

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790803

研究課題名(和文)呼吸における神経可塑性の役割 - 睡眠中の上気道開存について

研究課題名(英文)Respiratory neuroplasticity- upper airway patency during sleep

研究代表者

寺田 二郎(Terada, Jiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20400898

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)：睡眠・覚醒変化と低酸素・高二酸化炭素・間欠的低酸素刺激などの環境変化に伴う呼吸増強(抑制)を評価する目的で、EEG/EMGラジオテレメトリーシステムとWhole body plethysmographyを用いて無麻酔無拘束下動物の呼吸解析を行った。前者を用いて睡眠・覚醒中の横隔膜・呼吸補助筋の筋活動が測定できたが上気道開大筋は嚥下や咀嚼などの舌活動によるアーチファクトが強く低酸素前後などの比較評価が困難であった。一方後者を用いて呼吸増強作用が期待される新規覚醒刺激薬モダフィニル投与後の呼吸を評価したが、当初の仮説に反して呼吸増強作用は認められず、むしろ抑制効果をもつことが示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed respiration in unanesthetized rodents using EMG/EEG radiotelemetry system and whole body plethysmography to evaluate respiratory change during/after hypoxia, hypercapnia, and intermittent hypoxia in each sleep-wake state. Diaphragm EMG was detected in unanesthetized rats during sleep and wakefulness. Genioglossus EMG was also detected, but artifacts caused by chewing, swallowing was contaminated in unanesthetized condition. Therefore, the respiratory change in genioglossus was not able to be evaluated. On the other hands, respiration during wakefulness and sleep after administration of novel wake-promoting agent modafinil, which is expected to promote respiration, was evaluated. But the results of the present study were not consistent with our original hypothesis that modafinil enhances ventilation with promoted wakefulness. Unexpectedly, the results showed that modafinil suppressed ventilation in room air and hypercapnic responses.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：呼吸の神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

神経可塑性とは、外界からの様々な刺激に応じてシナプスを機能的、構造的に変化させ伝達効率を調節するという神経系に本来備わる基本的性質であり、記憶/学習、発生/発達、神経障害回復に重要な役割を果たしている。この神経可塑性の機構解明は、記憶/学習における海馬や小脳における研究が中核をなしているが、それら以外にも様々な中枢神経領域でその存在と機能が示唆されている。

一方、呼吸における神経可塑性は、繰り返す頸動脈小体の電気刺激によりもたらされる横隔神経活動の増強として 1980 年に米国で初めて報告されており、以後ネコ、イヌ、アヒル、ラット、マウスなど様々な動物で確認されている。特に近年では呼吸における神経可塑性の研究モデルとして短時間の間欠的低酸素刺激、セロトニンの間欠的頸髄内投与などによって発現する横隔神経の長期呼吸増強(Long-term facilitation: LTF; 図 1 参照)が確立され、その分子基盤、生理学的意義、臨床応用に向けた研究が注目されている。

Phrenic long-term facilitation (pLTF)

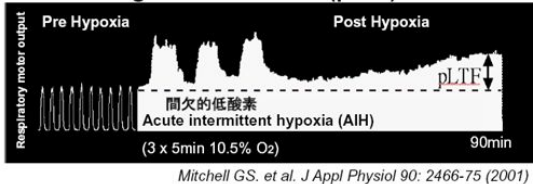


図 1 呼吸・横隔神経の長期増強 (pLTF) 麻酔下・人工呼吸管理下ラットにおいて、間欠的低酸素刺激後に横隔神経活動の増強 (pLTF) を認めた。

<無麻酔無拘束下における LTF 発現>

LTF 研究の多くは、麻酔下、人工呼吸管理下、筋弛緩薬使用下動物を用いた神経生理実験とその分子機構の解明 (図 2 参照) についてが主になされており、より実臨床に近い無麻酔無拘束下における睡眠、覚醒時の呼吸出力がどのように変化するか、詳細はほとんど明らかにされていなかった。そこで我々は、2008 年に無麻酔無拘束マウスにおいて、5 分 × 5 回の間欠的低酸素刺激後の ventilatory LTF (分時換気量増加) の発現を明らかにした (Terada J, et al. 2008 *J Appl Physiol*)。またそれは、呼吸回数ではなく一回換気量の増加によってもたらされること、覚醒時よりも徐波睡眠中により強く発現することをラットの実験にて明らかにした (Nakamura A, Terada J, et al. 2010 *J Appl Physiol*)。次にラジオテレメトリー法を用いて、その一回換気量の増加は横隔膜筋活動の増強によるものであることを明らかにした (Terada J, et al. 2011 *J Appl Physiol*)。これらの研究成果

