

令和元年6月6日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08196

研究課題名(和文)呼吸リズム生成時の細胞活性化順序の秩序形成に寄与する細胞種ならびに細胞機能の検討

研究課題名(英文) Roles of neuron types and functions defining general framework for activation sequence of inspiratory neurons during inspiratory rhythmic bursts

研究代表者

尾家 慶彦(OKE, Yoshihiko)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50396470

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)：本研究では、呼吸ニューロンの種類と自発的同期活動(バースト)時の呼吸ニューロンの活性化タイミングならびに活性化順序との関係を調査した。その結果、各バーストの初期には、バーストとは相関が比較的低いが同期して活動するタイプの呼吸ニューロンのいずれかが活性化することを発見した。一方、バーストと高い相関を示したタイプの呼吸ニューロンは、各バーストの中期以降に活性化していた。興奮性ニューロン・グリシン抑制性ニューロンの間には、活性化タイミングならびに順序に関して有意な差は無かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸活動をはじめとする生命活動に必須な運動に関する神経ネットワークには、頑強性が要求される。本研究の成果は、呼吸中枢がもつ柔軟なネットワークダイナミクスの意義に迫る結果であり、機能的な神経ネットワークの新たなパラダイムを提供しており、新しい概念の神経マップの作成等を通じて脊髄損傷の再生医療などに貢献することが期待出来る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated relationships between inspiratory neuron types and activation sequence during rhythmic bursts in the pre-Botzinger complex (preBotC). In earlier phase during each rhythmic burst, any one of inspiratory neurons of which activation patterns showed small maximum cross-correlation coefficient (maxCC) with bursting pattern were activated. On the other hand, inspiratory neurons with large maxCC were activated at/after middle phase. There was no significant differences between activation timings of excitatory and inhibitory inspiratory neurons.

研究分野：神経生理学

キーワード：呼吸中枢、preBotzinger complex、自発的同期活動、神経ネットワーク、二光子顕微鏡、カルシウムイメージング、抑制性ニューロン

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

1. 研究開始当初の背景

呼吸リズムは、呼吸中枢に存在するニューロンの自発的同期活動で生成される。哺乳類では、呼吸リズム生成に関与するペースメーカー領域として、延髄腹外側に preBotzinger complex (preBotC) と parafacial respiratory (pFRG) と呼ばれる二ヶ所の存在が知られている。これらのペースメーカー領域で自発的に呼吸リズムが生成するメカニズムは、現在でも解き明かされていない。呼吸リズム生成に関する研究に関しては、個体からスライスの系まで様々な実験系で、多くの発見がなされてきた。例として、マウスの *in vivo* 実験による抑制性ニューロンの寄与の発見 (Paton et al. J. Physiol. 1995)、マウス摘出脳幹標本を用いた preBotC と pFRG の領域間の活動の相関関係 (Oku et al. J. Physiol. 2007)、preBotC を含むスライス標本 (呼吸スライス) を用いた興奮性ならびに抑制性のペースメーカーニューロンの発見 (Morgado-Valle et al. J. Neurosci. 2010, Koizumi et al. J. Neurosci. 2013) などが挙げられる。しかしながら、これらの結果は、単一呼吸ニューロンの特性やペースメーカー領域間の活動の相関関係などに注目したものであり、呼吸ニューロンがどのように連携してネットワークを形成して自発的同期活動を引き起こしているのかについてはほとんど調べられていなかった。

近年になり、呼吸ニューロンネットワークの機能的構造への注目が高まってきた。最近の研究では、自発的同期活動時には、ネットワーク内の呼吸ニューロンは確率的に活性化している可能性が示唆されている (Carroll and Ramirez, J. Neurophysiol. 2013)。我々もカルシウムイメージングによる予備実験で、同期して活性化する呼吸ニューロンの組合せや順番は自発的同期活動ごとに変化しており、呼吸ニューロンネットワークのダイナミクスは緩やかな秩序のもとで柔軟に変化することを確認していた。しかしながら、ネットワークダイナミクスがどのような秩序の下で変化しているのか、またこのダイナミクスの変化と呼吸リズム生成という生理現象の関係性などは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

