

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05367

研究課題名(和文) セントラルコマンドの中枢伝達経路の解明と心疾患における機能制御

研究課題名(英文) Identification of "central command" pathways in health and heart failure

研究代表者

木場 智史 (Koba, Satoshi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40565743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：運動時に大脳皮質から生じる神経信号[=セントラルコマンド(CC)]が、どのような下降路を経由して交感神経系に出力するかは不明である。本研究は、in vivo光遺伝学実験や免疫染色・神経トレース実験から、CCが生じる脳部位と交感神経をつなぐ中枢経路の解明を目指した。さらに、その中枢経路を選択的に機能制御することで、心不全において過剰である交感神経の過剰活性が改善できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、CC関連脳部位を「線」で結びつけるという新しい試みから、19世紀からの学術課題である「運動時交感神経調節の中枢メカニズムの解明」を大きく進めた。また、「脳機能制御」という心疾患に対する未来医療の創出に向けた萌芽となり得る。

研究成果の概要(英文)：Via in vivo optogenetic experiments and neural tracings combined with immunohistochemistry, we identified central efferent pathways underlying sympathetic adjustments to exercise. A central efferent pathway responsible for excessive sympathoexcitation in heart failure was also found.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：交感神経 光遺伝学 運動 セントラルコマンド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全などの循環器疾患において、継続的運動(運動療法)の医療効果は高く、その費用対効果からも今後の本邦における心疾患医療の核をなすことが期待される。一方で、運動時の交感神経反応は心不全において過剰であり、運動療法の実施を妨げる一因である。自律神経調節の根本は脳にある。安全な運動療法の実施には、運動時交感神経反応を心不全で過剰にする中枢メカニズムを理解することは重要である。しかし健康体での運動時交感神経反応を生成する基本的なメカニズムですら、19世紀末以来の学術課題であるにも関わらず、現在でもよく分かっていない。

運動発現のために高位中枢より生じる神経信号(セントラルコマンド, CC)は、交感神経活性も引き起こすと考えられている。CCによる交感神経調節メカニズムを解明するために、CC活性化に関連する脳部位が特定されてきた。例えば研究代表者は、CCによる延髄吻側腹外側野(RVLM)の活性が交感神経活性を担うことを突き止めていた(Koba et al. J Physiol 2014)。しかし、運動時交感神経活性は全ての神経回路が保たれた脳が担う生命現象であり、個々の脳部位が独立に担うわけではない。すなわち、CCが下降して交感神経に至るまでの中枢回路を包括的に解明することが、運動時交感神経活性を担うCCメカニズムの理解につながる。しかし、CCの中枢回路に関する研究自体がなかった。

2. 研究の目的

本研究における第一の目的は、CCの中枢伝達経路を見つけ出し、その交感神経活性能を証明することであった。第二の目的は、CCの中枢伝達経路を機能制御することによって心不全における交感神経過活性を是正できるかについて検証することであった。

3. 研究の方法

(1) 実験1「CCの中枢伝達経路の可視化実験」

実験1では、ラット脳に対する免疫染色・神経トレースを行い、CCの中枢伝達経路の可視化を試みた。

(2) 実験2「CCの中枢伝達経路の機能操作実験」

実験2では、実験1で同定したCCの中枢伝達経路の電気活動を、光遺伝学を用いることで制御した。その際の交感神経活動の変化を調査することで、この神経経路の交感神経活性能を検証した。

