

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590218

研究課題名(和文)

呼吸リズムパターン形成に関わる頸髄呼吸神経回路網の全容解明

研究課題名(英文)

Analysis of the neuronal network that generates respiratory rhythm and pattern

研究代表者

岡田 泰昌 (OKADA YASUMASA)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：80160688

研究成果の概要(和文):

呼吸のリズムとパターンの形成に関与する頸髄呼吸神経細胞集団の機能と解剖を明らかにするため、ラット *in vitro* 脳幹脊髄標本、*in situ* 経動脈灌流標本を用い、膜電位イメージング、電気生理学的計測、組織学的分析を組み合わせた解析を行った。C1-C2 の高位頸髄腹側部に新たな介在性呼吸神経細胞群を発見し、HCRG と命名して報告した。横隔神経核(C3-C5)レベルの呼吸神経活動の時空間的動態と解剖を詳細に解析し、同レベルには横隔膜と斜角筋を支配する運動神経細胞が分かれて、そして、異なる活動パターンで存在していることを明らかにした。本研究の成果は、頸髄損傷などによる呼吸障害について、病態理解と再生医学も含めた新しい治療法開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文):

To elucidate the function and anatomy of the respiratory neuron groups in the cervical spinal cord that are involved in respiratory rhythm and pattern generation, we conducted voltage imaging, electrophysiological recording and immunohistological analyses in *in vitro* and *in situ* rat preparations. We found a novel respiratory neuron group in the high (C1-C2) cervical spinal cord, and reported it as "High Cervical Spinal Cord Respiratory Neuron Group (HCRG)". We also analyzed the spatiotemporal profiles of the respiratory neurons at the level of the phrenic nucleus (C3-C5 level), and found that phrenic and scalene motoneurons are located at the same level but separately with distinct activity patterns. These findings will be the basis to better understand the pathophysiology of respiratory disturbance accompanied with cervical spinal cord injury and to develop new treatment modality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・生理学一般

キーワード： 呼吸調節、膜電位イメージング、高位頸髄呼吸神経細胞群、呼吸リズム、呼吸パターン形成、横隔神経核、横隔膜、斜角筋

### 1. 研究開始当初の背景

頸髄呼吸神経回路網は、最も主要な吸息筋である横隔膜を駆動する横隔神経核のみでなく、種々の補助呼吸筋を駆動する呼吸運動神経細胞群を含み、呼吸神経出力のパターン形成において重要な役割を果たしている。さらに、動物実験で延髄脊髄境界部での横切断により脊髄を脳幹から離断しても横隔神経出力が維持される場合があることより、頸髄呼吸神経回路網は、それ自身が呼吸リズム形成能を有している可能性があると考えられるなど、中枢性呼吸調節において重要な意義を有する。しかし、頸髄呼吸神経回路網の機能と形態の全容は十分には理解されていなかった。

### 2. 研究の目的

中枢性呼吸調節機構を理解するため、呼吸リズムパターン形成に関与する頸髄呼吸神経回路網の全容解明を目指す。高位頸髄の呼吸神経細胞群については、それら細胞の機能と形態の解析を行う。C3-C5の横隔神経レベルの呼吸神経細胞群については、横隔神経を支配する運動神経細胞群および呼吸性介在神経細胞群とが呼吸パターン形成に果たす相互作用を解明する。そのうえで、脳幹部呼吸リズム形成機構と頸髄内の各呼吸神経回路網との機能的解剖学的結合様式を解明する。

### 3. 研究の方法

呼吸調節機構は発達に伴って大きく変容するため、これら検討は幼若ラット *in vitro* 脳幹脊髄標本および若齢成熟ラット *in situ* 経動脈灌流標本 とで行うこととした。これら標本に膜電位イメージング、細胞外電極法および