呼吸中枢内の自発的同期活動を生み出すニューロンネットワークの構造・機能に迫るために、呼吸ニューロンネットワークが持つ「柔軟に変化するダイナミクスの秩序」の生理学的な意義を調べることを目標とした。具体的には、ネットワークダイナミクス変化に秩序を与えている規則性を明らかにするために、興奮性・抑制性などの呼吸ニューロンのタイプとそれぞれのタイプの呼吸ニューロンが自発的同期活動時に活性化する順番の関連性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、生後 3~8 日齢の GlyT2-EGFP/GAD65-tdTomato ダブルトランスジェニックマウスを使用した。実験サンプルには、呼吸リズムを再現可能な preBotC を含む脳幹部スライス標本 (呼吸スライス) を用いた。preBotC 領域のニューロンの活動は二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングデータで記録し、呼吸ニューロンの自発的同期活動 (呼吸バースト) のタイミングを決定するための参照データとして細胞外局所電位 (LFP) の計測を同時に行った。カルシウムイメージングを行うために、カルシウム指示薬である Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) を preBotC へ圧力注入して細胞を染色した。

preBotC の画像撮影は、250 × 250 μm のエリアで行った。蛍光静止画像の撮影は、[Ex/Em]=[720, 641/75], [800, 531/40], [900, 475/50] nm の各条件で行った。Image-J の spectral unmixing plug-in を使用して蛍光の漏れ込み補正を行った後に、それぞれ tdTomato, OGB-1, EGFP の蛍光を反映した画像としてニューロンの分類に用いた。カルシウムイメージングは、[Ex/Em]=[800, 531/40] の撮影条件で、100 回以上の呼吸バーストが含まれるように 10Hz の撮影速度で撮影を行った。LFP で計測される呼吸活動と各ピクセルの蛍光強度の時系列パターンとの間で時間依存相互相関解析を行い、呼吸ニューロンを検出した。

検出した呼吸ニューロンの分類を蛍光静止画像とのマッチングにより行った。さらに、呼吸ニューロンを、比較的大きな相互相関係数の最大値 (MaxCC 値) を持つ Regular type と比較的小さな MaxCC 値を持つ Irregular type に分類した。

呼吸ニューロンの活性化タイミングを全ての呼吸バーストで決定した。まず、各呼吸バーストで、LFP の積分値が最大となるタイミングを ($t = 0$) と定義した。各バーストの ($t = \pm 2.5$ 秒) 以内で、呼吸ニューロンの蛍光強度が最大となる時間を、その呼吸ニューロンのその呼吸バーストでの活性化タイミングとした。活性化タイミングをもとに呼吸ニューロンの活性化順序を全呼吸バーストで決定した。対象とした呼吸バーストは、計測対象とした呼吸細胞の 50% 以上の数が活性化した場合のみとした。

4. 研究成果

(1) 呼吸ニューロンの分類

時間依存相互相関解析と蛍光タンパク質の発現情報の結果を基にして、呼吸細胞の GlyT2+/-、GAD65+/- のタイプの分類を最初に行った。続いて、細胞内カルシウム濃度の時系列パターンと LFP の類似性、すなわち MaxCC 値を基にして、さらに分類を行った。後者の分類方法では、大きい MaxCC 値を持ち呼吸バースト時に大きくはっきりとした細胞内カルシウム濃度上昇の波形を示す Regular type の呼吸ニューロンと、比較的小さな MaxCC 値を持ち呼吸バースト時に短時

間に小さいカルシウム濃度上昇を示す Irregular type の呼吸ニューロンに分類できた。これら 2 つの分類方法を組み合わせ、最終的に、Regular type の興奮性呼吸ニューロン (GlyT2⁺/GAD65⁻; R-Ex) とグリシン抑制呼吸ニューロン (GlyT2⁺/GAD65⁻; R-Gly) として Irregular type の興奮性呼吸ニューロン (GlyT2⁺/GAD65⁻; Irr-Ex)・グリシン抑制呼吸ニューロン (GlyT2⁺/GAD65⁻; Irr-Gly) ならびに Cotrans 抑制呼吸ニューロン (GlyT2⁺/GAD65⁺; Irr-Cotrans) の 5 種類の呼吸細ニューロンの検出に成功した。我々が解析を行った 5 つのサンプルでは、それ以外のタイプの呼吸ニューロンは、検出されなかった。

