

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460311

研究課題名(和文) 延髄アストロサイトがトリガーする呼吸リズム形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of respiratory rhythm generation triggered by medullary astrocytes

研究代表者

岡田 泰昌 (Okada, Yasumasa)

独立行政法人国立病院機構村山医療センター(臨床研究部)・電気生理学研究室・室長

研究者番号：80160688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生命維持に必須な呼吸リズム形成のメカニズムは未解明である。本研究では、脳幹部グリア細胞、特にアストロサイトが、呼吸リズム形成と低酸素呼吸応答に関与しているかを明らかにするため、ラット摘出脳幹脊髄標本において延髄腹外側部の細胞活動をカルシウムイメージング法により解析した。その結果、呼吸出力に同期したアストロサイトの存在が確認された。また、高度の低酸素を負荷した無麻酔のマウスでは、まず呼吸増強が、その後に呼吸抑制が認められたが、アストロサイトの活性化を阻害すると、低酸素負荷時の呼吸が減弱した。以上より、アストロサイトは、呼吸リズム形成および低酸素性呼吸応答において重要な働きをしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Continuously generated respiratory rhythm is essential to maintain life. However, the mechanism of respiratory rhythm generation has not been fully elucidated. Recent advances in glial physiology have indicated that glia cells especially astrocytes play important roles in various brain functions. To clarify the role of astrocytes in respiratory control, we analyzed activities of neurons and astrocytes in the ventrolateral medulla in the isolated brainstem spinal cord preparation of neonatal rats by calcium imaging, and found respiratory modulated astrocytes that were spontaneously oscillatory even in the absence of neuronal activity. In unanesthetized mice, ventilatory responses to hypoxia were attenuated in the presence of arundic acid that inhibits astrocytic activation. These findings suggest that astrocytes play vital roles in central respiratory control in particular in respiratory rhythm generation as pacemaker cells and in hypoxic respiratory responses as hypoxic sensor cells.

研究分野：呼吸神経生理学

キーワード：呼吸調節 呼吸リズム形成 低酸素呼吸応答 脳幹 延髄 グリア細胞 アストロサイト カルシウムイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生命の維持には、安静時、運動時、睡眠時も含め、常に呼吸リズムが形成されている必要がある。呼吸リズム形成のメカニズムについては、従来、興奮性と抑制性のニューロンによって構成されるニューロンネットワークによるとするネットワーク説、およびペースメーカーニューロンの活動に牽引されることによるとするペースメーカー説の2つの学説が提唱されてきたが、いずれの学説とも矛盾した実験結果が得られており、呼吸リズム形成のメカニズムは未解明であった。

(2) 最近、グリア細胞、特にアストロサイトは、ニューロン活動を支配し、様々な脳機能の発現において積極的な役割を果たしていることが明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、延髄呼吸中枢において、アストロサイトが呼吸リズム形成に参与しているか否かを、また、低酸素に曝露された動物の呼吸リズムの維持にアストロサイトが参与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 呼吸リズム形成の場である延髄腹外側部の pre-Botzinger complex (preBotC) 領域のニューロンとアストロサイトの活動を計測するため、新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いてカルシウムイメージングを行った。実験では、preBotC 吻側レベルで延髄を横切断し、その断面から preBotC 領域にカルシウム蛍光色素 Oregon Green を注入し、頸髄 C4 前根の吸息性神経出力を記録しつつ、共焦点顕微鏡下で preBotC 領域の細胞活動を計測した。通常的人工脳脊髄液による灌流下でのコントロール計測の後、標本に TTX を投与してニューロン活動のみを抑え、さらに、灌流液のカリウム濃度を 0.2 mM へ低下させてアストロサイトのみに興奮性を呈させることにより、計測された細胞をニューロンとアストロサイトとに分類した。計測された細胞と吸息性神経出力との相関から、計測された各細胞の活動における呼吸性要素の有無を解析した。

(2) 低酸素曝露時の呼吸リズムの維持にアストロサイトが参与しているか否かを明らかにするため、無麻酔覚醒下のマウスに高度の酸素を負荷し、whole body plethysmography 法により呼吸応答を解析し、次いで、アストロサイト活性化阻害剤 arundic acid による前処置の効果を検証した。

