

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460327

研究課題名(和文)小脳オレキシンによる睡眠覚醒モードの呼吸神経回路動態の解析

研究課題名(英文)Analysis of respiratory neuronal network dynamics in the sleep-wake mode circuit controlled by orexin

研究代表者

荒田 晶子 (Arata, Akiko)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00266082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：摘出小脳・橋-延髄-脊髄標本を用いて、呼吸活動を指標として、オレキシンの橋結合腕傍核(NPB)における調節機構の解析した。オレキシンは脊髄や小脳片葉・傍片葉、そして、NPBにターミナルがあることが知られている。生後1週の小脳では、下オリーブ核からプルキンエ細胞に対して登上線維が小脳に投射し、小脳からNPBへ出力している。中枢性化学受容体からもNPBに投射がある。オレキシン存在下でCO₂を高くすると速い呼吸になった。それは、オレキシンがNPBの吸息-呼息切り替えニューロンに作用し、能動的に呼吸数を引き上げる事による。オレキシンは覚醒時にNPBを介して能動的に呼吸促進を引き起こすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of orexin on respiratory modulation in the parabrachial nucleus that isolated cerebellum and pons-medulla-spinal preparation from neonatal rat. Orexin is famous arousal hormone which projected to the Purkinje cell in the floccles and the Para-floccles of the cerebellum, and also projected to the Parabrachial nucleus. The role of NPB is the integrative autonomic function, so orexin makes cardiorespiratory function excite in the arousal mode. NPB received the influences from central chemoreceptor in the medulla that is controlled by CO₂. Orexin under hypercapnia strongly facilitated respiratory rate using inspiratory-expiratory phase-switching neuron in the NPB; and that could be related with the cerebellum modulation and these severe phenomena possibly induces a panic disorder. We proposed that orexin neurons might be centrally involved in motor control during wakefulness and sleep.

研究分野：発達神経生理学

キーワード：Parabrachial nucleus 吸息-呼息切り替えニューロン オレキシン 小脳傍片葉 下オリーブ核 中枢性化学受容

1. 研究開始当初の背景

睡眠障害の1つであるレム睡眠行動障害は、はっきりとした原因がない。しかしその原因疾患に、オリーブ橋小脳萎縮症があることは分かっている。オリーブ核 - 橋 - 小脳の関連性において、睡眠覚醒に関わる機構を模索した結果、下オリーブ核 - 小脳 (片葉・傍片葉) - 橋結合腕傍核 (Nucleus Parabrachialis; NPB) 神経回路が、次の事象により浮かび上がってきた。ウサギ小脳の片葉の一部である folium-P (ラットやマウスでは、傍片葉・片葉の一部にあたる) から NPB へ出力があり、循環・血圧調節に関与すると報告されている (Nisimaru N, Arata A, Ito M, Neuro2010)。研究代表者は、NPB には、能動的に吸息から呼息へ切り替える機構が存在すると結論している (Arata A, Resp Physiol Neurobiol, 2009)。また、下オリーブ核からは、傍片葉・片葉に投射している事が知られている。研究協力者の Curtin 大学の Watson 教授は、中枢性化学受容体と言われているマウス延髄の archiate nucleus (弓状核) は、下オリーブ核の一部であり、小脳傍片葉 (片葉) へ投射もあること見つけており (Fu and Watson, Brain, Behav Evol, 2011)、小脳と NPB の関連性においても、小脳の傍片葉・片葉から Lateral NPB や KF 核へ投射があるという研究成果も出している。以上の結果より、下オリーブ核 - 片葉・傍片葉 - NPB という回路の存在の可能性が示された。マウス小脳において、視床下部オレキシン神経は傍片葉 (片葉) にのみ投射していることが名古屋大学・環境医学研究所の山中章弘チームの実験研究により示された (図1)。