(2) 呼吸バースト時に各タイプの呼吸ニューロンが活性化するタイミング

(1) で分類した呼吸ニューロンの 5 つのグループ間の活性化タイミングの比較を行った。活性化タイミングの分布、活性化タイミングの平均値、各グループに属する呼吸ニューロンのいずれか 1 つ以上が ($t = 0$ 秒) もしくは ($t = 0.5$ 秒) で活性化した呼吸バーストの回数の全呼吸バースト回数に対する割合の調査を行った。その結果、Irregular type の呼吸ニューロンは 3 群とも、Regular type の呼吸ニューロン 2 群どちらよりも早いタイミングで活性化する傾向があった。ただし、Irr-Cotrans は、活性化タイミングの分布が大きく広がっており、活性化タイミングの平均値で比較すると最も遅かった。一方、グループ内のいずれかの細胞が呼吸サイクルの早いタイミングで活性化する割合は、Irr-Ex と Irr-Gly が R-Ex, R-Irr, Irr-Cotrans よりも有意に多かった。これらの結果から、Irr-Ex と Irr-Gly に属する呼吸ニューロンは自発的同期活動の初期に活性化するリーディングタイプの呼吸ニューロンであることが示唆された。

(3) 呼吸ニューロンのタイプと活性化する順番のパターンとの関係

活性化順序の各順番において、どのタイプの呼吸ニューロンが多く活性化しているのかを調べた。また、呼吸ニューロン数のタイプ間での違いの影響を排除するために、それぞれのタイプに属する呼吸ニューロンは活性化順序中のどの順番で多く活性化しているのかについて調べた (ある順序での活性化回数/全活性化回数をニューロンタイプごとに計算)。いずれの解析結果においても、Irr-Ex と Irr-Gly が活性化順序の初期で活性化しやすく、両者は同じような傾向を持っていることが分かった。R-Ex と R-Gly は、活性化順序の中盤以降に活性化しやすかったが、R-Ex のほうがより終盤まで活性化することが多かった。Irr-Cotrans は、活性化順序の終盤で活性化することが多かった。

これらの結果から、preBotC の呼吸ニューロン間の活性化順序は呼吸バースト毎に変化しているが、その順番の大枠は呼吸ニューロンのタイプによって決まっていることが考えられる。また、Irregular type の呼吸ニューロンが、呼吸バースト生成を主導している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

三分一史和, 尾家慶彦. 「ニューロイメージングデータの時空間解析」バイオメカニズム学会誌, (2019). (依頼論文・査読無・受諾済)

S. Hulsmann, Y. Oke, G. Mesuret, A. T. Latal, M. G. Fortuna, M. Niebert, J. Hirrlinger, J. Fischer and K. Hammerschmidt. The postnatal development of ultrasonic vocalization-associated breathing is altered in glycine transporter 2-deficient mice. *J. Physiol.* 597(1), 173-191 (2019). DOI: 10.1113/JP276976. (査読有)

Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, J. Hirrlinger and S. Hulsmann. Cell type-dependent activation sequence during rhythmic bursting in the preBotzinger complex in respiratory rhythmic slices from mice. *Front. Physiol.* 9, 1219 (2018). DOI: 10.3389/fphys.2018.01219. (査読有)

Y. Oke, D. Boiroux, F. Miwakeichi and Y. Oku. Stochastic activation among inspiratory cells in the pre-Botzinger complex of the rat medulla revealed by Ca²⁺ imaging. *Neurosci. Lett.* 595, 12-17 (2015). DOI: 10.1016/j.neulet.2015.04.003. (査読有)

[学会発表](計 18 件)

Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, J. Hirrlinger and S. Hulsmann. Cell type-based activation timing and order in the sequence in the pre-Botzinger complex. 9th Congress of the Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Kobe, Japan (2019).

S. Hulsmann, Y. Oke, G. Mesuret, A. T. Latal, M. G. Fortuna, M. Niebert, J. Hirrlinger, J. Fischer and K. Hammerschmidt. Glycine transporter 2-deficient mice show an altered development of the ultrasonic vocalization-associated breathing. 13th Gottingen Meeting of the German Neuroscience Society, Gottingen, Germany (2019).

Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, J. Hirrlinger and S. Hulsmann. Activation timing and

order in the sequence during rhythmic burst is dependent on cell type of inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex of the mice medulla slice. The 48th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2018), San Diego, USA. (2018). F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, Andreas Galka and S. Hulsman. Spatio-temporal analysis of multi-neuronal imaging data and visualization of spontaneous neuronal activation patterns (マルチニューラルイメージングデータの時空間解析と自励的神経活動化パターンの視覚化). The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第41回日本神経科学学会大会), Kobe, Japan (2018).