## 4. 研究成果

(1) preBotC 内に、呼吸性および非呼吸性のニューロンとアストロサイトを認め、呼吸性のアストロサイトについては、さらに吸

息性、前吸息性、および呼息性のもが見出された。これらアストロサイトは、TTX でニューロン活動を抑えても自発活動を呈し、ニューロンに依存しない自律的なリズム形成能を有していることが明らかとなった。なかでも前吸息性アストロサイトは、呼吸リズムを牽引している可能性があると考えられた。

(2) 高度の低酸素を負荷した無麻酔覚醒下のマウスでは、まず、呼吸増強が、その後に呼吸抑制が認められた。アストロサイト活性化阻害剤 arundic acid は、低酸素負荷時の呼吸増強を減弱させた。しかし、arundic acid による前処置は、高度の低酸素負荷時の痙攣発生を抑え、痙攣後の呼吸リズム消失～呼吸停止～死亡を防ぐ効果を示した。

(3) 以上の結果より、アストロサイトは、通常の酸素環境下での呼吸リズム形成に参与しているのみでなく、低酸素性呼吸増強にも参与していることが示唆された。アストロサイトは、低酸素性呼吸応答における低酸素センサー細胞の可能性があると考えられた。

## 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11件)

福士 勇人, 堀内 城司, 岡田 泰昌. 低酸素換気応答におけるアストロサイトの役割. 自律神経, 査読有, 54(2): 109-117, 2017.

岡田 泰昌, 横田 茂文, 福士 勇人. 呼吸の制御機構. Clinical Neuroscience, 査読無, 35(6): 685-688, 2017.

Ikeda K, Kawakami K, Onimaru H, Okada Y, Yokota S, Koshiya N, Oku Y, Iizuka M, Koizumi H. The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord: integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. Journal of Physiological Sciences, 査読有, 67(1): 45-62, 2017.

Pokorski M, Takeda K, Okada Y. Oxygen sensing mechanisms: a physiological penumbra. Advances in Experimental Medicine and Biology, 査読有, 952:1-8, 2016.

Terada J, Fukushi I, Takeda K, Hasebe Y, Pokorski M, Tatsumi K, Okada Y. Disharmony between wake- and respiration-promoting activities: Effects of modafinil on ventilatory control in rodents. Respiratory Research, 査読有, 17(1): 148, 2016.

Takeda K, Pokorski M, Okada Y. Thermal sensitivity and dimethyl sulfoxide (DMSO). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 査読有、921: 45-50, 2016.

Takeda K, Pokorski M, Sato Y, Oyamada Y, Okada Y. Respiratory toxicity of dimethyl sulfoxide. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 査読有、885: 89-96, 2016.

Fukushi I, Takeda K, Yokota S, Hasebe Y, Sato Y, Pokorski M, Horiuchi J, Okada Y. Effects of arundic acid, an astrocytic modulator, on the cerebral and respiratory functions in severe hypoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 査読有、226:24-29, 2016.

Koshiya N, Oku Y, Yokota S, Oyamada Y, Yasui Y, Okada Y. Anatomical and functional pathways of rhythmogenic inspiratory premotor information flow originating in the pre-Bötzinger complex in the rat medulla. *Neuroscience*, 査読有、268: 194-211, 2014.

Umeda A, Kawasaki K, Abe T, Yamane T, Okada Y. Effects of hyperventilation on venous-arterial bicarbonate concentration difference: a possible pitfall in venous blood gas analysis. *International Journal of Clinical Medicine*, 査読有、5(2): 76-80, 2014.

Pokorski M, Takeda K, Sato Y, Okada Y. The hypoxic ventilatory response and TRPA1 antagonism in conscious mice. *Acta Physiologica*, 査読有、210(4): 928-938, 2014.

[学会発表](計30件)

Okada Y, Yazawa I, Okazaki S, Yokota S, Takeda K, Someya H, Tamura Y, Onimaru H. Detection of respiratory modulated astrocytes in the ventrolateral medulla of the isolated brainstem-spinal cord by confocal calcium imaging. Annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2017) November 11-15, 2017, Washington, DC, USA (発表予定).

Okada Y. Role of glial cells in cardiorespiratory regulation. Symposium "Participation of glial cells on the cardiorespiratory regulation". International Society for Autonomic Neuroscience Meeting (ISAN 2017). August 30 - September 2, 2017, Nagoya (発表予定).

