

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12889

研究課題名(和文) 生動物 2光子イメージングとMEMS神経マシンによる迷走神経終末動態の解明

研究課題名(英文) Measurements of vagal nerve activity by using in vivo two-photon imaging and MEMS electric recording

研究代表者

神谷 厚範 (Kamiya, Atsunori)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・循環モデル解析研究室長

研究者番号：30324370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自律神経系は、全身に分布する求心性神経(感覚神経)が様々な生体情報を感知したり(求心性神経)、全身の臓器を個別に調節する(遠心性神経)ことによって、複数臓器を機能的に連関させて、循環・呼吸・エネルギー代謝・体温調節などの生体恒常性を維持する共に、生命を維持する、重要な生体制御機構です。しかし、計測技術の未発達のため、限られた臓器や神経種でしか自律神経の活動は明らかではありません。本研究では、これまで計測困難だった迷走神経の電気活動を記録すると共に、これまで測定されなかった臓器内部における迷走神経活動の記録を行いました。

研究成果の概要(英文)：Autonomic nervous system senses various biosignal by afferent (sensory) nerve fibers locating at whole body and regulate individual organs by efferent nerve fibers, and thus is one of key mechanisms that organize multiple organs functionally and maintain homeostasis (i.e., circulation, respiration, energy metabolism, thermoregulation) and life. However, because of less-developed technology for measurement of nerve activity, autonomic nerve activity is unclear except limited organs and nerve-types. In this study, we have recorded vagal nerve activity that has been known as difficult to be measured, and also did intra-organ vagal nerve activity that has never been measured.

研究分野：複合領域

キーワード：自律神経

1. 研究開始当初の背景

ヒトの身体は、多数の臓器や細胞から構成されており、その臓器間の機能的な連携や協調が適切になされてはじめて、個体としての機能を発揮することが可能となります。自律神経系は、全身の臓器に分布する求心性神経（感覚神経）が様々な生体情報を感知してそれを脳に送り（求心性神経）、脳での情報処理を経て、全身の臓器を個別に調節する（遠心性神経）ことによって、複数臓器を機能的に連携・協調させて、循環・呼吸・エネルギー代謝・体温調節などの生体恒常性を維持する共に、生命を維持する、重要な生体制御機構です。一方、このため、自律神経系の異常は、多様な難治性疾患と密に関わるとも、考えられています。

ところが、自律神経の活動の記録は、多くの場合において困難であり、これが、自律神経系の理解する上での問題となっています。とりわけ、迷走神経は、交感神経に比してさらに計測が難しいと考えられており、交感神経系よりも迷走神経系の解明が遅れている一因となっています。

小動物における末梢神経活動の記録について、ひとつ目の問題点は、生きた生体において、臓器特異的な神経種特異的な神経活動が一体どのようであるかについては、一部の臓器を除いて、記録が困難であることです。

末梢神経は複数臓器を支配する求心性神経線維や遠心性神経線維の束であるのに、従来の神経測定技術では、神経束全体の記録か、あるいは神経束を切断単離しての記録であるため、線維構成が単一な一部の神経しか記録できない。この技術的な制限のために、一部の臓器を除いて、臓器毎の自律神経活動については理解が不十分である。

動物実験における、自律神経の電気活動の記録は、多くの場合、ワイヤ電極という神経束に巻きつける形の電極が使用されてきました。しかしながら、神経束とは、複数種類の神経線維の束であり、交感神経線維・副交感神経線維・求心性神経線維が入り混じっていると共に、様々な臓器に分布する神経線維から構成されています。このため、神経束に巻きつける形状のワイヤ電極は、原理的に、この様々な神経線維に由来する電気活動が加算された信号を記録することになります。それでも、神経束を構成する神経線維が比較的単一種類である場合には、電極巻きつけ部位の中核側（あるいは末梢側）で結紮するなどして遠心性神経（あるいは求心性神経）の信号を消失させることと組み合わせるなどすることによって、特定の臓器由来の特定種類の自律神経活動を記録できますが（例、腎神経からの腎臓交感神経活動の記録）、多くの

