

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03321

研究課題名（和文）セントラルコマンドの脳内回路の解明：視床下部から中脳へのオレキシン系経路

研究課題名（英文）Central command pathways: involvement of the orexinergic system

研究代表者

木場 智史 (Koba, Satoshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：40565743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000 円

研究成果の概要（和文）：セントラルコマンドは運動中に稼働して自律神経系を制御する脳内活性メカニズムである。運動に適した内部環境を整えるために心臓血管系や呼吸系の働きを変化させる働きをもつ。本研究では、遺伝子改変ラット、光遺伝学、組織解析、in vivo生理学実験などを組み合わせた実験生物学的研究戦略から、視床下部にあるオレキシン神経系が歩行運動に必要なセントラルコマンド機能を生成するのに不可欠であることを突き止めた。また、その機能生成には中脳歩行誘発野の働きを介することが示された。運動時のオレキシン神経系の働きを制御する脳機構の解明は今後の研究課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動するには筋肉に十分量の血液を送るために自律神経系が働き、各器官の血管の太さや心臓の動きが直ちに变化する。この調節には、筋肉を動かすために脳内で生じるシグナル（セントラルコマンド，CC）による役割が重要である。本研究では、視床下部オレキシン神経系がCCの脳内回路の一端であることを突き止めた。体内の状態を運動に適したものへと速やかに変えていくこの神経系の働きは、歩行の開始・継続に理にかなっている。本研究成果は運動パフォーマンスが心理状態によって変わる仕組みの解明や、各疾病患者の日常生活で見られる血行動態異常の病態解明やその治療法開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Central command is a central neural process that regulates the autonomic nervous system during voluntary exercise, contributing to cardiorespiratory adjustments and thereby enhancing physical performance. Through various classical and modern research techniques, including rat transgenesis, optogenetics, histochemical analyses of the brain, and in vivo physiological experiments, this research project has successfully demonstrated that the hypothalamic orexinergic nervous system contributes to the generation of central command functions required for locomotor exercise. Moreover, the role of orexinergic neurons is likely mediated through the activation of the mesencephalic locomotor region, an area critical for parallel activation of central somatic and autonomic pathways necessary for locomotor exercise. Upstream neural pathways or circuits that regulate orexinergic neuronal activation during exercise deserve further study.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：セントラルコマンド 体性神経系 自律神経系 オレキシン 視床下部 運動

1. 研究開始当初の背景

運動時には運動骨格筋に適切な量の血液を供給するために、脳の働きによって交感神経活性が起こり、心臓血管系の適応反応が生じる。「運動時にはどのような脳メカニズムによって交感神経活性が起こるのか？」は19世紀末には指摘された運動生理学の解明課題 (Johansson, *Scand Arch Physiol*, 1893) であるにも関わらず、一世紀以上経過した現在も未解明である。

「高位脳中枢より生じる運動発現の意思、すなわちセントラルコマンド(CC)は、脳神経細胞を興奮させ、運動系だけでなく交感神経系も制御する」とされる (Goodwin *et al.*, *J Physiol* 1972). しかし、CCの実体は不明である。例えば、「CCはどの脳領域から生じるのか」「CCはどのような脳内回路を経て交感神経系に至るのか」は説明されていない。

本研究代表者は2014年よりCCの脳内回路の解明を、交感神経系から上行方向に迫る戦略で、進めている。延髄吻側腹外側野 (RVLM) にあり交感神経節前線維に直接つながるC1および非C1神経は走行運動時に興奮することを明らかにし (Kumada, *Koba et al. Auton Neurosci*, 2017), そして最近、『中脳歩行誘発野 (MLR) からRVLMへとつながるグルタミン酸作動性の投射経路 (MLR-RVLM/Glu 経路)』は走行運動時に活性化し、四肢の運動制御と交感神経活性の両方を司る」ことを突き止めた (研究開始当初は未発表、その後論文発表 (Koba *et al.* *Nat Commun*, 2022)). すなわち、MLR-RVLM/Glu 経路はCCの脳内回路の一端である。しかし、走行運動時にはどのようなメカニズムがMLR-RVLM/Glu 経路を制御するかは解明されていなかった。

この課題に対し本研究代表者は、視床下部に分布するオレキシン (Orx) 産生神経に着目した。『視床下部背側領域 (DH) に起始してMLRへとつながるOrx神経経路 (DH-MLR/Orx 経路)』は走行運動時に活性化し、MLR-RVLM/Glu 経路を活性化して、四肢の運動制御と交感神経活性の両方を司る」との仮説を立てた。しかし、この仮説の真偽は不明であった。

