

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500277
 研究課題名 (和文) 延髄内のデュアルリズムジェネレーターによる呼吸の基本周期決定の神経機構

研究課題名 (英文) Neuronal mechanisms for determination of basic respiratory cycle by dual rhythm generators in the medulla

研究代表者

鬼丸 洋 (ONIMARU HIROSHI)
 昭和大学・医学部・第二生理・准教授
 研究者番号：30177258

研究成果の概要 (和文)：延髄呼吸中枢には、少なくとも2種類の呼吸性リズムジェネレーターが存在する：プレベッチンガーコンプレックス(pre-BötC)と傍顔面呼吸ニューロングループ(pFRG)である。本研究ではこれらのニューロングループ間での相互作用による呼吸の基本リズムの決定の仕組みを調べた。その結果、pFRGが少なくとも生後直後では、呼吸リズムの基本周期を決定し、中枢化学受容器 (特にCO₂の受容) としても重要な機能を有していること、このために、生後の生存に不可欠な役割を果たしていることが分かってきた。

研究成果の概要 (英文)：Two distinct neuronal networks; the pre-Bötzinger complex (pre-BötC) and the parafacial respiratory group (pFRG), in the ventrolateral medulla (VLM) are involved in respiratory rhythm generation. In the present study, we have studied the neuronal mechanisms for determination of basic respiratory rhythm by interaction between these neuron groups. We found that the pFRG is necessary for postnatal survival because of its involvement in rhythm generation and central chemoreception in the neonatal system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：呼吸リズム・傍顔面呼吸ニューロン・延髄

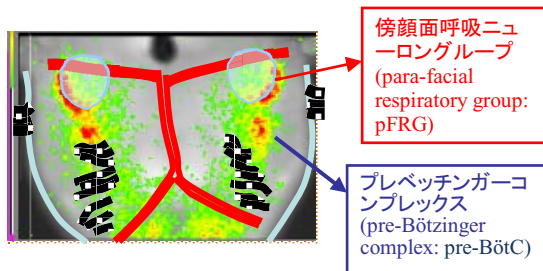
1. 研究開始当初の背景

呼吸リズムはどこでどのように作られているのか？延髄呼吸中枢には、少なくとも2種類の呼吸性リズムジェネレーターが存在することがわかってきた：プレベッチンガーコンプレックス(pre-BötC) (Smith et al. 1991)と

最近我々が発見した傍顔面呼吸ニューロングループ(pFRG) (Onimaru and Homma 2003)である。pre-BötCおよびpFRGは、ある条件ではそれぞれ独立にリズムを形成しうるが、延髄全体としては、これらのニューロングループ間での相互作用により呼吸の基本リズム

ムが形成されると考えられている(Mellen et al. 2003; Onimaru et al. 2006; Onimaru & Homma 2006). しかしながら、これらのリズムジェネレーターが実際にどのような条件下で、どのような相互作用を行うことで、呼吸の基本リズムを形成するのかが明らかではなかった. *In vitro* 標本を用いた実験系では、呼吸の基本リズムを決定するのは通常 pFRG であるが、特殊な条件下では、pre-BötC が pFRG とは独立に出力頻度を決定する可能性があることが示唆されていた. つまりリズムジェネレーターの優位性が生体(標本)の状態によって異なる可能性を示しており、このことは、より複雑な *in vivo* 条件下での呼吸リズム形成を考える上で重要である. 従って、呼吸リズムジェネレーターの優位性を決める要因を明らかにし、リズムジェネレーター間の相互作用の神経機構を解明することが、呼吸リズム形成の神経機構を明らかにする上で、重要な課題であった.

図1. 2つの呼吸リズムジェネレーターの存在



延髄腹側表面から見た、2つの呼吸性リズムジェネレーター(pFRGとpre-BötC)の位置を示す. pFRGは顔面神経核を取り囲むように、主にその外側、腹側、尾側に存在する. pre-BötCはより尾側の腹外側延髄に位置する. 呼吸リズムはこれらのジェネレーターの相互作用で決定される.