尾家慶彦, 三分一史和, 越久仁敬, S. Besser, J. Hirrlinger and S. Hulsman. マウス延髄スライスの吸息性中枢内で吸息性細胞が自励的同期活動を行う際の細胞種依存的な活性化順序パターン. 第110回近畿生理学談話会, 神戸大学, 神戸, 日本 (2017). Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger and S. Hulsman. Neuronal type-dependent stochastic activation sequence among inspiratory neurons during rhythmic burst in the pre-Botzinger complex of the mice medulla slice. The 47th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2017), Washington DC, USA. (2017). F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, J. Hirrlinger and S. Hulsman. Detection of irregularly firing inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex based on spatio-temporal optical imaging data analysis. The 47th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2017), Washington DC, USA. (2017).

Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger and S. Hulsman. General pattern of activation sequence among excitatory/inhibitory inspiratory neurons during rhythmic burst in the pre-Botzinger complex of the mice medulla slice. The 14th Oxford Conference on Modelling and Control of Breathing, Oxford, UK. (2017). F. Miwakeichi, Y. Oke, S. Besser, J. Hirrlinger and S. Hulsman. Estimation of spontaneous synchronous neuronal network based on spatio-temporal optical imaging data analysis. ISI-ISM-ISSAS Joint Conference TOKYO 2017, Tokyo, Japan. (2017). 三分一史和, 尾家慶彦, 越久仁敬, S. Besser, J. Hirrlinger, S. Hulsman. Detection of irregularly firing inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex based on spatio-temporal optical imaging data analysis. 統計数理研究所共同研究集会 生体信号・イメージングデータ解析に基づくダイナミカルバイオインフォマティクスの展開, 統計数理研究所, 東京, 日本 (2017).

Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger and S. Hulsman. Rhythmic activation patterns of excitatory/inhibitory inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex of the mice medulla slice (マウス延髄スライス標本の pre-Botzinger complex における自発的同期活動を起こす興奮性ならびに抑制性の吸息性ニューロンの活性化パターン). The 94th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (第94回日本生理学会大会), Hamamatsu, Japan (2017). (Symposium session: Multi-level understanding of the respiratory neuron network function: From microcircuit in medullary slices to freely moving conscious animals")

Y. Oke, F. Miwakeichi, Y. Oku, S. Besser, J. Hirrlinger and S. Hulsman. Development of inhibitory inspiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice (発達過程における新生児マウスの Pre-Botzinger complex 領域における吸息性抑制ニューロン数の変化). The 93rd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (第93回日本生理学会大会), Sapporo, Japan (2016).

F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, G. Andreas and S. Hulsman. A statistical strategy of optical imaging data analysis to differentiate neurons and astrocytes in the brain stem. Statistical Computing Asia 2015, Taipei, Taiwan (2015). F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, A. Galka and S. Hulsman. A statistical mapping strategy to identify inspiratory neurons among active cells in the pre-Botzinger complex. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology, Milan, Italy (2015).

三分一史和, 尾家慶彦. A statistical mapping strategy to identify inspiratory neurons among active cells in the pre-Botzinger Complex. データ科学シンポジウム 2015 - 欠測データ解析とモデル選択: 生体情報 データの統計モデル, 大阪大学, 大阪, 日本 (2015).

N. Yagi, S. Nagami, H. Ueno, T. Yabe, J. Kayashita, M-K. Lin, Y. Oke and Y. Oku. Noninvasive assessment of swallowing function by sound frequency analysis. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology, Milan, Italy (2015).

Y. Oke, D. Bouiroux, F. Miwakeichi and Y. Oku. Stochastic activation of inspiratory cells in the pre-Botzinger complex with loose regularity during spontaneous inspiratory rhythmic bursts (自発的な吸息性バースト時には、pre-Botzinger complex 領域に存在する吸息性細胞は緩やかな秩序に従って活性化する). The 38th Annual

Meeting of the Japan Neuroscience Society (第38回日本神経科学大会), Kobe, Japan (2015).

F. Miwakeichi, Y. Oke, Y. Oku, Andreas Galka and S. Hulsmann. Differentiation of neurons and astrocyte in brain stem by statistical image processing methods (統計的画像解析による脳幹のニューロン、アストロサイトの識別). The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第38回日本神経科学大会), Kobe, Japan (2015).

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三分一 史和

ローマ字氏名：(MIWAKEICHI, fumikazu)

所属研究機関名：統計数理研究所

部局名：モデリング研究系

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30360647

(2)研究協力者

研究協力者氏名：越久 仁敬

ローマ字氏名：(OKU, yoshitaka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。