(3) 実験3「心不全がCCの中枢伝達経路の機能操作時の交感神経活動に与える影響の調査」

心筋梗塞由来の心不全ラットモデルを作成した。実験1および2で明らかにしたCCの中枢伝達経路の機能操作時の交感神経活動変化を、健康群と心不全群とで比較した。

4. 研究成果

(1) 実験1「CCの中枢伝達経路の可視化実験」

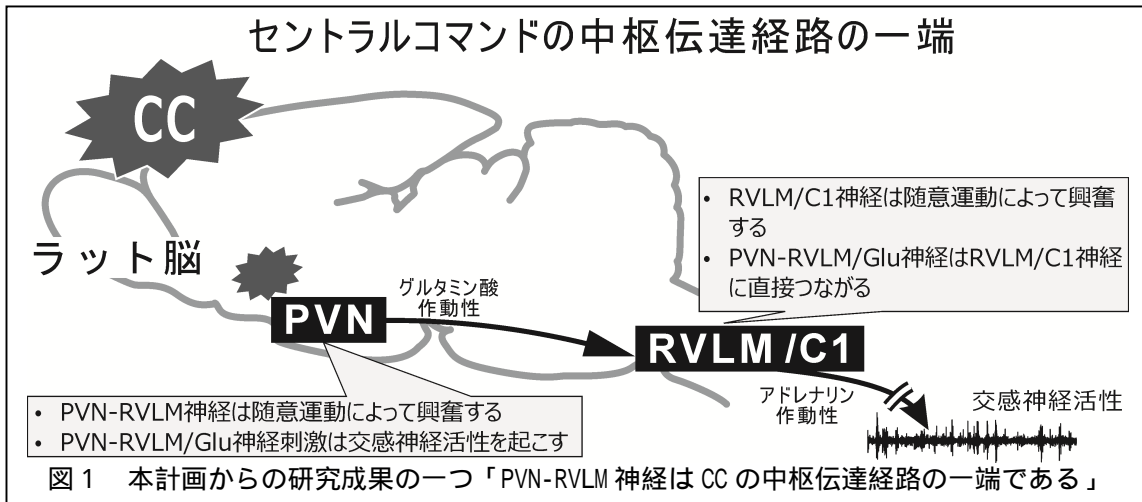
免疫染色実験から、自発性トレッドミル運動後のラットRVLMにあるC1神経では、神経活性マーカーであるFosタンパク質が発現上昇することを見出した。この結果から、RVLM C1神経は運動時に興奮すると結論した。この成果は学術論文として発表した(Kumada, Koba et al., Auton Neurosci, 2017)。

また、逆行性神経トレーサであるコレラ毒素サブユニットbによって標識された視床下部室傍核にあるRVLM投射神経(PVN-RVLM神経)では、随意的トレッドミル運動後にFosタンパク質が発現上昇することを見出した。この結果から、PVN-RVLM神経は運動時に興奮する、すなわちCCの伝達経路である可能性が考えられた。

(2) 実験2「CCの中枢伝達経路の機能操作実験」

実験1の結果を受け、PVN-RVLM神経の交感神経活性能を調査した。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用い、ラットのPVN神経あるいはRVLM投射神経に青光活性陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシンあるいはそのキメラを発現させた。そして麻酔ラットのRVLMあるいはPVNに青レーザー光を照射することでPVN-RVLM神経を選択的に刺激した。PVN-RVLM神経刺激により腎交感神経活性および昇圧・頻脈反応が引き起こされることを確認した。すなわち、PVN-RVLM神経には交感神経活性能があることを明らかにした。また、NMDA型/AMPA型グルタミン酸受容体の阻害薬であるAP5/CNQXの混合カクテルをRVLMに局所注入することで、PVN光刺激時の腎交感神経活性が減少した。PVN-RVLM神経による交感神経活性能は、RVLMにおいてグルタミン酸を放出することで生じていることが分かった。さらに、PVN-RVLM神経の共焦点レーザー顕微鏡による形態観察から、グルタミン酸作動性のPVN-RVLM神経の軸索は運動によって興奮するRVLMのC1神経の細胞体/樹状突起とシナプスを形成していることを見出した。これらの観察結果から、「グルタミン酸作動性のPVN-RVLM神経からRVLMのC1神経につながる経路は、交感神経活性能を持つ、CCの中枢回路の一端である」と結論した【図1】。この成果は学術論文として発表し(Koba et al., J Physiol, 2018)、掲載誌にはPerspectiveとして取り上げられた(Barman, J Physiol, 2018)。

PVN-RVLM神経のシナプス後細胞による交感神経活性能も確認している。神経化学シナプスを順行性に一つだけ飛び越えて感染するAAVセロタイプ1を用いてPVN-RVLM神経のシナプス後細胞にチャンネルロドプシンを発現させた。その細胞を光刺激したところ、交感神経活性が誘起さ



れた。興味深いことに、交感神経活性反応から数十～数百ミリ秒後には交感神経活動が抑制された。RVLM 内には交感神経活性神経に対する抑制性介在神経が存在することを示唆する結果であり、今後、RVLM 内局所回路の詳細な解析が必要とされる。

(3) 実験 3 「心不全が CC の中枢伝達経路の機能操作時の交感神経活動に与える影響の調査」

研究代表者も含めて複数の研究者が指摘しているように(Koba, YAM, 2018), PVN・RVLM ともに心不全における交感神経機能不全に対する関与が考えられる。そこで、PVN-RVLM 神経が心不全における交感神経過活動を担うとの仮説を検証した。ラット左冠動脈を結紮して六週以上待つことで、心筋梗塞由来の左心不全モデルを作成した。AAV を用いてラットの PVN 神経あるいは RVLM 投射神経にプロトンポンプであるアーキロドプシンあるいはクロライドポンプであるジョーズを発現させた。そして麻酔ラットの RVLM に緑光あるいは PVN に赤光を照射することで PVN-RVLM 神経を選択的に活動抑制し、その際の腎交感神経活動変化を心不全群と健常対照群とで比較した。健常対照群では光照射時の腎交感神経活動変化は見られなかった一方で、心不全群では腎交感神経活動が減少した。また、PVN-RVLM 神経を光遺伝学によって刺激した際の交感神経活性反応に対する心不全の影響も調査した。PVN-RVLM 神経刺激時の腎交感神経活性反応は、心不全群と健常対照群とで差がなかった。これらの結果から、心不全における交感神経機能不全は、この病態における PVN-RVLM 神経の感受性の向上ではなく、基本的活動が亢進することが、要因であると結論した。