2. 研究の目的

『DH-MLR/Orx 経路→MLR-RVLM/Glu 経路』は、CCの脳内回路の一部である」の検証。

3. 研究の方法

実験生物学的な研究手法 (*in vivo* 生理学実験, 組織学解析, 行動解析, 光遺伝学などの遺伝子工学技術) を活用した。その詳細は、「4. 研究成果」内に結果とともに記載した。

4. 研究成果

(1) 随意走行によるOrx神経の興奮能の調査

随意走行運動によってOrx神経が興奮するかについて調査するために、離乳後からSprague-Dawley (SD) ラットを回転ホイール付きケージで飼育し、ラットを自発的ホイール走行に馴化させた。脳組織に対する機能的免疫染色実験から、二時間自由にホイールにアクセスできるラット群 (378~3476回転, $n = 4$) のOrx神経では、ホイールにアクセスできないラット群 ($n = 4$) と比べて、神経活性マーカーであるFosの有意な発現上昇が認められた【Figure A】。この結果から、随意走行運動によってOrx神経系が活性化することが分かった。

(2) Orx神経による交感神経活性能の調査

Orx神経系が交感神経活性能を持つかについて調査するために、連携研究者 (山中章弘博士, 当時名古屋大, 現CIBR) からOrx神経特異的に組換え酵素Creを発現した遺伝子改変Orx-Creラットの恵恩を受け、所属機関において繁殖させ、本研究計画に用いた。アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) 液のDHへの注入によって、Cre/LoxP系を介してOrx-CreラットのOrx神経特異的に青光感受性陽イオンチャネルChR2/ChETAを発現させた。ウレタン麻酔ラットDHに青光を照射することでOrx神経を光遺伝学刺激したところ、速やかに (刺激開始から300ミリ秒以内に) 腎交感神経活動の有意な上昇が認められた ($n = 7$)【Figure B】。この結果から、Orx神経には交感神経活性能があることが分かった。

(3) Orx神経系による歩行誘発能・循環系亢進能の調査

Orx神経系の人為刺激が歩行と循環反応の両方を誘発するかについて調査するために、上記bと同様にOrx神経系にChR2/ChETAが発現した、覚醒・自由行動Orx-Creラットを円形運動場 (内径: 94 cm; 外径: 140 cm) に設置し、DHへの青光照射によるOrx神経の光遺伝学刺激 (1秒間) を与えた際の行動及び動脈圧・心拍数の変化を解析した ($n = 8$)。Orx神経刺激試行のうち45%では、二歩以上の歩行活動が刺激開始から10秒以内に観察された。歩行速度、動脈圧、心拍数は、Orx神経刺激によって有意に上昇した【Figure C】。これらの結果から、Orx神経系には歩行誘発能および昇圧・頻脈生成能があることが分かった。

(4) 走行中の運動制御および循環制御におけるOrx神経系の役割の調査

Orx神経系が実走行中の運動制御および循環制御に必要なことについて調査するために、AAV液のDHへの注入によって、Orexin-CreラットのOrx神経特異的に青光感受性陰イオンチャネル*iCh1oC*を発現させた。自発的ホイール走行中のラットDHに青光を照射することでOrx神経を光遺伝学抑制したところ ($n = 8$)、走行をやめる、走行速度が減弱するなど走行運動が抑制された。また同時に動脈圧も低下した【Figure D】。これらの結果から、Orx神経系は随意走行における

四肢の運動制御および適切な循環反応の生成に必要であることが分かった。

(5) Orx 神経系の投射先の調査

上記(2)~(4)で用いたラットの光感受性イオンチャネルのレポータータンパク質 (GFP あるいは RFP) に対する免疫染色から、Orx 神経軸索を組織学的に可視化した。運動時の循環調節に重要な役割を持つことが示唆されている脳幹領域 (中脳歩行誘発野 (MLR), 中脳中心灰白質, 延髄吻側腹外側野など) へと軸索が伸び、それらの領域でシナプス接続することを確認した。Orx 神経系による運動時の循環調節能は、これらの脳領域の機能を介して生じる可能性が考えられた。

