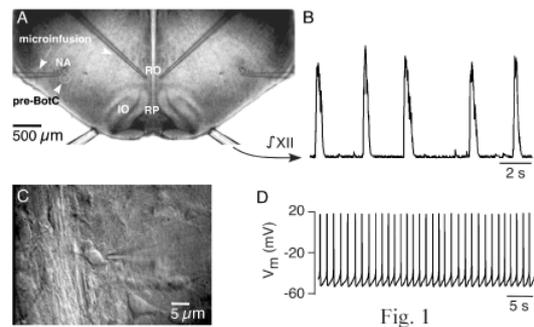
本研究は、低酸素環境に対する呼吸運動の応答を制御する中枢神経機構を明らかにすることを目的とした。

本研究の仮説は「縫線核セロトナージック

ニューロンの亜集団が低酸素環境への暴露によって、呼吸活動を賦活化する」である。同仮説を検証するために、(1) 縫線核ニューロンの部位による低酸素刺激に対する反応性の違いを明らかとし、(2) 縫線核内の亜部位を低酸素刺激した際の呼吸活動の変化を明らかとした。さらに(3) 低酸素刺激に反応して活動性を上昇する縫線核セロトナージックニューロンの解剖学的位置および軸索投射をより詳細に明らかとすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

研究には生後0-3日のSD系ラットから抽出した、厚さ  $300\ \mu\text{m}$  の延髄スライス標本を用いた (Fig. 1)。



本スライス標本は、縫線核ニューロン、呼吸中枢神経細胞群、舌下神経運動核および舌下神経運動根を含み、さらにそれらの機能的ネットワークが生体内と同様に温存されている (図 A)。

従って、本スライスに温存されている舌下神経運動根から神経活動の記録を採取すると、5-10 秒毎に周期的に認める自発的な呼吸活動 (吸気活動) を記録することができる (図 B)。スライス正中部の縫線核ニューロン (図 C) から神経細胞の活動記録を採取すると、定常状態で 1Hz 程度の周期性を持った持続的な活動を認める (図 D)。

神経細胞の記録にはホールセルパッチクランプテクニックを用い、電流固定法にて記

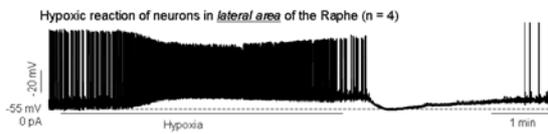
録を行った。いくつかの実験では、パッチクランプ記録の際のピペット内ソリューションにバイオサイチン (0.8%/w) を加え、神経細胞記録を行った細胞および軸索の染色を行った。

さらにいくつかの記録では、先端径を 50  $\mu\text{m}$  以下に調節したガラスピペットを用い、スライス正中部の縫線核へ薬物のマイクロインジェクションを行いながら、舌下神経運動根からの細胞外記録および呼吸中枢神経細胞からのパッチクランプ記録を同時に行った。

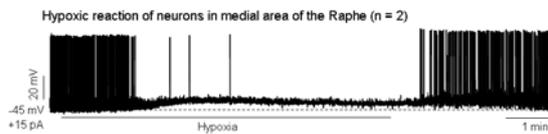
記録を行った縫線核ニューロンがセロトナージックであることを確認するため、神経活動の記録を終えたスライスに対し、抗 TPOH 抗体にて染色を行った。

#### 4. 研究成果

縫線核の外側亜核に、低酸素刺激によって脱分極し自発的な活動が活性化される縫線核ニューロンが見出された (下図)。



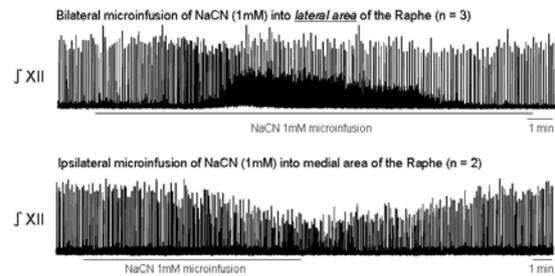
それに対して、縫線核の正中亜核では低酸素刺激によって脱分極するものの、自発的な活動が消失するニューロンが確認された (下図)。