パッチクランプ法による細胞活動記録、さらに免疫組織学的方法による解剖学的解析を加えて検討を行った。

### 4. 研究成果

幼若ラット *in vitro* 脳幹脊髄標本で、高位頸髄呼吸神経細胞群を対象に膜電位イメージング、パッチクランプ計測、組織学的分析を組み合わせた解析を行い、C1-C2の高位頸髄腹側部には呼吸運動神経細胞とともに介在性呼吸神経細胞群が存在することを発見し、High Cervical Spinal Cord Respiratory Neuron Group (HCRG)と名づけ *Neuroreport* 誌等で報告した。また、横隔神経核レベルでの詳細な膜電位イメージング解析を行い、同部の呼吸神経活動の時空間的動態を解剖と合わせて解明した。さらに、より成熟した動物で解析を行うため、*in situ* 経動脈灌流標本での検討を行い、opioid アゴニストである DAMGO は、むしろ呼吸数を増加させることを見出した。研究最終年度の平成 23 年 3 月には、日本生理学会・日本解剖学会合同大会において、脊髄呼吸神経回路網についてのシンポジウムを企画し、研究成果を報告した。

### 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 19 件)

Ryoma Aoyama, Yasumasa Okada, Shigefumi Yokota, Yutaka Yasui, Kentaro Fukuda, Yoshio Shinozaki, Hideaki Yoshida, Masaya Nakamura, Kazuhiro Chiba, Yukihiko Yasui, Fusao Kato, Yoshiaki Toyama. Spatiotemporal and anatomical analyses of

P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. Pain 査読有 (印刷中), 2011.

Koganezawa T, Okada Y, Terui N, Paton JFR, Oku Y. A  $\mu$ -opioid receptor agonist DAMGO induces rapid breathing in the arterially-perfused in situ preparation of rat. Respiratory Physiology and Neurobiology 査読有 177: 207-211, 2011.

Amit Lal, Yoshitaka Oku, Swen Hülsmann, Yasumasa Okada, Fumikazu Miwakeichi, Shigeharu Kawai, Yoshiyasu Tamura, Makio Ishiguro. Dual oscillator model of the respiratory neuronal network generating quantal slowing of respiratory rhythm. Journal of Computational Neuroscience 査読有 30(2): 225-240, 2011.

Miwakeichi F, Oku Y, Okada Y, Kawai S, Tamura Y, Ishiguro M. Detection and visualization method of dynamic state transition for biological spatio-temporal imaging data. IEEE Transactions on Medical Imaging 査読有 30(3): 859-866, 2011.

岡田 泰昌. 呼吸中枢の障害にみられる呼吸不全. THE LUNG perspectives 査読無 19 (1): 50-54, 2011.

Makio Ishiguro, Shigeharu Kawai, Yasumasa Okada, Yoshitaka Oku, Fumikazu Miwakeichi, Yoshiyasu Tamura, Amit Lal. What does the multi-peaked respiratory output pattern tell us about the respiratory pattern generating neuronal network? Advances in Experimental Medicine and

Biology 査読有 669: 235-238, 2010.

Shigefumi Yokota, Yoshio Shinozaki, Yoshitaka Oku, Yasumasa Okada, Yukihiro Yasui. Vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive synapses onto phrenic motoneurons in the neonatal rat. Advances in Experimental Medicine and Biology 査読有 669: 189-192, 2010.

Yasumasa Okada, Shigefumi Yokota, Yoshio Shinozaki, Fumikazu Miwakeichi, Yoshitaka Oku, Yukihiro Yasui. Anatomical changes of phrenic motoneurons during development. Advances in Experimental Medicine and Biology 査読有 669: 33-36, 2010.

Okada Y, Yokota S, Shinozaki Y, Aoyama R, Yasui Y, Ishiguro M, Oku Y. Anatomical architecture and responses to acidosis of a novel respiratory neuron group in the high cervical spinal cord (HCRG) of the neonatal rat. Advances in Experimental Medicine and Biology 査読有 648: 387-394, 2009.

Kawai S, Oku Y, Okada Y, Miwakeichi F, Tamura Y, Ishiguro M. A novel statistical analysis of voltage-imaging data by structural time series modeling and its application to the respiratory neuronal network. Neuroscience Research 査読有 63(3):165-171, 2009.