により、横隔神経における LTF (pLTF) は、横隔膜の筋活動増加をもたらす、呼吸の LTF (ventilatory LTF) を発現させることと考えられた (図 2)。

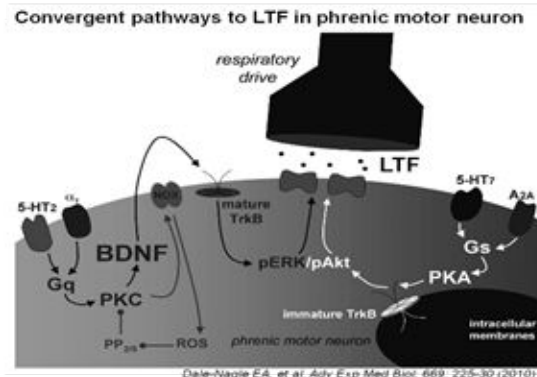


図 2 横隔神経における長期呼吸増強のメカニズム

LTF (長期呼吸増強) は、横隔神経核 (下) へのセロトニンを介したシグナルが、BDNF (脳由来神経成長因子) などの蛋白合成を促すことで生じると考えられている。BDNF を介したシグナルは、横隔神経の呼吸出力に重要であるグルタミン酸のレセプターを神経終末に集合させることで呼吸出力を増強すると考えられる。

<上気道筋 LTF>

上述のように LTF 研究は、横隔神経の神経活動を測定する神経生理学的実験と横隔神経核を用いた分子生物学的実験が中心であったが、同様に呼吸ニューロンである舌下神経にも LTF が存在することが報告されている。しかし舌下神経 LTF の生理学的意義は明らかになっておらず、また睡眠中の上気道開大筋の増強を直接示す明らかな実験結果は未だない。本研究では、無麻酔無拘束ラットの睡眠中における上気道開存に着目して、舌下神経 LTF が最大上気道開大筋であるオトガイ舌筋を中心に LTF をもたらすかを検討するものである。LTF の臨床応用として閉塞型睡眠時無呼吸障害をはじめとする睡眠呼吸障害の新たな治療法開発への可能性が期待され、舌下神経核における LTF の分子基盤の解明とともに、呼吸の LTF の生理的意義を明らかにする。

2. 研究の目的

睡眠・覚醒の変化と低酸素・高二酸化炭素・間欠的低酸素刺激などの環境変化に伴う呼吸増強・抑制 (神経可塑性) の存在をより明らかにすること。特に上気道開大筋を制御する舌下神経にも同様に神経可塑性が発現するか、特に短時間の間欠的低酸素刺激が、上気道開大筋であるオトガイ舌筋の筋活動増強を促進するかを明らかにすること。

3. 研究の方法

オトガイ舌筋筋電図測定

具体的には、呼吸、オトガイ舌筋及び横隔膜筋電図、脳波、中心体温を体外から長期間測定できる遠隔装置をラット体内に埋め込み、短時間の間欠的低酸素後の覚醒、徐波睡眠、レム睡眠毎の呼吸出力を検出する。もし睡眠/覚醒中の上気道開大筋及び呼吸筋増強（可塑性）が示されれば、LTF の機構解明の研究が、閉塞性睡眠時無呼吸症候群を含めた睡眠呼吸障害の内科的治療開発の進展に有用となる可能性が考えられる。