2. 研究の目的

本研究の目的は、これらのリズムジェネレーターが実際にどのような条件下で、どのような相互作用を行うことで、呼吸の基本リズムを決定するのかが明らかになることにある. このため、神経活動を興奮あるいは抑制させる条件下で呼吸リズム形成のパターンを解析する. 神経活動を興奮させる条件として、外液のK⁺濃度、興奮性アミノ酸濃度などを変化させたとき、神経活動を抑制する条件としてオピオイドアゴニストの投与、低酸素負荷の条件下などで、これらのリズムジェネレーターの相互作用の変化及び基本リズムの決定に対する影響を明らかにする. さらに延髄の切断実験により、リズムジェネレーターの実質的な局在を明らかにする. とくに延髄最吻側部のPre-Iニューロン(pFRG-Pre-I)の詳しい性質、及びそれらがプレベッチンガーコンプレックス(pre-BötC)との相互作用においてどのような役割を持つのかが明らかに

する. また pFRG の一部の領域が中枢化学受容器のエリアにほぼ一致することから、これらのニューロンのCO₂感受性をTTX存在下で調べ、呼吸リズム形成における役割を明らかにする. さらに遺伝子変換マウスの呼吸中枢の解析を行い、pFRGとpre-BötCの機能的なつながりについて解析する. Na⁺, K⁺-ATPase α2 subunit 欠損マウスは生後1日以内に呼吸不全で死亡する. また胎生19日齢で帝王切開し、胎児マウスを取り出した場合、全く呼吸運動を起こさず、死亡する(Ikeda et al. 2004). このマウスの呼吸中枢の解析を電気生理及び光学的測定法により解析する.

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的解析

新生児ラット(0-3日齢)から脳幹及び脊髄を摘出し実験槽におき、95%O₂, 5%CO₂で飽和したクレブス液(25-26°C)で灌流する. 呼吸活動はガラス吸引電極を用いて、第4または第5頸髄前根(C4/C5)から吸息性の運動神経活動を記録することでモニターする. いわゆるブラインドパッチホールセル記録法を用いて、呼吸性ニューロンの膜電位を記録する(Onimaru and Homma 1992). 生理活性物質などは、クレブス液に溶かして、灌流投与する. 記録したニューロンの位置、形態などは、ルシファーイエローを用いてニューロンを標識し、実験終了後に調べる.

(2) 膜電位感受性色素による光学的測定

新生児ラット(生後0-1日目)から脳幹及び脊髄を摘出し、膜電位感受性色素(Di-2-ANEPQまたはDi-4-ANEPQS)で30分から60分間染色する. 染色後、標本の延髄吻側断面を上(対物レンズ側)にして実験槽におき、95%O₂, 5%CO₂で飽和したクレブス液(26-27°C)で灌流する. 呼吸活動はガラス吸引電極を用いて、第4または第5頸髄前根(C4/C5)から吸息性の運動神経活動を記録することでモニターする. 光学的測定装置としては、MiCAM高解像度タイプ(180 x 120ピクセル)を使用する. 吸息性運動神経活動をトリガー信号として用い、25%プレトリガーで、20-50回画像を加算する(Onimaru and Homma 2003). 画像データはDVDに記録する.

(3) In situ hybridization 法及び免疫組織化学法による記録したニューロンの特性の同定

記録電極には、ルシファーイエローが充てんしてあり、記録したニューロンはルシファーイエローで標識される. 記録ニューロンの細胞特性を同定するため、転写因子Phox2bの抗体染色に組み合わせて、受容体についてはサブスタンスP(NK1R)、酵素類はPNMT(アドレナリンニューロンの指標)、TH(ノルアドレナリンニューロンの指標)などを解析す

る。ニューロンの伝達物質の同定には vGlut2 mRNA(グルタミン酸ニューロンの指標), Glyt2 mRNA(グリシンニューロンの指標)及び GAD65/67 (GABA ニューロンの指標)を調べる。