(1)~(5)までの成果は原著論文としてまとめられ、2024年2月に Journal of Physiology 誌に発表された。

(6) 非 Orx 産生 DH 神経による歩行誘発能・循環系亢進能の調査

SD ラットの DH に、シナプシンをプロモータとした Chr2-eYFP を発現誘導する AAV 液を注入したところ、非 Orx 産生 DH 神経 (NOrx DH 神経) に選択的に eYFP が発現することをセレンディピティックに発見した。そこで NOrx DH 神経による歩行誘発能・循環系亢進能の調査に取り組んだ。ウレタン麻酔ラットの DH への青光照射によって NOrx DH 神経を光遺伝学刺激すると直ちに交感神経活性が生じた後に交感神経抑制が生じた。興味深いことに、覚醒ラットの NOrx DH 神経を光遺伝学刺激すると、全試行の 5 割弱で歩行が誘発されたが 3 割強ではバイティング行動が誘発された。動脈圧は、誘発行動のパターンに依存せずに、上昇した。これらの結果から、NOrx DH 神経は CC の機能生成に関わることを示唆されたが、その役割は Orx 神経と異なるものと考えられた。

(6)の成果は原著論文原稿としてまとめられ、学術誌に投稿後、2024年6月現在改訂中である。

(7) 随意走行による DH-MLR/Orx 経路の興奮能の調査

(5)において MLR への Orx 神経軸索投射を確認したことから、随意走行運動によって DH-MLR/Orx 神経が興奮するかについて調査した。SD ラットの MLR に逆行性 AAV 液を注入することで、MLR 投射神経に Cre を発現させた。(1)と同様にラットを自発的ホイール走行に馴化させた。90 分間自由にホイールにアクセスできるラット群 (900~3632 回転, n = 7) の DH-MLR/Orx 神経では、ホイールにアクセスできないラット群 (n = 7) と比べて、神経活性マーカーである Fos の有意な発現上昇が認められた。この結果から、随意走行運動によって DH-MLR/Orx 神経は興奮することが分かった。

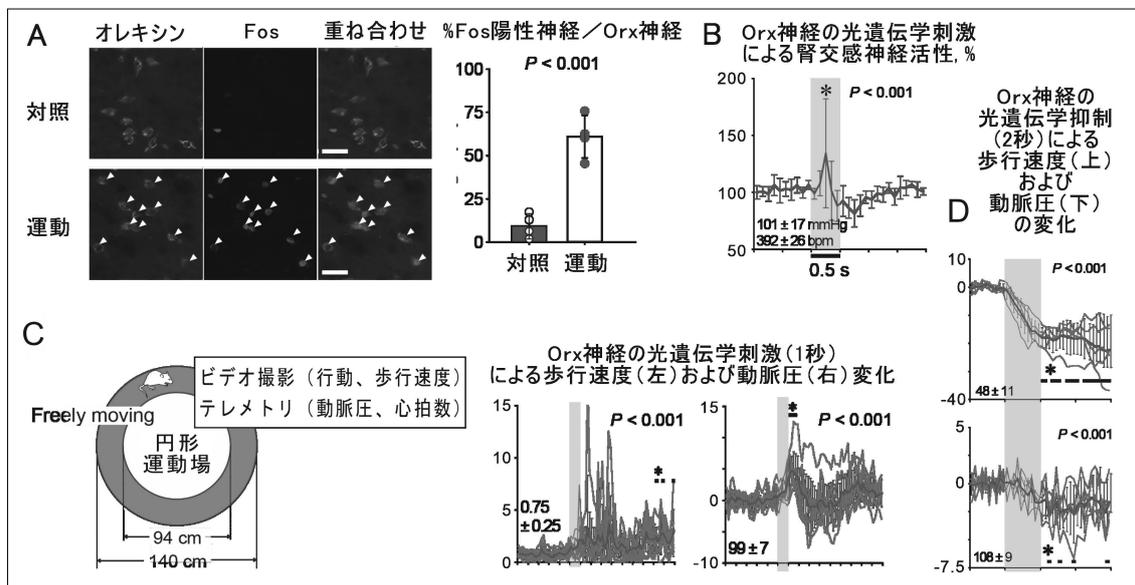
(7)の成果は原著論文原稿としてまとめられ、2024年1月に Yonago Acta Medica 誌に発表された。