EEG/EMG ラジオテレメトリーシステムと Whole body plethysmography

申請者が、ウィスコンシン大学と共同研究で立ち上げた横隔膜筋電図に用いた手法を用いる（Terada J, et al. 2011 J Appl Physiol）。体内に筋電図、脳波を測定できるテレメトリーを埋め込む。同システムを用いる事で無麻酔無拘束下ラットの核体温、睡眠・覚醒ステージ、上気道開大筋活動を間欠的低酸素刺激前後（下記参照）で測定することが期待された。同時に Whole body plethysmography を用いた呼吸の測定を行い低酸素換気応答、高二酸化炭素換気応答の有無、薬物投与における呼吸増強の効果を確認する。呼吸測定と上気道開大筋同時検出を目指した。

4. 研究成果

これまで申請者は、無麻酔無拘束動物を用いて、間欠的低酸素後の長期呼吸増強として whole body plethysmography を用いた実験系での分時換気量の増加、ラジオテレメトリーを使った実験系で横隔膜筋電図の増強を報告した。今回はウィスコンシン大学との共同研究として、無麻酔無拘束動物を用いた筋電図測定の実験系でオトガイ舌筋の可塑性を示すことに挑戦し、ラットを用いて手術を行いオトガイ舌筋の筋電図電極を植え込み、無麻酔無拘束状態で筋電図を測定することができた(図 3)。

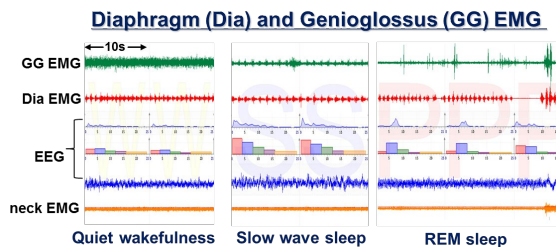


図 3. ラジオテレメトリー法を用いた、無麻酔無拘束下の徐波睡眠中、REM 睡眠中、覚醒中の横隔膜及びオトガイ舌筋筋電図（最上段：GG, genioglossus; 2 段目：Dia, diaphragm; 3 段目：脳波; 4 段目：頸部筋電図。Quiet wakefulness, 覚醒; slow wave

sleep, 徐波睡眠)

しかし短時間の測定は可能であったが、麻酔下の安定した状況とは異なり、無麻酔無拘束下では、licking, swallowing, chewing などの呼吸（上気道開大）以外の舌活動によるアーチファクトが非常に強く、間欠的低酸素前後での比較評価が困難であった。特に、低酸素中の覚醒時の筋電図は、呼吸以外の活動がメインであり再現性の高い研究成果を示すには至らなかった。一方、横隔膜以外の呼吸補助筋の筋電図を測定することが可能であった (Navarrete-Opazo A, et al. J Appl Physiol 2014. Navarrete-Opazo A, et al. Exp Neurol 2016)

一方、whole body plethysmography を用いたマウスでの呼吸・脳波の同時測定は可能であり（脳波スペクトラム解析含む、図 4 参照）

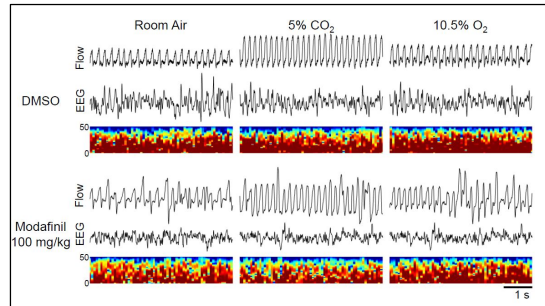


図 4 Whole body plethysmography により得られた室内気、高二酸化炭素、低酸素環境下のマウスの呼吸と脳波（上段：DMSO, dimethyl sulfoxide; 下段：modafinil 100mg/kg 腹腔内投与）

無麻酔無拘束マウスにおける高二酸化炭素、低酸素暴露における呼吸測定実験の成果をまとめた。特に臨床応用されているモダフィニルを用いた低酸素、高二酸化炭素換気応答の結果の解析が終了し、論文化の段階に到達した（2016 年 5 月現在投稿中）。特に新規覚醒刺激剤であるモダフィニルの呼吸器に対する長期増強効果について検討した。モダフィニルは強い覚醒刺激を有し、他の薬剤と同様呼吸刺激作用があることが予想された。しかし予想に反して、呼吸刺激作用（増強作用）はなく、むしろ抑制的に作用することが証明された（図 5-6）。