(4) Na⁺, K⁺-ATPase α 2 subunit 欠損マウスの解析

このノックアウトマウスの呼吸中枢の解析は、胎生 19 日(帝王切開による)および生後 1 日齢のマウスを用いて行う。解析の手法(電気生理および光学的測定)は基本的に新生児ラットの場合と同じである(上記)。

4. 研究成果

(1) 神経活動修飾物質のリズム形成に対する影響

K⁺濃度上昇, NMDA などの興奮性アミノ酸の投与, カプサイシンの投与などでは, 吸気性活動が一時的に抑制された後, 再び吸気性活動がやや早いリズムで出現した。これは, pFRG-Pre-I の活動が過剰の興奮のため乱されることで一時的に抑制が起こった後, 興奮性物質によって pre-BötC の吸気性活動が直接誘起されることで説明できた(Onimaru & Homma, 2008)。オピオイドアゴニスト (DAMGO) による呼吸リズム抑制では, Pre-I ニューロンの活動相の pre-I phase へのシフトが起こった。この結果は DAMGO が Pre-I ニューロンそのものではなく Pre-I ニューロンから pre-BötC の吸気ニューロンへの結合を抑制するように作用することを示唆した。一方, 低酸素による呼吸リズム抑制時には, Pre-I ニューロンが低酸素によって直接抑制されることがわかった (Ballanyi, Ruangkittisakul, Onimaru, 2009)。

(2) 延髄切断レベルのリズム形成に及ぼす影響

6.2 (mM) K⁺, 2.4 Ca²⁺, 1.3 Mg²⁺ を含む溶液において, 延髄-脊髄標本の呼吸リズム頻度 (C4 吸気性活動の頻度) は, 延髄吻側部顔面神経核領域での切断レベルが尾側へと下がるに伴って減少した。特に延髄最吻側部 (顔面神経核領域の吻側 1/3) を取り除くと, pFRG-Pre-I ニューロンの活動に吸気性活動が 1 : 1 に対応しなくなり, 結果として C4 吸気性活動の頻度が減少した。いわゆる量子的呼吸リズム抑制が引き起こされた。この結果は, 延髄最吻側部 pFRG-Pre-I ニューロンが, 呼吸の基本周期を決定する pFRG 全体の活動レベルを増強する役割を持つことを示唆する。実際, 延髄最吻側レベルの腹外側部 (顔面神経核と腹側表面の間の狭い領域) に, Pre-I ニューロンが密集して存在することを見出した。pFRG のおよそ 80% を取り除く切断レベルでは, C4 吸気性活動は, ほとんど停止した。ただし, このような条件下でも, 外

液の K⁺濃度を増やすか, 興奮性アミノ酸 (NMDA) を投与すると, C4 吸気性リズムは再び見られるようになった。これは, pre-BötC の吸気リズムジェネレーターが高 K⁺などの興奮性要因によって直接刺激されることによって引き起こされたためと考えられた(Onimaru, Janczewski, Homma, 2007)。