縫線核ニューロンの部位による低酸素刺激に対する反応性が異なり、これらの縫線核ニューロンの低酸素にたいする脱分極反応は、バスソリューションにテトロドトキシン (TTX, 1  $\mu\text{M}$ ) およびカドミウム (Cd, 10  $\mu\text{M}$ ) を加えた後も認められたことから、他の神経細胞から興奮性入力を受けた2次的な脱分極

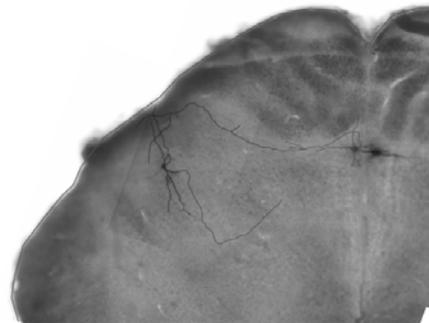
ではなく、これらの縫線核ニューロンの神経細胞膜特性によるものであると考えられた (データ示さず)。

これらの亜部位に対して、人工的な低酸素刺激となる NaCN (1mM) をマイクロインジェクションしたところ、外側亜核に対するマイクロインジェクションでは舌下神経から記録された自発的かつ周期的な呼吸活動が著明に活性化されたのに対し (下図 上)、正中亜核に対するマイクロインジェクションでは呼吸活動の周期に変化は認めず、活動振幅の減少を認めた (下図 下)。

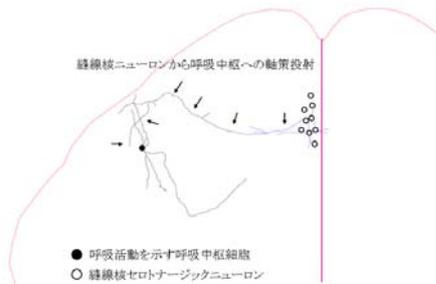


縫線核セロトナージックニューロンが呼吸中枢へ軸索投射していると仮説すると、呼吸活動におけるこれらの変化は、軸索末端シナプスからのセロトニンの分泌により、呼吸中枢神経細胞を活性化し、調整していることを示唆する結果と考えられる。

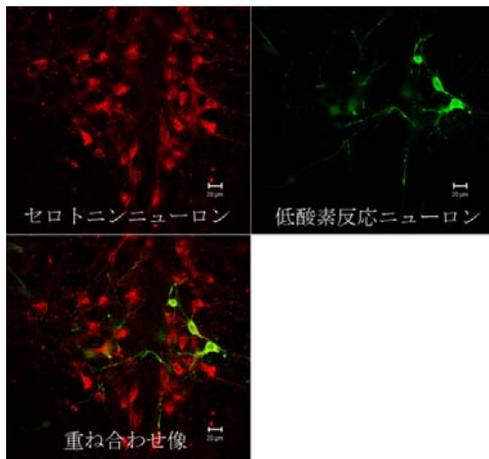
次に、低酸素刺激に対して活動性を上昇させる縫線核ニューロンをバイオサイチンにて染色し、解剖学的位置を確認するとともに、呼吸中枢に対しての軸索投射を検索した。



低酸素反応を示した縫線核ニューロンおよび呼吸中枢ニューロンのバイオサイチン染色図を示す。



上記記録の図に、低酸素に対する反応性が確認された縫線核ニューロンの位置を重ね合わせた。



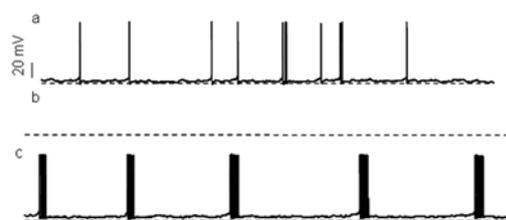
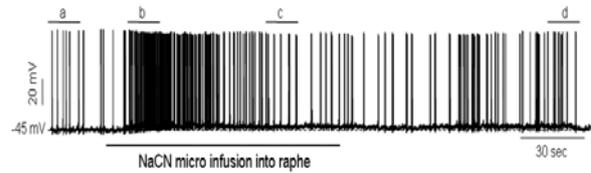
さらに、抗 TPOH 抗体を用い電気生理学的記録および軸索投射を確認したニューロンがセロトナージックであることを確認した。