PVN-RVLM 神経が心不全における交感神経機能不全の一因であることを明らかにした。この知見から、PVN-RVLM 神経の医療的な機能制御が心不全の交感神経機能不全を改善し、さらには予後を向上させ得る可能性が考えられる。すなわち PVN-RVLM 神経は心不全に対する医療の介入標的となる。今後、心不全(および自律神経機能不全を有する他の循環器疾患)に対する脳機能医療という未来医療の創出に向け、さらなる基礎研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Satoshi Koba (corr. author), Eri Hanai, Nao Kumada, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Sympathoexcitation by hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla. *Journal of Physiology* 596(19): 4581-4595, 2018. doi: 10.1113/JP276223. 【原著論文, 査読有】
- (2) Satoshi Koba (corr. author). Angiotensin II, oxidative stress, and sympathetic nervous system hyperactivity in heart failure. *Yonago Acta Medica* 61(2): 103-109, 2018. doi: 10.33160/yam.2018.06.002. 【招待総説, 査読有】
- (3) Nao Kumada, Satoshi Koba (corr. author), Eri Hanai, Tatsuo Watanabe. Distribution of Fos-immunoreactive cells in the ventral part of the medulla following voluntary treadmill exercise. *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical* 208: 80-87, 2017. doi: 10.1016/j.autneu.2017.09.014. 【原著論文, 査読有】
- (4) Satoshi Koba (corr. author). Central command: brain control of the circulation during exercise. *The Autonomic Nervous system (日本自律神経学会誌)* 53: 118-121, 2016. doi 無. 【解説記事, 査読有】
- (5) Satoshi Koba (corr. author), Ryo Inoue, Tatsuo Watanabe. Role played by periaqueductal gray neurons in parasympathetically mediated fear bradycardia in conscious rats. *Physiological Reports* 4(12): e12831, 2016. doi/10.14814/phy2.12831. 【原著論文, 査読有】
- (6) Satoshi Koba (corr. author). Exercise pressor reflex in health and diseases: Animal studies. *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 4(2): 151-160, 2015. doi: 10.7600/jpfs.4.151. 【招待総説, 査読有】
- (7) 井上峻, 木場智史(責任著者), 渡邊達生. ホワイトノイズ音曝露によって発現上昇する

ラット脳内 Fos タンパク質の観察 . 米子医学雑誌 66: 47-51, 2015. doi 無 .
http://repository.lib.tottori-u.ac.jp/ja/4973. 【原著論文, 査読有】

〔学会発表〕(計 27 件)