(3) pFRG-Pre-I ニューロンの神経生理学的・免疫組織化学的特性

pFRG-Pre-I ニューロンは, TTX 存在下で, 外液の CO₂ 濃度を上げた時の膜電位応答に基づいて, 2 種類にわけられた。1 つは脱分極の膜電位応答 (つまり内因性 CO₂ 反応性) を示すもので, これらのニューロンは顔面神経核に対し腹側表面近くに分布し, 転写因子 Phox2b を発現していた。これらのニューロンのうちいくつかはグルタミン酸ニューロンであることが確認された。CO₂ 濃度上昇による膜の脱分極は膜抵抗の増大を伴っており, K⁺チャネルの関与を示すものである。もう 1 つのグループは, TTX 存在下で CO₂ 濃度増加に対し脱分極応答を示さないもので, Phox2b 陰性であった。このグループは主に顔面神経核に対し尾側に位置し, 延髄腹側表面から深いところに分布していた。これらのニューロンのうちいくつかは GABA またはグリシンニューロンであることが確認された。Phox2b 遺伝子は, 下位脳幹の自律神経中枢の発達に重要な役割を果たすと考えられており, さらに延髄中枢化学受容器細胞が特異的に発現する遺伝子として最近注目されている (Stornetta et al. 2006; Dubreuil et al. 2008)。今回の結果は, 延髄腹側表面近くに分布する pFRG-Pre-I ニューロンは, 少なくとも生後直後では, 呼吸リズムジェネレーターとして働くと同時に, 中枢化学受容器としても重要な機能を有していること, このために, 生後の生存に不可欠な役割を果たしていることを示唆する。これまで, pFRG の神経生理学的性質は pre-BötC のそれに比べ, 不明の点が多いとされてきたが, 今回の結果はこうした疑問に答える重要な発見である。さらに, 特筆すべきこととして, Phox2b 陽性ニューロンが延髄最吻側部 (橋との境界付近) にクラスターを作っており, これらは pFRG-Pre-I ニューロンのサブグループと一致し, TTX 存在下で CO₂ に反応するニューロンであることがわかった。この領域の Pre-I ニューロンは標本の吻側断面からのアプローチが容易で, 今後, CO₂ 反応性の詳しいイオン機構 (つまり中枢化学受容の分子機構) を解析するために, 非常に有用なターゲットになりうることをわかった (Onimaru, Ikeda, Kawakami, 2008; 2009; 2010)。

(4) Na⁺, K⁺-ATPase α 2 subunit 欠損マウスにおける呼吸リズム形成

このノックアウトマウスにおいては, 周産期

において形成されるべき pFRG と pre-BötC の間の機能的なシナプス結合が出来上がっていないために、生後呼吸中枢の活動が正常に起こらず、これが原因で呼吸不全で死亡することが明らかとなった。pFRG と pre-BötC 間のシナプス結合は、外液にサブスタンス P またはアドレナリンを加えてやると、正常に近いレベルにまで回復した(Onimaru, Ikeda, Kawakami, 2007)。これらの結果は、新生児にける呼吸リズムの形成に pFRG と pre-BötC の間の機能的なシナプス結合が完成していることが重要であることを示すものである。

(5) 結論

本研究では、延髄内の2つの呼吸リズムジェネレーターの相互作用による呼吸の基本周期の決定のメカニズムを明らかにしてきた。研究の過程で、pFRG-Pre-Iニューロンの遺伝子マーカー(Phox2b)が発見されたことは特筆に値する。pFRG-Pre-Iニューロンは呼吸中枢の各種呼吸性ニューロンのなかで、最も明確に遺伝子マーカーが特定されたニューロンであると言える。このことは、今後の研究の発展のためにも特に意義深い。

引用文献リスト(下記の発表論文を除く)

- Dubreuil, V., Ramanantsoa, N., Trochet, D., Vaubourg, V., Amiel, J., Gallego, J., Brunet, J.F., Goridis, C., 2008. A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 1067-1072.
- Ikeda K, Onimaru H, Yamada J, Inoue K, Ueno S, Onaka T, Toyoda H, Arata A, Ishikawa T, Taketo MM, Fukuda A, Kawakami K. Malfunction of Respiratory-Related Neuronal Activity in Na⁺, K⁺-ATPase α 2 Subunit-Deficient Mice Is Attributable to Abnormal Cl⁻ Homeostasis in Brainstem Neurons. *J Neurosci* 24:10693-10701, 2004.
- Mellen, N.M., Janczewski, W.A., Bocchiaro, C.M. and Feldman, J.L. (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron*. 37, 821-826.
- Onimaru, H. and Homma, I. (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci*. 23, 1478-1486.
- Onimaru, H. and Homma, I. (2006) Point:Counterpoint: The parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Botzinger complex (preBotC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. Point: the pFRG is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. *J Appl Physiol*. 100, 2094-2095.
- Onimaru, H., Kumagawa, Y. and Homma, I. (2006) Respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats. *J Neurophysiol*. 96, 55-61.
- Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W. and Feldman, J.L. (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that

may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*. 254, 726-729.