上記実験にて、低酸素反応性を持つ縫線核ニューロンは、(1)セロトナージックであり、(2)呼吸中枢ニューロンが存在する領域へ軸索投射することが確認された。

これらの実験により、延髄正中の縫線核内に、細胞自身の膜特性によって低酸素に反応して脱分極した結果、神経活動を活性化する神経細胞が存在することが見出され、これらの細胞はセロトナージックであること、さらに呼吸中枢神経細胞へ軸索投射していることが示された。

さらに、縫線核外側亜核部へ NaCN をマイクロインフュージョンしながら呼吸中枢神経細胞記録を行った結果、呼吸のペースメイキングバースト活動を示さない呼吸ニュー

ロンが、自発的にリズム性バースト活動を示すペースメーカー細胞へと表現型を変化させることが見出された。



最上段にスライス標本内の呼吸中枢神経細胞からのホールセルパッチクランプ電流固定記録を示す。縫線核外側亜核への NaCN マイクロインフュージョンによって、呼吸のペースメイキングバースト活動を示していなかった呼吸ニューロン (中段 a) が、呼吸ペースメーカー細胞としての表現型を獲得した (下段 c)。

新生仔ラット延髄スライス標本を用いた上記の研究結果より、「縫線核セロトナージックニューロンの亜集団が低酸素環境への暴露によって、呼吸活動を賦活化する」という本研究の仮説が検証された。さらに、縫線核ニューロンによる賦活化は、軸索末端シナプスからのセロトニンの分泌によって、呼吸中枢神経細胞の膜特性を変化させ、呼吸ペースメーカー細胞の数を制御することによって行われていることが示唆された。

本研究によって、縫線核ニューロンの呼吸活動に対する制御メカニズムの一端を明らかにしたばかりではなく、呼吸中枢ニューロンにおける呼吸ペースメーカー細胞の役割まで示唆を与える成果を得ることができた。

今後は、どのようなイオンチャンネルメカニズムによって縫線核ニューロンが呼吸ペ

ースメーカーニューロンの数を制御しているか、という問いが問題の焦点となると考えられた。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 原田丈司、相川友直、石濱孝二、樋口将隆、牛村彩子、田中晋、石橋美樹、永谷俊介、奥野恵実、山本奈穂、木田久美子、田中輝、程壮樹、飯田征二、古郷幹彦：口唇裂・口蓋裂に伴う上顎骨劣成長に対する上顎骨前方部骨延長術 (MASDO) の検討. 第 21 回日本顎変形症学会総会、2011 年 6 月 17 日、学術総合センター (東京).
- ② 田中徳昭、沢井奈津子、原田丈司、大倉正也、古郷幹彦：口腔癌 N0 頸部の治療方針に関する決定樹解析と治療閾値. 第 35 回日本頭頸部癌学会、2011 年 6 月 10 日、ウイנקあいち (愛知).
- ③ 山西整、原田丈司、石濱孝二、森本泰成、宮成典、辻忠孝、大槻浩一、古郷幹彦：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、2010 年 10 月 17 日、千葉幕張メッセ (千葉).
- ④ 原田丈司、山田謙一、沢井奈津子、住岡聡、山西整、大倉正也、古郷幹彦：頸部廓清術における副神経麻痺の評価. 第 55 回日本口腔外科学会総会、2010 年 10 月 17 日、千葉幕張メッセ (千葉).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 丈司 (HARADA TAKESHI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00403030