Masumiya H, Oku Y, Okada Y. Inhomogeneous distribution of action potential characteristics in the rabbit sino-atrial node revealed by voltage imaging. Journal of Physiological Sciences 査読有 59: 227-241, 2009.

Okada Y, Kuwana S, Chen Z, Ishiguro M, Oku Y. The central respiratory chemoreceptor: Where is it located? *Advances in Experimental Medicine and Biology* 査読有 648: 377-385, 2009.

Ruangkittisakua A, Okada Y, Oku Y, Koshiya N, Ballanyi K. Fluorescence imaging of active respiratory networks. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 査読有 168(1-2): 26-38, 2009.

岡田 泰昌. 呼吸中枢. *慶應医学*, 査読無 85(2): 159-168, 2009.

Oku Y, Kimura N, Masumiya H, Okada Y. Spatiotemporal organization of frog respiratory neurons visualized on the ventral medullary surface. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 査読有 161: 281-290, 2008.

Aoki T, Yamasawa F, Kawashiro T, Shibata T, Ishizaka A, Urano T, Okada Y. Effects of long-term low-dose oxygen supplementation on the epithelial function, collagen metabolism and interstitial fibrogenesis in the guinea pig lung. *Respiratory Research* 査読有 9:37, 2008.

Yoshitaka Oyamada, Michie Murai, Naoko Harada, Akitoshi Ishizaka, Yasumasa Okada. Age-dependent involvement of ATP-sensitive potassium channel Kir6.2 in hypoxic ventilatory depression of mouse. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 査読有 162: 80-84, 2008.

Yoshitaka Oku, Akihito Okabe, Tetsu Hayakawa, Yasumasa Okada. Respiratory neuron group in the high cervical spinal cord discovered by optical imaging. *Neuroreport* 査読有 19(17):1739-1743, 2008.

Akira Umeda, Kazuteru Kawasaki, Tadashi Abe, Maki Watanabe, Akitoshi Ishizaka, Yasumasa Okada. Hyperventilation and finger exercise increase venous-arterial PCO<sub>2</sub> and pH differences. *The American Journal of Emergency Medicine* 査読有 26(9): 975-980, 2008.

[学会発表](計39件)

岡田 泰昌. 横隔神経核レベルの頸髄呼吸神経回路網の解剖、生理、病態生理. シンポジウム・脊髄呼吸神経回路網研究の最前線: 解剖学・生理学・再生医学の統合を目指して (Advances in the research on the respiratory neuronal network of the spinal cord: toward the integration of anatomy, physiology and regenerative medicine) 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 (平成23年3月28日~30日、紙上開催)

Miwakeichi F, Oku Y, Okada Y, Kawai S, Tamura Y, Ishiguro M. Spatio-temporal innovation approach for the analysis of optical voltage-imaging data. XXIV Annual Meeting Federation of Societies of Experimental Biology (FeSBE — Federação de Sociedades de Biologia Experimental). Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil. (August 19-22, 2009).

Yasumasa Okada, Shun-ichi Kuwana, Shigefumi Yokota, Zibin Chen, Yoshitaka Oku. Localization and mechanisms of central chemoreception. Symposium. "Chemical Control of Breathing: Molecular and Systemic Mechanisms and Effects" XXXVth International Union of Physiological Sciences (IUPS), Kyoto, Japan. (July 27-August 1, 2009).

Amit Lal, Yoshitaka Oku, Swen Hülsmann, Yasumasa Okada, Fumikazu Miwakeichi, Shigeharu Kawai, Yoshiyasu Tamura, Makio Ishiguro. Non-deterministic breakdown of the preBötzinger Complex neuronal synchronicity may lead to quantal slowing of respiratory rhythm. XXXVIth International Union of Physiological Sciences (IUPS), Kyoto, Japan. (July 27-August 1, 2009).

Yoshio Shinozaki, Miwakeichi Fumikazu, Shigefumi Yokota, Ryoma Aoyama, Yoshitaka Oku, Yasumasa Okada. Spatiotemporal activity of respiratory neurons in the cervical spinal cord at the level of the phrenic nucleus in neonatal rats. The 11th Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing. July 24 (Friday) - 26 (Sunday), 2009, Nara, Japan.