場合は、このような神経活動の記録が困難です。また、一部の研究においては、神経束ではなく、神経束を切断単離しての単一から数個の神経線の記録が試みられていますが、多数（何千本など）の神経線維のうちの数本であり、その由来臓器や神経種を正しく見極めるのも多くの場合には困難を伴います。以上の問題点は、迷走神経についても該当いたしますので、迷走神経の、臓器特異的な活動、求心性や遠心性の個別の活動については、理解が進んでいないのが現状です。

小動物における末梢神経活動の記録について、ふたつ目の問題点は、上記などの末梢神経の電気的記録は、臓器の外で神経活動を記録しているために、臓器の内部における神経活動については、分かり得ないという点です。末梢神経は、臓器の内部において、臓器内の他細胞や環境と接しており、神経臓器インターフェイスを形成しています。求心性神経の場合は、臓器の内部の、様々な物理的環境（メカノ刺激、温度等）、化学的環境（pH、イオン等）、生理活性物質の環境 - 様々なペプチド、ホルモン、サイトカイン、ATP、分泌小胞など - を感知していますが、臓器の内部において実際にどのように神経がこれらの環境・生体信号を感知し応答するのか、その臓器の内部における実像は明らかではありません。また、遠心性神経の場合は、効果器臓器の内部の、様々な細胞に対して、神経が実際にどのように作用しているのか、臓器や細胞の3次元構造をふまえた神経動態の実像も、明らかではありません。これは、自律神経が臓器内情報を感知したり、臓器内細胞を調節したりする機構を理解する上で、とても重要な点だと思われませんが、この点に踏み込むような研究は、ほとんど行われていません。迷走神経についても、このような、臓器内部の迷走神経の動態の関する理解は、進んでいないような状況です。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの自律神経の神経測定技術では十分に捉えることの出来なかった、臓器特異的かつ求心性・遠心性線維の別の迷走神経の電気活動や、また、臓器の内部における迷走神経活動の測定を目指して、次の研究を目的としました。

MEMS 神経マシンによる迷走神経の線維別電気活動解析

迷走神経を対象として、MEMS 技術を駆使した世界最小レベルのピッチのタングステン微小電極針アレイを神経保護チューブに複数装填したMEMS 神経マシン（神経物理インターフェイス）を開発する共に、これを

生きた動物の末梢迷走神経に装着し、迷走神経束内の神経線維の個々の活動を記録することを目指します。従来法では記録が困難だった臓器の迷走活動の記録に取り組むことを、研究の目的といたしました。

遺伝学的 2 光子イメージングによる迷走神経の可視化解析

迷走神経を対象として、従来の神経測定技術ではまったく測定されて来なかった、臓器の内部における神経線維の活動動態を記録することを目指して、臓器内部の迷走神経活動を可視化し解析する実験系の構築に取り組むことを、研究の目的といたしました。

3 . 研究の方法

MEMS 神経マシンによる迷走神経の線維別電気活動解析

SD ラット (体重 300-500g) を対象に、吸入麻酔下 (イソフルラン等) に、頸部皮膚を切開し、頸部の右迷走神経を剖出し、その右あるいは左の迷走神経に MEMS 神経マシン (神経物理インターフェイス装置) を装着しました。また、右鼠径部皮膚を切開し、右大腿動脈を剖出し、血圧測定用の細径カテーテルを挿入して留置した (ヘパリン処理)。さらに、右大腿静脈を剖出して、薬液投与用の細径カテーテルを挿入して留置した (ヘパリン処理)。その後、切開部分を縫合し、麻酔から覚醒させました。数日後、覚醒下において、頸部迷走神経活動と血圧、心拍数を測定しました。さらに、大腿静脈から昇圧剤 (フェニレフリン) と降圧剤 (ニトロプルシド) を投与して、血圧変化に対する心臓支配の遠心性迷走神経活動の応答を測定しました。