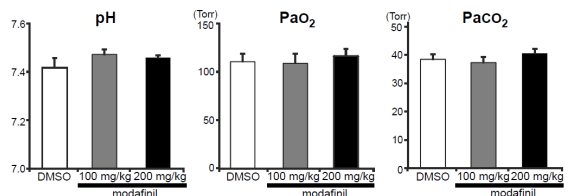


図 5 モダフィニル投与後の血液ガスの変化 (ラット)
 モダフィニル投与(100-200mg/kg)により覚醒が促進されたが、動脈血液ガス分析では変化を認めなかった。

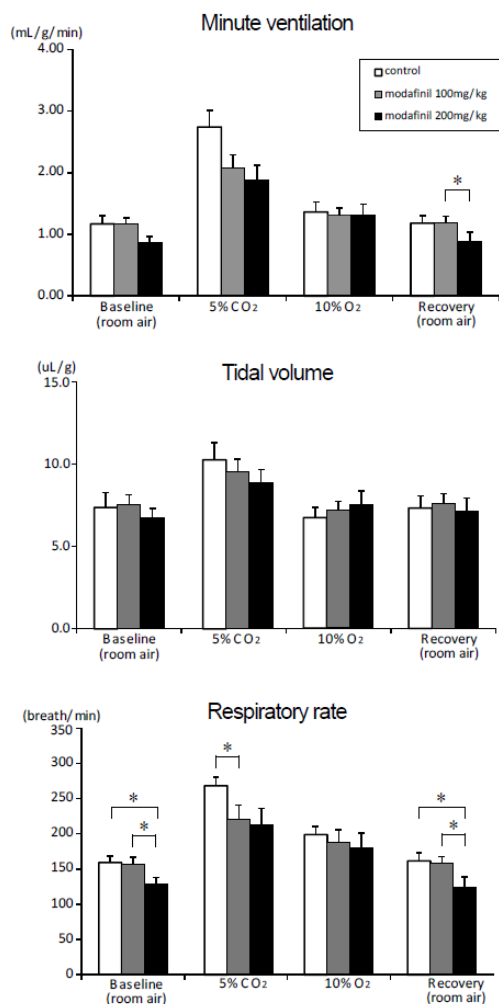


図 6 モダフィニル投与後の呼吸の変化 (マウス)

モダフィニル投与(100-200mg/kg)により覚醒が促進されたが、呼吸は促進されず、むしろ抑制される傾向を認めた。

本研究結果より、無麻酔無拘束下での上気道開大筋(オトガイ舌筋)活動は他の舌活動を除外することが困難であること、呼吸増強作用が期待された覚醒刺激薬モダフィニルには呼吸増強作用がなくむしろ抑制効果があることが示された。以上より、睡眠・覚醒ステージ毎の低酸素・高二酸化炭素・間欠的低酸素刺激後の呼吸の変化は多様性に富んでいることが示唆され、引き続きこれらを正確に評価できる実験系の確立が望まれる

ると考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7件)

1. **Terada J**, Fukushi I, Takeda K, Hasebe Y, Pokorski M, Tatsumi K, Okada Y. Modafinil promotes wakefulness but does not stimulate the respiratory control system in rodents. Sleep 2016 (submitted) 査読あり
2. Nishimura R, Nishiwaki T, Kawasaki T, Sekine A, Suda R, Urushibara T, Suzuki T, Takayanagi S, **Terada J**, Sakao S, Tatsumi K. Hypoxia-induced proliferation of tissue-resident endothelial progenitor cells in the lung. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 2015: 308(8): L746-758. 査読あり
3. Sakao S, Sakurai T, Yahaba M, Sakurai Y, **Terada J**, Tanabe N, Tatsumi K. Features of REM-related Sleep Disordered Breathing in the Japanese Population. Internal medicine 2015: 54(12): 1481-1487. 査読あり
4. Tsukahara M, Sakao S, Jujo T, Sakurai T, **Terada J**, Kunii R, Tanabe N, Tatsumi K. The accuracy and uncertainty of a sheet-type portable monitor as a screening device to identify obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. Internal medicine 2014: 53(12): 1307-1313. 査読あり
5. Inagaki T, **Terada J**, Tanabe N, Kawata N, Kasai H, Sugiura T, Shigeta A, Asano Y, Murata A, Tsushima K, Tada Y, Sakao S, Tatsumi K. Home-based pulmonary rehabilitation in patients