Stornetta, R.L., Moreira, T.S., Takakura, A.C., Kang, B.J., Chang, D.A., West, G.H., Brunet, J.F., Mulkey, D.K., Bayliss, D.A., Guyenet, P.G., 2006. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci*. 26, 10305-10314.

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9件)

- ① Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. Phox2b, RTN/pFRG neurons and respiratory rhythmogenesis. *Respir Physiol Neurobiol*. 168(1-2):13-8, 2009 査読有
- ② Minoura Y, Onimaru H, Iigaya K, Homma I, Kobayashi Y. Electrophysiological responses of sympathetic preganglionic neurons to ANG II and aldosterone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297:R699-706, 2009 査読有
- ③ Ballanyi K, Ruangkittisakul A, Onimaru H. Opioids prolong and anoxia shortens delay between onset of preinspiratory (pFRG) and inspiratory (preBötC) network bursting in newborn rat brainstems. *Pflugers Arch*. 458:571-87, 2009 査読有
- ④ Iigaya K, Kumagai H, Nabika T, Harada Y, Onimaru H, Oshima N, Takimoto C, Kamayachi T, Saruta T, Itoh H. Relation of Blood Pressure Quantitative Trait Locus on Rat Chromosome 1 to Hyperactivity of Rostralventrolateral Medulla. *Hypertension* 53:42-48, 2009 査読有
- ⑤ Onimaru H, Ikeda K, and Kawakami K. CO2-Sensitive Preinspiratory Neurons of the Parafacial Respiratory Group Express Phox2b in the Neonatal Rat. *J Neurosci*. 28(48):12845-12850, 2008 査読有
- ⑥ Oshima N, Kumagai H, Onimaru H, Kawai A, Pilowsky PM, Iigaya K, Takimoto C, Hayashi K, Saruta T, and Itoh H. Monosynaptic Excitatory Connection from the Rostralventrolateral Medulla to Sympathetic

Preganglionic Neurons Revealed by Simultaneous Recordings To directly investigate whether a monosynaptic connection exists between neurons in the rostral ventrolateral.