Yokota Shigefumi, Shinozaki Yoshio, Oku Yoshitaka, Okada Yasumasa, Yasui Yukihiro. Anatomical and functional correlates between phrenic and scalene motoneurons in the cervical spinal cord of neonatal rats. The 11th Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing. July 24-26, 2009, Nara, Japan.

Makio Ishiguro, Shigeharu Kawai, Yasumasa Okada, Yoshitaka Oku, Fumikazu Miwakeichi, Yoshiyasu Tamura, Amit Lal. What does the multi-peaked respiratory output pattern tell us about the respiratory pattern generating neuronal network? The 11th Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing. July 24-26, 2009, Nara, Japan.

Yoshitaka Oku, Fumikazu Miwakeichi, Shigeharu Kawai, Yasumasa Okada, Yoshiyasu Tamura, and Makio Ishiguro. Assumption free and structural methods that characterize dynamics of optically recorded respiratory neuronal activity without averaging. International Symposium on Respiratory Control at the Faculty Saint Jérôme (Marseilles) and the Hôtellerie du Couvent Royal de St Maximin in Provence, France (1-4 December 2008)

Koshiya, N., Oku, Y., Okada, Y. Chaotic dynamics within a breath: Recruitment of single inspirations imaged in the pre-Botzinger complex (pBC) of the rat breathing slice. The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, November 15-19, 2008. Washington DC, U.S.A.

Yoshitaka Oku, Fumikazu Miwakeichi, Shigeharu Kawai, Yasumasa Okada, Makio Ishiguro, Yoshiyasu Tamura. Autoregressive and parametric modeling approaches to optical imaging data characterize the dynamic process of the respiratory central pattern generator in the neonatal rat brainstem. 6th FENS Forum of European Neuroscience (July

12-16, 2008; Geneva, Switzerland)

Okada Y. Central chemoreceptors: where and how. XVIIth INTERNATIONAL SOCIETY FOR ARTERIAL CHEMORECEPTION (ISAC) Meeting (Valladolid, Spain) July 1- July 5 2008

Shinozaki Y, Okada Y., Aoyama R, Nakamura M, Yokota S, Yasui Y, Oku Y., Chiba K, Toyama Y. Voltage-imaging analysis of the respiratory neuronal responses to CO<sub>2</sub> at the level of the phrenic nucleus in the rat spinal cord. XVIIth INTERNATIONAL SOCIETY FOR ARTERIAL CHEMORECEPTION (ISAC) Meeting (Valladolid, Spain) July 1- July 5 2008.

Fumikazu Miwakeichi, Oku Yoshitaka, Yasumasa Okada, Shigeharu Kawai, Yoshiyasu Tamura, Makio Ishiguro. Innovation approach to detect the respiratory related neuronal activity in the brainstem based on optical imaging data. 14th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping, June 15-19, 2008 (Melbourne, Australia).

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

Kawai S, Oku Y., Okada Y., Miwakeichi F., Ishiguro M, Tamura Y. Parametric modeling analysis of optical imaging data on neuronal activities in the brain. In Computational Neuroscience (Springer Optimization and Its Applications) (edited by Wanpracha Chaovalitwongse, Panos Pardalos, Petros Xanthopoulos) Springer pp213-225, 2010.

岡田 泰昌、桑名 俊一、越久 仁敬. 低酸素換気応答 酸素ダイナミクス研究会編「からだと酸素の事典」朝倉書店 (東京) pp 211-215, 2009.

[ 産業財産権 ]  
出願状況 ( 計 0 件 )  
取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]  
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 泰昌 ( OKADA YASUMASA )  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号： 80160688

(2)研究分担者

越久 仁敬 ( OKU YOSHITAKA )  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 20252512

三分一 史和 ( MIWAKEICHI FUMIKAZU )  
統計数理研究所・モデリング研究系・  
准教授  
研究者番号： 30360647