with inoperable or residual chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a preliminary study. Respiratory investigation 2014; 52(6): 357-364. 査読あり

6. Yamada Y, **Terada J**, Tatsumi K, Kono C, Tanno M, Takemura T, Yamaguchi T. Respiratory bronchiolitis and lung carcinoma. Respiratory investigation 2013; 51(3): 184-190. 査読あり
7. Matsuura Y, Kawata N, Yanagawa N, Sugiura T, Sakurai Y, Sato M, Iesato K, **Terada J**, Sakao S, Tada Y, Tanabe N, Suzuki Y, Tatsumi K. Quantitative assessment of cross-sectional area of small pulmonary vessels in patients with COPD using inspiratory and expiratory MDCT. European journal of radiology 2013; 82(10): 1804-1810. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 國井 玲子, 櫻井 隆之, 坂尾 誠一郎, **寺田二郎**, 櫻井 由子, 矢幅 美鈴, 川田 奈緒子, 巽 浩一郎. AHI<20 での CPAP 療法 定義変更による PSG 結果の再解析からの検討. 日本臨床生理学会 (2015.10.31) 大宮
2. 矢幅 美鈴, **寺田二郎**, 川田 奈緒子, 櫻井 由子, 櫻井 隆之, 坂尾 誠一郎, 田邊 信宏, 巽 浩一郎. 閉塞性睡眠時無呼吸症候群患者における MDCT を用いた呼吸障害と睡眠効率の検討. 日本呼吸器学会学術講演会 (2015.04.18) 東京
3. 川田 奈緒子, **寺田二郎**, 巽 浩一郎. 睡眠呼吸障害の病態生理と治療 肺胞低換気症候群における CPAP 治療により改善しない高炭酸ガス血症の検討. 日本呼吸器学会学術講演会 (2015.04.18) 東京
4. 櫻井 由子, **寺田二郎**, 内山 智之, 樋口 佳則, 山中 義崇, 山田 真子, 野村 文夫, 佐伯 直勝, 桑原 聡, 巽 浩一郎. 睡眠呼吸障害の病態生理と治療 パーキンソン病患者の睡眠呼吸障害と深部脳刺激療法の長期効果について日本呼吸器学会学術講演会 (2015.04.18) 東京

〔図書〕(計 4 件)

1. 櫻井由子, **寺田二郎**, 天野佳子, 山川みどり, 巽浩一郎. 【生活習慣病-新しい展開】 見直された生活習慣病と疾患

睡眠時無呼吸症候群. 臨牀と研究 2016;93(1):71-76 大道学館.

2. **寺田二郎**. 睡眠時無呼吸症候群. 今日の治療指針 (2014) 325-326, 2014 医学書院.
3. 巽浩一郎, 坂尾誠一郎, **寺田二郎**. 【最新肥満症学-基礎・臨床研究の最前線-】肥満に起因ないし関連する疾患 成立機序・病態・管理・治療 睡眠時無呼吸症候群. 日本臨床 2014;72(増刊 4 最新肥満症学):609-13 日本臨床社.
4. 巽浩一郎, 坂尾誠一郎, **寺田二郎**, 櫻井隆之. 慢性心不全、慢性呼吸不全に対する在宅酸素療法(HOT)の治療効果. 循環器内科 2013;74(1):54-60 科学評論社.

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺田 二郎 (TERADA JIRO)

千葉大学 大学院医学研究院 助教

研究者番号: 20400898