Hypertens Res. 31: 1445-1454, 2008
査読有

- ⑦ Onimaru H., Ikeda K, Kawakami K. Defective interaction between dual oscillators for respiratory rhythm generation in Na⁺, K⁺-ATPase α 2 subunit-deficient mice. J Physiol 584.1: 271284, 2007 査読有
- ⑧ Onimaru H., Homma I. Spontaneous Oscillatory Burst Activity in the Piriform-Amygdala Region and its Relation to In Vitro Respiratory Activity in Newborn Rats. Neurosci. 144: 387-394, 2007 査読有
- ⑨ Iigaya K, Kumagai H, Onimaru H., Kawai A, Oshima N, Onami T, Takimoto C, Kamayachi T, Hayashi K, Saruta T, Itoh H. Novel axonal projection from the caudal end of the ventrolateral medulla to the intermediolateral cell column. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 292: R927-36, 2007 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Onimaru, H., Homma, I. Network mechanisms of respiratory rhythm generation in rodents. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS) PSJ II-1-1, P36 (Kyoto, July 28 - August 1, 2009) (シンポジウム招待講演)
- ② Onimaru, H. Phox2b expression of pFRG/pre-inspiratory neurons and Respiratory Rhythmogenesis. The XIth Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing, Abstract S5-4 (July 24-26, 2009, Nara) (シンポジウム講演発表)
- ③ Suganuma, M., Onimaru, H., Homma I. Effects of TRP channel agonists on respiratory rhythm generation in the brainstem preparation isolated from newborn rat. The XIth Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing, Abstract A34 (July 24-26, 2009, Nara)
- ④ Onimaru, H., Ikeda, K., Kawakami, K. Phox2b immunoreactivity of the parafacial respiratory group neurons. The XIth Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing, Abstract B18 (July 24-26, 2009, Nara)
- ⑤ Fujii, T., Onimaru, H., Homma, I. Effects of corticotropin releasing factor on spontaneous burst activity in the piriform-amygdala complex of newborn rat brain preparation in vitro. The XIth Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing, Abstract B11 (July 24-26, 2009, Nara)
- ⑥ Onimaru H. Characterization and functional significance of parafacial neurons. International Symposium on Respiratory Control. (December 1-4, 2008, St MAXIMIN France) (招待講演)
- ⑦ Onimaru H., Janczewski WA., Homma I. Midline section of the medulla abolishes inspiratory activity and desynchronizes pre-inspiratory neuron rhythm on the left and right side of the medulla in newborn rats. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, Abstract 407.21 (November 3-7, 2007, San Diego, USA)
- ⑧ Ballanyi K., Ruangkittisakul A., Onimaru H. Opiate- and anoxia-induced respiratory phase shifts in isolated newborn rat brainstems. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, Abstract 340.7 (November 3-7, 2007, San Diego, USA)
- ⑨ ONIMARU H., ARATA S., HOMMA I. Postnatal change in the spatio-temporal pattern of respiratory neuron activity in the ventral medulla of rodents. (第 85 回日本生理学会大会東京, 2008. 3. 25-27)
- ⑩ Onimaru, H. Respiratory rhythm generator dominance in a coupled oscillator system of the medulla. J. Physiol. Sci., 57: s22, 2007 (第 84

回日本生理学会大会,大阪, 3. 20-22).
(シンポジウム講演発表)

- ⑪ Fujii T., Onimaru H. and Homma I. Effects of corticotropin releasing factor (CRF) on spontaneous burst activity in the piriform-amygdala complex of the in vitro brain preparation from newborn rat. *Neurosci., Res.*, 61: S106, 2008 (第30回日本神経科学会, 東京, 2008.7.9-11)
- ⑫ Onimaru H. and Homma I. Effects of midline sagittal sectioning of medulla on pre-inspiratory and inspiratory neuron activity in vitro. *Neurosci. Res.*, 58: S162, 2007 (第30回日本神経科学会, 横浜, 2007.9.10-12)

[図書] (計5件)

- ① Onimaru H., Ikeda K and Kawakami K. Phox2b Expressing Neurons in the Most Rostral Medulla of Newborn Rats. *Adv Exp Med Biol.* 2010;669:87-90.
- ② Fujii T., Onimaru H., Suganuma M. and Homma I. Effects of hypocapnia on spontaneous burst activity in the piriform-amygdala complex of newborn rat brain preparation in vitro. *Adv Exp Med Biol.* 2010;669:333-336.
- ③ Ballanyi K, Onimaru H. Respiratory Network Analysis, Isolated Respiratory Center Functions. *Encyclopedia of Neuroscience.* Eds: Marc D. Binder, Nobutaka Hirokawa and Uwe Windhorst. Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg, 10.1007/978-3-540-29678-2_5073, 2009
- ④ Ballanyi K, Onimaru H., Keller B. Respiratory Network Analysis, Functional Imaging. *Encyclopedia of Neuroscience.* Eds: Marc D. Binder, Nobutaka Hirokawa and Uwe Windhorst. Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg, 10.1007/978-3-540-29678-2_5072, 2009
- ⑤ Onimaru H., Homma I. Two Modes of Respiratory Rhythm Generation in the

Newborn Rat Brainstem-Spinal Cord Preparation. In *Advances in Experimental Medicine and Biology Series.* Eds: M. J. Poulin and R. J. A. Wilson. Springer Publishers, New York. Volume 605:104-108, 2008

[産業財産権]
○出願状況 (計 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◇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

鬼丸 洋 (Onimaru Hiroshi)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号 : 30177258

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