福士 勇人, 武田 湖太郎, 堀内 城司, 岡田 泰昌. アストロサイト活性化抑制剤 arundic acid は厳しい低酸素曝露によるけいれん発生と死を遅らせる (2017). 第40回日本神経科学大会, 7月20日~23日, 千葉.

Fukushi I, Takeda K, Pokorski M, Horiuchi J, Okada Y. Blockade of astrocytic activation delays the occurrence of severe hypoxia-induced seizure and respiratory arrest. 第57回日本呼吸器学会学術講演会. 2017年4月21日~23日, 東京.

寺田 二郎, 福士 勇人, 武田 湖太郎, 巽 浩一郎, 岡田 泰昌. 覚醒維持薬モダフィニルの呼吸への影響: 覚醒促進と呼吸の不調和. 第94回日本生理学会大会, 2017年3月28日~30日, 浜松.

福士 勇人, 武田 湖太郎, 寺田 二郎, Pokorski M, 堀内 城司, 岡田 泰昌. 自発呼吸下の覚醒マウスにおける低酸素換気応答とアストロサイトの役割. シンポジウム「呼吸ニューロンネットワーク機構の多階層的理解: 延髄スライスでの微小神経回路から覚醒動物まで」第94回日本生理学会大会, 2017年3月28日~30日, 浜松.

岡田 泰昌, 矢澤 格, 武田 湖太郎, 岡崎 俊太郎, 田村 義保, 鬼丸 洋. 摘出脳幹標本におけるニューロンとアストロサイトの呼吸性活動: カルシウムイメージングによる解析. 第94回日本生理学会大会, 2017年3月28日~30日, 浜松.

Okada Y, Yokota S, Shinozaki Y, Yasui Y. Anatomical arrangement of neurons and astrocytes in the phrenic nucleus of the rat. *Neuroscience 2016*, 46th Society for Neuroscience Annual Meeting, November 12-16, 2016. San Diego Convention Center, San Diego, USA.

Fukushi I, Takeda K, Horiuchi J, Okada Y. Suppression of astrocytic activation by arundic acid prevents

severe hypoxia-induced seizure and death in mice. Neuroscience 2016, 46th Society for Neuroscience Annual Meeting, November 12-16, 2016. San Diego Convention Center, San Diego, USA.

福士 勇人、武田 湖太郎、堀内 城司、岡田 泰昌. Arundic acid は低酸素によるけいれんと死を防ぐ. 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20 日 (水) ~ 22 日 (金) パシフィコ横浜

Pokorski M, Takeda K, Okada Y. TRPA1 channels in the regulation of hypoxic hyperventilation. International Conference, The 25th Martin's Days of Respiration. June 23-24, 2016, Martin, Slovakia.

Pokorski M, Takeda K, Okada Y (2016). Hypoxia ventilatory mechanisms: Appraisal and reappraisal. The International Biophysical Medicine Symposium; IX International Symposium "Actual Problems of Biophysical Medicine", May 12-15, 2016, Kiev, Ukraine.

Isato Fukushi, Kotaro Takeda, Yohei Hasebe, Mieczyslaw Pokorski, Jouji Horiuchi, Yasumasa Okada. Astrocytes play an active role in the maintenance of cerebral function and respiratory output under a severe hypoxic condition. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016 年 4 月 8 日 ~ 10 日、京都

Isato Fukushi, Kotaro Takeda, Jouji Horiuchi, Yasumasa Okada. Development of a model mouse of Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP) by loading hypoxic stress. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. March 22-24, 2016. Sapporo Convention Center, Sapporo.

福士 勇人、武田 湖太郎、長谷部 洋平、堀内 城司、岡田 泰昌. 低酸素換気応答におけるアストロサイトの役割. 第 68 回日本自律神経学会. 2015 年 10 月 29 日 ~ 30 日、名古屋

Okada Y, Oku Y, Sasaki T, Vivar C, Yokota S, Takeda K, Fukushi I, Yazawa I, Someya H, Tamura Y (2015). A novel model of respiratory rhythm generation: a mechanism by interaction of intrinsically oscillating astrocytes and neurons.

Neuroscience 2015, 45th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 17-21, 2015. McCormick Place, Chicago, USA.

Fukushi I, Takeda K, Hasebe Y, Horiuchi J, Okada Y (2015). Maintenance of ventilation under a hypoxic condition requires activated astrocytes. The International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN) 2015 Meeting, Stresa, Italy, from the 26th - 29th September, 2015.