図1 マウス小脳において、片葉・傍片葉のプルキンエ細胞がオレキシン神経からの線維を受けている (矢印)。

呼吸や循環に関与する小脳片葉・傍片葉 - NPB 回路は、NPB が吸息から呼息の切り替えに関与するので、呼吸リズムを制御できる事になる。そこで、マウス小脳の傍片葉 (片葉) にのみ投射しているオレキシン神経を使って、睡眠覚醒モードの切り替えにおける呼吸リズムに対する調節機構を解析しようと考えた。それにより、小脳の睡眠覚醒に関わる役割が解明され、レム睡眠行動障害などの睡眠障害の基本的な神経回路基盤のひとつが解明され、原因究明の一助となる可能性がある。

2. 研究の目的

小脳における睡眠覚醒機構をオレキシンが唯一関与する片葉・傍片葉において呼吸活動を指標として解析する。

研究代表者は、in vitro 実験系で、広域神経回路を保持している摘出小脳 橋 - 延髄 - 脊髄標本を用いて、以下の実験を行う。

- ・下オリーブ核 - 小脳片葉・傍片葉 - 結合腕 (NPB) の神経回路の存在を明らかにする。
- ・オレキシンを用いて、呼吸出力や呼吸性ニューロンの発火パターンの変化、脊髄性歩行様活動等を解析し、小脳の橋、延髄、脊髄に対する効果と呼吸と歩行の関連性を考察する。

3. 研究の方法

(1) 摘出橋 - 延髄 - 脊髄標本を用いて、下オリーブ核 - 小脳傍片葉 - 橋結合腕傍核の呼吸性ネットワークの相互連関を調べた。摘出小脳 - 橋 - 延髄 - 脊髄標本は、0 - 4 日齢ラットから取り出したものを使い、吻側レベルは、橋が全部入るレベルで切り落とし、尾側レベルは第6頸髄で切断した。切り出した標本は、記録用チェンバーに移し、新生ラット用のリンゲル液で灌流し、呼吸性活動は、第4頸髄前根からモニターした。

(2) 延髄-小脳-橋の連絡を調べるには、蛍光レーザーである DiI を用いて調べた。また、光感受性色素を用いた光学的測定では、脊髄の歩行運動による感覚刺激等が NPB に入力しているか、小脳から NPB に入力があるかを調べ、中枢性化学受容からの CO₂ レスポンスが NPB に入力しており、オレキシンの NPB での反応性が CO₂ によっても変化するのか調べた。

(3) 橋の NPB から呼吸性ニューロンを記録して、オレキシンの呼吸に対する反応性を調べた。覚醒を維持するオレキシンの小脳の片葉・傍片葉に投射しているオレキシンと NPB に投射しているオレキシンの役割を脳ブロック標本の小脳の有無での結果を比較し、小脳の役割を考察する。

4. 研究成果

本研究は、in vitro 標本でありながら広範囲な神経回路の解析が出来る摘出小脳・橋-延髄-脊髄標本を用いて、呼吸性神経活動を指標として、オレキシンの睡眠覚醒モード切り替えによる呼吸に対する調節機構の解析を試みることを目的とした。新生ラットにおいて、下オリーブ核を介して呼吸活動が小脳にも捉えられたことを研究代表者らは確認している。また、自律神経の統合核として最近注目を浴びている橋結合腕傍核 (NPB) は、スライス標本では回路が切れてしまい、in vivo 標本ではアプローチが難しい場所にあるという事で、なかなか研究が進まないところであるが、この摘出脳ブロック標本を用いることにより、NPB の研究を進めることが出来た。オレキシン神経にロドプシンチャンネル2やハロロドプシンを遺伝学的に組み入れたマウスを光操作法により活性化・不活性化することを計画したのだが、実際には、大学の新棟建設による騒音等のため、マウスの生育や出産が上手くいかなかったため、ラットで同様出来る実験に置き換えて行った研究成果について報告する。

呼吸性ニューロンの細胞外記録、ホールセルパッチクランプ法を用いた細胞内記録を用いて、この標本における呼吸性ニューロンネットワーク連関を解析した。蛍光トレーサーと刺激実験の結果より、下オリーブ核に呼吸中枢から入力があり、それが小脳皮質へも投射している事が分かった。