また、別ラットを対象に、吸入麻酔下 (ハロセン等) に、心窩部皮膚と筋を切開し、横隔膜貫通部の左右迷走神経を剖出し、MEMS 神経マシン (神経物理インターフェイス装置) を装着しました。また、胃に注入用カテーテルを挿入しました。胃内圧変化に対する、胃に分布する求心性迷走神経活動の応答を測定しました。

遺伝学的 2 光子イメージングによる迷走神経の可視化解析

迷走神経特異的に遺伝子操作できるドライバーラット、および、Ca 濃度依存性に緑蛍光を発する Ca プローブタンパク (GCaMP3 等) を遺伝子発現させるレポーターラットの 2 種を、を独自に開発しました。これら 2 種ラットを交配して、迷走神経特異的に Ca プ

ローブタンパクが発現するような 2 重トランスジェニックラットを作成しました。この動物を対象として (体重 300-500g) 吸入麻酔下 (イソフルラン等) に適切に皮膚や筋を切開して、観察対象臓器 (膵臓など) を、2 光子顕微鏡 (オリンパス) の対物レンズ下に動物を設置して、対象臓器の内部における迷走神経 Ca 活動を可視化するイメージング実験を行いました。

4 . 研究成果

MEMS 神経マシンによる迷走神経の線維別電気活動解析

記録した頸部迷走神経の特徴や応答から、頸部迷走神経の活動の多くは、支配臓器の情報を脳に伝達する求心性神経の活動であるように、推察されました。活動のごく一部 (1 ~ 数%) に、心拍に同期する特徴のある神経活動が観察され、これは、心臓に分布する遠心性の迷走神経活動であると推察されました。この心拍への同期は、心拍および心拍出 - 動脈圧変化 (拡張期から収縮期血圧への連続的な動脈圧変化) - 圧受容器における当該圧変化の感知 - 脳の情報処理 - 迷走神経活動の増加、という仕組みによって起こったと思われました。また一方、昇圧剤 (フェニレフリン) を投与したところ、この心臓に分布する遠心性の迷走神経活動は直ちに増加し、さらに、降圧剤 (ニトロプルシド) の投与によって神経活動は低下しました。この神経応答からも、この神経活動は、心臓に分布する遠心性の迷走神経活動であると推察されました。

心臓に分布する迷走神経活動は、循環器疾患 (心不全など) の病態においては、神経活動が抑制されると推測され、迷走神経の刺激がこの病態を改善する治療効果をもたらしたという動物実験の報告があります。ところが、心臓に分布する迷走神経活動を実際に記録したという報告は殆どなく、神経活動やその病態における変化についての理解は不十分だと言えます。本研究の成果は、循環器疾患における迷走神経の変化を理解したり、その治療の開発につながる可能性があります。

また、胃に分布する求心性迷走神経活動の、胃の内圧変化に対する応答を記録しました。神経活動は、胃の内圧が閾値を超える前はわずかに増加しただけでしたが、閾値を超えた後では相対的に大きく一次線形性に増加しました。ここで測定した、胃に分布する求心性迷走神経活動は、肥満動物では神経の活動や応答性が減弱するとも推測されています。本研究成果は、このような肥満などエネルギー代謝疾患の病態の理解にもつながる成果

だと思われます。

遺伝学的2光子イメージングによる迷走神経の可視化解析

膵臓に分布する迷走神経C a活動を、麻酔下の生きたラットにおいて、膵臓の内部において、2光子イメージングで可視化しました。この神経活動は、糖尿病モデルラットでは、やや、減弱する傾向を示しました。この結果は、糖尿病では、膵臓支配の迷走神経活動の抑制が、病態生理に關与している可能性を示唆いたします。これは、今後、糖尿病における迷走神経の異常をさらに理解したり、それに介入する治療の開発につながる可能性のある成果です。