Okada Y, Takeda K, Oku Y, Onimaru H, Pokorski M (2015). Role of TRP channels in respiratory control. International Meeting. 2015 年度生理学研究所 国際研究集会・TRP 研究会 TRPs and SOCs ~Unconventional Ca<sup>2+</sup> Physiology~. NIPS International Workshop 2015. TRPs and SOCs ~Unconventional Ca<sup>2+</sup> Physiology~. 2015 年 6 月 4 日 (木) ~ 5 日 (金) 岡崎.

Fukushi I, Takeda K, Hasebe Y, Horiuchi J, Okada Y. Activated astrocyte is necessary in the maintenance of the higher brain function and ventilation under a hypoxic condition 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 English poster discussion, 東京, April 17-19, 2015.

Okada Y, Takeda K, Someya H, Oku Y, Miwakeichi F, Ishiguro M, Tamura Y, Pokorski M (2015). Astrocytes mediate short-term plasticity of breathing. Experimental Biology 2015. Boston. 28 March - 1 April, 2015.

21 福士 勇人、武田 湖太郎、長谷部 洋平、堀内 城司、岡田 泰昌. アストロサイト活性化阻害は高度低酸素による換気と脳波信号の抑制を増強する. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会 2015 年 3 月 21 日 (土) ~ 23 日 (月) 神戸

22 Okada Y, Yokota S. Anatomy of the respiratory rhythmogenic kernel: preBotzinger complex of the medulla. In Symposium " 延髄脊髄呼吸調節機構: 形態と機能の統合的理解 " 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会 2015 年 3 月 21 日 (土) ~ 23 日 (月) 神戸

23 Okada Y, Oku Y, Yokota S, Oyamada Y, Yasui Y, Koshiya N (2014).

- Connectomics of the inspiratory center: Anatomical tract and propagation dynamics from the preBöttinger complex. Society for Neuroscience Meeting 2014 (Neuroscience2014). Washington DC. Nov 15-19, 2014.
- 24 Fukushi I, Takeda K, Hasebe Y, Horiuchi J, Okada Y (2014). Significance of astrocytic activation in hypoxic responses of ventilation and higher brain function. The XIIIth Oxford Breathing Meeting, Respiratory and Cardiovascular. Sydney, Australia. Oct 26 - Oct 31, 2014.
- 25 Koshiya N, Oku Y, Okada Y, Smith JC. From chaotic recruitment of the pre-Böttinger complex (pre-BötC) to functional connectomics of inter-pre-BötC tract and pan-network premotor pathways. The XIIIth Oxford Breathing Meeting, Respiratory and Cardiovascular. Sydney, Australia. Oct 26 - Oct 31, 2014.
- 26 Okada Y. Active roles of medullary astrocytes in respiratory rhythm generation and plasticity. The XIIIth Oxford Breathing Meeting, Respiratory and Cardiovascular. Sydney, Australia. Oct 26 - Oct 31, 2014.
- 27 岡田 泰昌、武田 Pokorski M. 中等度および高度低酸素、高酸素、高二酸化炭素に対する換気応答における TRPA1 チャネルの意義。平成 26 年度生理学研究所研究会『TRP チャネル研究を通じて見えてきた新たな生理学への光』2014 年 6 月 5 日 岡崎
- 28 岡田 泰昌. 教育講演 呼吸中枢の解剖・生理・病態生理. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会; Osaka, April 25-27, 2014.
- 29 Okada Y, Fukushi I, Takeda K, Oyamada Y, Oku Y, Miwakeichi F, Someya H, Ishiguro M, Tamura Y, Pokorski M. Post-hypoxic potentiation of breathing is induced by sustained activation of astrocytes. The 54th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, Osaka, April 25-27, 2014.
- 30 Fukushi I, Takeda K, Pokorski M, Oyamada Y, Okada Y. Dose-dependent suppression of respiration by

systemically administered DMSO. The 54th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, Osaka, April 25-27, 2014.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 泰昌 (OKADA Yasumasa)  
 独立行政法人国立病院機構村山医療センター・臨床研究部電気生理学研究室・室長  
 研究者番号：80160688

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

鬼丸 洋 (ONIMARU, Hiroshi)  
矢澤 格 (YAZAWA, Itaru)  
岡崎 俊太郎 (OKAZAKI, Shuntaro)