呼吸の出力に影響のある中枢性化学受容体からの反応性とオレキシンの関連性を調べるため、高CO₂や低O₂のリンゲル液を標本に灌流した状態で、オレキシンを加えた時の第4頸髄前根から呼吸性活動を記録すると、興奮を示すだけでなく、過度の呼吸上昇がみられた。また、光学的測定の結果、小脳傍片葉（片葉）刺激で、橋結合腕傍核の外側部に光学シグナルが観察され、外側腕傍核(LPB)で記録された呼吸性ニューロンは、吸息-呼息切り替えニューロンが多く、オレキシンにより吸息-呼息のフェーズを切り替えが促進されて、呼吸数が増加することが分かった。

さらに、LPBの吸息-呼息切り替えニューロンに対して、前肢、後肢からの刺激が入力することが光学的測定法やパッチクランプ法を用いて明らかとなり、LPBが呼吸と歩行から入力を受け、呼吸と歩行の統合に関わる事が示唆された。また、それらの呼吸や歩行様の活動は、下オリーブ核を経由して小脳にも投射している事が光学的測定により示唆された。

以上の結果から、生後1週の小脳では、オリーブ核からプルキンエ細胞に対して数本の登上線維が小脳の片葉・傍片葉に投射しており、下オリーブ核には呼吸中枢レベルからの投射があり、小脳まで投射しているので、呼吸リズムが小脳神経回路発達に関与する可能性があると考えられた。一方、オレキシンは脊髄や小脳片葉・傍片葉、そして、LPBにターミナルがあることが知られている。発達において腕傍核に手足を動かすという外部感覚の入力や中枢性化学受容体からの入力に対して、CO₂が高くなるとパニック症候群のような速い呼吸になる事から、オレキシンはストレスホルモンとして、自律性機能に対する役割を果たしているのかもしれない。睡眠時の歩行に対する下行性抑制性に対して、オレキシンとしては、レム睡眠行動障害を引き起こす原因になっている可能性もある。

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 12 件)

荒田晶子、中山栗太、吉田千晃
自律神経系の感覚統合核としての橋結合腕傍核
神経内科(科学評論社)2017, 87: 印刷中。
(査読なし)

Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D. Optogenetic spinally projecting neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017; 312: H808-H817. doi: 10.1152/ajpheart.00572.2016. (査読有)

Geerling JC, Yokota S, Rukhadze I, Roe D, Chamberlin NL.

Kölliker-Fuse GABAergic and glutamatergic neurons project to distinct targets. *J Comp Neurol*. 2017; 525: 1844-1860. doi: 10.1002/cne.24164. (査読有)

荒田晶子

意識と無意識の切り替え
発達(ミネルヴァ書房)2016, 148: 20-25.
(査読なし)

Chowdhury S, Yamanaka A.

Optogenetic activation of serotonergic terminals facilitates GABAergic inhibitory input to orexin/hypocretin neurons. *Sci Rep.*, 2016, 6:36039. doi: 10.1038/srep36039. (査読有)

Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D.

Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats. *J Neurophysiol*. 2016, 116: 2250-2259. doi: 10.1152/jn.00196.2016. (査読有)

Yokota S, Oka T, Asano H, Yasui Y.

Orexinergic fibers are in contact with Kölliker-Fuse nucleus neurons projecting to the respiration-related nuclei in the medulla oblongata and spinal cord of the rat. *Brain Res*. 2016; 1648: 512-23. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.020. (査読有)

Shimomura H, Ito M, Nishiyama A, Tanizawa T, Takeshima Y, Nishimaru H, Arata A. Glycine plays a crucial role as a co-agonist of NMDA receptors in the neuronal circuit generating body movements in rat fetuses. *Neurosci Res*. 2015; 97:13-19. doi: 10.1016/j.neures.2015.03.004. (査読有)