(8) 走行中の運動制御および循環制御における DH-MLR/Orx 経路の役割の調査

DH-MLR/Orx 経路が実走行中の運動制御および循環制御に必要なことについて調査するために、(4)と同様の手法で Orx 神経に iChloC が発現したラットの MLR に青光を照射することで DH-MLR/Orx 経路を光遺伝学抑制する手法を用いた。自発的ホイール走行中のラット DH に青光を照射することで Orx 神経を光遺伝学抑制したところ (n = 8), 走行をやめる、走行速度が減弱するなど走行運動が抑制された。また動脈圧も低下したが、興味深いことに動脈圧低下は走行速度の減少よりも遅れて生じる傾向にあった。これらの結果から、DH-MLR/Orx 経路は随意走行における四肢の運動制御および適切な循環反応の生成に必要なだが、運動制御に対する役割が主であることが示唆された。

(8)の成果は2024年6月現在未発表であり、原著論文原稿としてまとめる予定である。

以上の(1)~(8)の成果から、『DH に起始して MLR へとつながる Orx 神経経路 (DH-MLR/Orx 経路)』は走行運動時に活性化し、MLR-RVLM/Glu 経路を活性化して、四肢の運動制御と交感神経活性の両方を司る」と結論するに至った。本研究から明らかとなった CC の皮質下回路を制御する上位脳回路は不明であり、その解明は今後の研究課題である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koba Satoshi, Kumada Nao, Narai Emi, Kataoka Naoya, Nakamura Kazuhiro, Watanabe Tatsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 A brainstem monosynaptic excitatory pathway that drives locomotor activities and sympathetic cardiovascular responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-32823-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura Yuki, Nakamura Kazuomi, Seno Misako, Mochizuki Misa, Kawai Kenji, Koba Satoshi, Watanabe Tatsuo	4. 巻 72
2. 論文標題 Generation of c-Fos knockout rats, and observation of their phenotype	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 95～102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/exanim.22-0077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 木場 智史, 奈良井 絵美	4. 巻 59
2. 論文標題 運動とストレス：急性自律生理反応の生成メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 354～357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32272/ans.59.4_354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Narai Emi, Watanabe Tatsuo, Koba Satoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Hypothalamic Orexinergic Neurons Projecting to the Mesencephalic Locomotor Region Are Activated by Voluntary Wheel Running Exercise in Rats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Yonago Acta Medica	6. 最初と最後の頁 52～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2024.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Narai Emi, Yoshimura Yuki, Honaga Takaho, Mizoguchi Hiroyuki, Yamanaka Akihiro, Hiyama Takeshi Y., Watanabe Tatsuo, Koba Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Orexinergic neurons contribute to autonomic cardiovascular regulation for locomotor exercise	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP285791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Emi Narai, Yuki Yoshimura, Akihiro Yamanaka, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe, Satoshi Koba
2. 発表標題 Locomotion and sympathetic cardiovascular responses by orexinergic neurons in rats
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Koba, Yuki Yoshimura, Kazuomi Nakamura, Karen Shibayama, Emi Narai, Takeshi Hiyama, Tatsuo Watanabe
2. 発表標題 Sympathoinhibitory and sympathoexcitatory roles of running exercise-excited lateral hypothalamic neurons assessed by rat FosTRAP
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奈良井絵美, 熊田奈桜, 吉村祐貴, 檜山武史, 渡邊達生, 木場智史
2. 発表標題 セントラルコマンドを伝達する視床下部 - 中脳 - 延髄経路
3. 学会等名 第17回環境生理学プレコンgres
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奈良井絵美, 木場智史
2. 発表標題 セントラルコマンドの脳回路メカニズム：オレキシン神経系の役割
3. 学会等名 第49回自律神経生理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 心疾患と運動時交感神経制御の中樞メカニズム
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 運動時交感神経活性の中樞回路メカニズム
3. 学会等名 第75回日本自律神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 心不全や運動時の交感神経活性を司る中枢回路
3. 学会等名 第19回九州脳・高血圧・循環制御研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 心不全の交感神経制御の脳内回路と運動
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 運動とストレス
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈良井絵美、渡邊達生、木場智史
2. 発表標題 Fos expression in lateral hypothalamic neurons projecting to the mesencephalic locomotor region of rats following voluntary wheel running
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 学会賞受賞講演
3. 学会等名 第76回日本自律神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap
https://researchmap.jp/satoshi_koba
運動に適した体の状態をすばやく整える、神経伝達路の発見
<https://www.med.tottori-u.ac.jp/files/50172.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	奈良井 絵美 (Narai Emi)	鳥取大学・農学部・特別研究員 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------