- (1) Satoshi Koba, Eri Hanai, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe. Involvement of PVN neurons projecting to the RVLM in sympathetic dysfunction in heart failure. FAOPS2019, 神戸市, 2019 年. 【ポスター発表】
- (2) Eri Hanai, Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe. Is sympathoexcitation by PVN-RVLM neurons augmented in heart failure? FAOPS2019, 神戸市, 2019 年. 【ポスター発表】
- (3) 木場智史, 熊田奈桜, 渡邊達生. 中脳から延髄への投射神経による運動性生体反応の生成. 第 14 回環境生理学プレコングレス, 神戸市, 2019 年. 【口頭発表】
- (4) 熊田奈桜, 木場智史. セントラルコマンドの中枢回路: 中脳から延髄への投射神経. 第 46 回自律神経生理研究会, 東京都新宿区, 2018 年. 【口頭発表】
- (5) 熊田奈桜, 木場智史, 花井映里, 渡邊達生. ラット中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野への投射神経による交感神経調節. 第 70 回日本生理学会中国四国地方会, 松山市, 2018 年. 【口頭発表】
- (6) 木場智史, 熊田奈桜, 花井映里, 渡邊達生. ラット中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野への投射神経の光遺伝学刺激による交感神経活性. 第 73 回日体力医学会大会, 福井市, 2018 年. 【口頭発表】
- (7) Satoshi Koba, Nao Kumada, Eri Hanai, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Sympathoexcitatory role for neurons projecting from the MLR to the RVLM in rats. Experimental Biology 2018, 米国サンディエゴ, 2018 年. 【ポスター発表】
- (8) Eri Hanai, Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe. Sympathetic nerve response to optogenetic inhibition of PVN-RVLM neurons in anesthetized rats with heart failure. Experimental Biology 2018, 米国サンディエゴ, 2018 年. 【ポスター発表】
- (9) Satoshi Koba. Central neural circuits underlying sympathetic adjustments to exercise. 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年. 【シンポジスト, 招待】
- (10) Satoshi Koba. Central neural mechanism underlying sympathetic hyperactivity in heart failure. 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年. 【シンポジスト, 招待】
- (11) Eri Hanai, Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe. Are PVN-RVLM neurons involved in sympathetic dysfunction in heart failure? 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年. 【ポスター発表】
- (12) Nao Kumada, Satoshi Koba, Eri Hanai, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Blood pressure regulation by neurons projecting from the mesencephalic locomotor region to the rostral ventrolateral medulla in rats. 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年. 【ポスター発表】
- (13) 熊田奈桜, 木場智史, 花井映里, 渡邊達生. 中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野への投射神経刺激による昇圧反応. 第 69 回日本生理学会中国四国地方会, 徳島市, 2017 年. 【口頭発表】
- (14) Satoshi Koba, Eri Hanai, Nao Kumada, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Effect of glutamate receptor blockade in RVLM on PVN stimulation-elicited sympathoexcitation in anesthetized rats. International Society for Autonomic Neuroscience 2017, 名古屋市, 2017 年. 【ポスター発表】
- (15) Eri Hanai, Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe. Effect of optogenetic inhibition of PVN-RVLM neurons on sympathetic nerve activity in anesthetized rats with heart failure. International Society for Autonomic Neuroscience 2017, 名古屋市, 2017 年. 【ポスター発表】
- (16) Satoshi Koba, Eri Hanai, Nao Kumada, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Optogenetic stimulation of PVN-RVLM neurons increases sympathetic nerve activity in anesthetized rats. Experimental Biology 2017, 米国シカゴ, 2017 年. 【ポスター発表】
- (17) Eri Hanai, Satoshi Koba, Tatsuo Watanabe. Posterior hypothalamic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus are activated by exercise in rats. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松市, 2017 年. 【ポスター発表】
- (18) Nao Kumada, Satoshi Koba, Tatsuo Watanabe. Distribution of activated catecholaminergic neurons by exercise in the rat ventral medulla. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松市, 2017 年. 【ポスター発表】
- (19) 花井映里, 木場智史, 熊田奈桜, 渡邊達生. 運動時交感神経活性の中枢経路の探索. 第 12 回環境生理学プレコングレス, 浜松市, 2017 年. 【口頭発表】
- (20) 花井映里, 木場智史, 渡邊達生. 視床下部後部から視床下部室傍核への中枢経路は運動によって活性化される. 第 68 回日本生理学会中国四国地方会, 岡山市, 2016 年. 【口頭発表】

- (21) 木場智史, 花井映里, 熊田奈桜. 運動トレーニングと循環中枢回路. 計測自動制御学会
ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2016, 大阪市, 2016 年. 【シンポジスト, 企
画, 招待】
- (22) Satoshi Koba, Momone Kato, Eri Hanai, Ryo Inoue, Tatsuo Watanabe. Central efferent
projections to medulla for autonomic adjustments to exercise in rats. Experimental
Biology 2016, 米国サンディエゴ市, 2016 年. 【ポスター発表】
- (23) 木場智史. 心不全における運動時交感神経調節の異常と酸化ストレス. 第 93 回日本生理
学会大会, 札幌市, 2016 年. 【シンポジスト, 招待】
- (24) 加藤百音, 木場智史, 井上峻, 渡邊達生. ラット中脳中心灰白質から延髄吻側腹外側野
への遠心性投射の構造解析. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌市, 2016 年. 【ポスター発
表】
- (25) 花井映里, 木場智史, 渡邊達生. ラット視床下部室傍核内において運動により活性化す
る細胞群に地域差は生じるか. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌市, 2016 年. 【ポスター
発表】
- (26) 木場智史. セントラルコマンド: 運動時の循環系の中枢制御. 第 68 回日本自律神経学会
総会, 名古屋市, 2015 年. 【シンポジスト, 招待】
- (27) Satoshi Koba. Central command regulation of sympathetic nerve activity in health
and heart failure. The 11th WORLD CONGRESS of the International Society for ADAPTIVE
MEDICINE (ISAM 2015), 米子市, 2015 年. 【シンポジスト, 招待】

〔その他〕

ホームページ等

- (1) https://researchmap.jp/satoshi_koba/
- (2) http://researchers.adm.tottori-u.ac.jp/html/100000153_ja.html
- (3) <https://orcid.org/0000-0003-0764-7053>