Okabe A, Shimizu-Okabe C, Arata A, Konishi S, Fukuda A, Takayama C. KCC2-mediated regulation of respiration-related rhythmic activity during postnatal development in mouse medulla oblongata. *Brain Res*. 2015; 1601: 31-39. doi: 10.1016/j.brainres.2015.01.007. (査読有)

Yokota S, Kaur S, VanderHorst VG, Saper CB, Chamberlin NL. Respiratory-related outputs of

glutamatergic, hypercapnia-responsive
parabrachial neurons in mice.
J Comp Neurol. 2015; 523: 907-20.
doi: 10.1002/cne.23720. (査読有)

荒田晶子
呼吸の意識と無意識の神経制御
Clinical Neuroscience, 2014, 32: 1350-1351.
査読あり)

荒田晶子
発達期における神経回路形成
ベビーサイエンス, 2014, 14: 64-65. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

Akiko Arata (招待講演)

The turning point of taste sensation during
perinatal development.

The 94th Annual Meeting of the Physiological
Science of Japan

2017年3月28日~30日 浜松アクロシティ(静
岡県浜松市)

Akiko Arata, Ayae Nishiyama, Toshikazu,
Kakizaki, Hideki Shimomura, Yasuhiko
Takeshima, Yuchio Yanagawa

Possible role of glycine-related spontaneous
activity in the developmental network.

Neuroscience 2016: The Annual Meeting of
Society for Neuroscience (国際学会)

2016年11月12日~16日 San Diego
Convention Center (San Diego, U.S.A.)

荒田晶子, 岩野優、野間俊希、外村宗達、玉
木彰

歩行-呼吸引き込む現象における橋結合腕傍核
の関与 第69回日本自律神経学会総会 熊本県
民交流館パレアホール

2016年11月10日~11日(熊本県熊本市)

Akiko Arata, Mari Shiga, Midori Tanaka,
Shigefumi Yokota, Akihiro Yamanaka

Orexinergic modulation on respiratory neuron
in parabrachial nucleus under hypercapnia
condition.

The 59th Annual meeting of the Japanese
Society for Neurochemistry, 2016年9月8日~

10日 福岡国際会議場(福岡県博多市)

荒田晶子 (招待講演)

パニック障害に対する腕傍核の呼吸性回路の関与
第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会合
同大会 2015年3月21日~23日 神戸国際会議
場・展示場 (神戸市)

中山栗太、吉田千晃、荒田晶子
新生ラット摘出脳幹-脊髄標本における D/L パリ
ンの下の動きに対する作用
第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会合

同大会 2015年3月21日~23日 神戸国際会議
場・展示場 (神戸市)

荒田晶子 (招待講演)

呼吸・吸綴・歩行リズムと神経回路発達

第2回新胎児学研究会 2014年11月14日~15
日 かがわ国際会議場 (高松市)

荒田晶子、志賀真理、西山紋恵、下村英毅、
山中章弘
睡眠覚醒、発声に関わる橋結合腕傍核の呼吸調節
への役割

第3回日本発達神経化学学会 2014年10月17
日~18日 東京大学 (東京都)

荒田晶子 (招待講演)

呼吸理済みによる神経回路の形成

第3回日本発達神経化学学会 2014年10月17
日~18日 東京大学 (東京都)

Akiko Arata, Mari Shiga, Shigefumi Yokota,
Akihiro Yamanaka

Orexinergic modulation on respiratory neuron
in parabrachial nucleus under
hypoxic/hypercapnic condition.

第37回日本神経科学学会大会 2014年9月11
日~13日、パシフィコ横浜 (横浜市)

〔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

荒田 晶子 (ARATA, Akiko)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00266082

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
山中 章弘 (YAMANAKA, Akihiro)
名古屋大学 環境医学研究所・教授
研究者番号： 60323292

連携研究者
横田 茂文 (YOKOTA, Shigefumi)
島根大学 医学部・准教授
研究者番号： 50294369

(4)研究協力者
Charles Watson (WATSON, Charles)
Curtin 大学 医学部・教授