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)

すべて査読有り

1. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Turner MJ, Fukumitsu M, Yamamoto H, Kamiya A, Shishido T, Sugimachi M. Sodium ion transport participates in non-neuronal acetylcholine release in the renal cortex of anesthetized rabbits. *J Physiol Sci.* 2017 Sep;67(5):587-593. doi: 10.1007/s12576-016-0489-5. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27660058 (査読有)
2. Kawada T, Shimizu S, Yamamoto H, Miyamoto T, Kamiya A, Shishido T, Sugimachi M. Effects of different input pressure waveforms on the carotid sinus baroreflex-mediated sympathetic arterial pressure response in rats. *J Appl Physiol.* 2017 Jul 27;jap.00354.2017. doi: 10.1152/japphysiol.00354.2017. PMID: 28751370 (査読有)
3. Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Fukumitsu M, Kamiya A, Sugimachi M. Desipramine increases cardiac parasympathetic activity via α 2-adrenergic mechanism in rats. *Auton Neurosci.* 2017 Jul;205:21-25. doi: 10.1016/j.autneu.2017.02.005. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28242182 (査読有)
4. Kamiya A, Hayama Y, Shimizu S, Kawada T. State-space representation of extended Guyton's model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017 313(2); H320-H322. DOI: 10.1152/ajpheart.00315.2017 (査読有)
5. Kawada T, Turner MJ, Shimizu S, Fukumitsu M, Kamiya A, Sugimachi M. Aortic depressor nerve stimulation does not impede dynamic characteristics of the carotid sinus baroreflex in normotensive or spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2017 May 1;312(5):R787-R796. DOI: 10.1152/ajpregu.00530.2016 (査読有)
6. Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Fukumitsu M, Kamiya A, Sugimachi M. Desipramine increases cardiac parasympathetic activity via α 2-adrenergic mechanism in rats. *Auton Neurosci.* 2017 Jul;205:21-25. doi: 10.1016/j.autneu.2017.02.005. (査読有)
7. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Turner MJ, Fukumitsu M, Yamamoto H, Kamiya A, Shishido T, Sugimachi M. Sodium ion transport participates in non-neuronal acetylcholine release in the renal cortex of anesthetized rabbits. *J Physiol Sci.* 2017 Sep;67(5):587-593. DOI: 10.1007/s12576-016-0489-5 (査読有)
8. Shimizu S, Kawada T, Une D, Shishido T, Kamiya A, Sano S, Sugimachi M. Hybrid stage I palliation for hypoplastic left heart syndrome has no advantage on ventricular energetics: a theoretical analysis. *Heart Vessels.* 2016 Jan;31(1):105-13. doi: 10.1007/s00380-014-0604-6. Epub 2014 Nov 29. PMID: 25432766 (査読有)
9. Shimizu S, Kawada T, Une D, Fukumitsu M, Turner MJ, Kamiya A, Shishido T, Sugimachi M. Partial cavopulmonary assist from the inferior vena cava to the pulmonary artery improves hemodynamics in failing Fontan circulation a theoretical analysis. *J Physiol Sci.* 2016 May;66(3):249-55. doi: 10.1007/s12576-015-0422-3. Epub

2015 Nov 6. PMID: 26546008 (査読
有)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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 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

神谷 厚範 (KAMIYA ATSUNORI)
国立研究開発法人国立循環器病センター
研究所 循環モデル解析研究室長
研究者番号：30324370

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

杉町 勝 (SUGIMACHI MASARU)
国立研究開発法人国立循環器病センター
研究所 部長
研究者番号：40250261

小林 和人 (KAZUTO KOBAYASHI)
公立大学法人福島県立医科大学
生体情報伝達研究所生体機能研究部門
教授
研究者番号：90211903

(4)研究協力者

なし