

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500380

研究課題名(和文)オレキシンによる脳幹呼吸調節機構の修飾作用—幼若動物と成熟動物との比較検討—

研究課題名(英文)Orexinergic modulation of respiration in the brainstem; a comparison between adult and infant animal.

研究代表者

横田 茂文(Yokota, Shigefumi)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50294369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：覚醒・睡眠状態によって変化する呼吸の調節機構を理解するために、オレキシンが呼吸および気道の開通性を調節する神経路にいかん作用しているかを形態学的に解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。(1)成獣ラットでは、オレキシンは、腹側呼吸ニューロン群吻側部(rVRG)、横隔神経核および舌下神経核へ投射する結合腕傍核ニューロンにオレキシンレセプター2を介して作用し、呼吸の促進およびそれに伴う気道の確保を引き起こす。(2)新生児ラットにおいて、オレキシン含有線維とrVRG投射ニューロンの分布が結合腕傍核で一致し、オレキシンBの結合腕傍核への注入によって呼吸頻度の増大が引き起こされる。

研究成果の概要(英文)：To understand the neural pathways underlying the respiratory variation dependent on sleep/wake states, we examined the orexinergic projection to the parabrachial nucleus. The results of the present study are as follows: (1) in adult, orexin may exert modulatory influence through orexin receptor 2 upon Kolliker-Fuse neurons which send their axons to the rostral ventral respiratory group and phrenic nucleus for eliciting the respiratory facilitation and to the hypoglossal nucleus for eliciting the maintaining the airway patency during wakeful state; (2) in infant, overlapping distribution of orexin-immunoreactive fibers and rostral ventral respiratory group projecting neurons is found in the Kolliker-Fuse nucleus, and orexin B injection into the lateral parabrachial nucleus of the brainstem-spinal cord preparation results in facilitation of respiration.

研究分野：神経解剖学

キーワード：オレキシン 結合腕傍核 腹側呼吸ニューロン群吻側部 横隔神経核 舌下神経核 オレキシンレセプター2

1. 研究開始当初の背景

呼吸は、睡眠・覚醒の状態によってその活動に差があることはよく知られている。しかし、睡眠・覚醒状態という観点から呼吸調節の神経機構を追及している形態学的研究はほとんどないのが現状である。一方、睡眠・覚醒パターンの維持と制御に関わっているオレキシンが、呼吸調節にも関わっていることが明らかとなってきた。また、結合腕傍核の一部である Kölliker-Fuse 核 (KF) へのオレキシン注入は、横隔神経の活動頻度の増大および舌下神経の吸息前発火の出現を引き起こすことが報告され、オレキシンによる呼吸および気道抵抗調節は、KF を介しても行われることが示唆されている。KF を含む結合腕傍核は、橋呼吸調節中枢とも呼ばれ、孤束核から送られた内臓感覚を統合し、その情報を延髄呼吸中枢である腹側呼吸ニューロン群吻側部 (rVRG) や横隔神経核へ出力することにより呼吸運動を調節する領域と考えられている。また、KF は気道の開通性に関する舌筋を支配する舌下神経核へ出力することにより、気道確保に関する役割も注目されている。

呼吸リズム形成は幼若型と成熟型では異なることが指摘されており、睡眠・覚醒のパターンも生後の発達に伴って大きく変容する。この移行期において、乳幼児突然死症候群の頻度が増加することから、呼吸リズム形成の成熟型への移行不全が乳幼児突然死症候群の原因であると示唆されている。しかし、成熟動物と幼若動物の覚醒・睡眠調節の神経回路の違いについて、いまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、以下のことを明らかにすることを目的とした。(1) 成熟動物において、rVRG、横隔神経核あるいは舌下神経核へ投射する KF ニューロンとオレキシン作動性神経終末との連絡様式を形態学的に解析する。(2) 幼若動物の結合腕傍核において、オレキシン含有線維と延髄呼吸中枢へ投射するニューロンとの関係を形態学的に解析するとともに、幼若動物の結合腕傍

核へのオレキシンの微量注入による呼吸活動の変化を生理学的に解析する。

3. 研究の方法

(1) 成獣ラットにおけるオレキシン含有神経終末と rVRG や横隔神経核あるいは舌下神経核へ投射する KF ニューロンの分布様態、並びに接合様態を光顕的および電顕的に解析した。また、rVRG や横隔神経核あるいは舌下神経核へ投射する KF ニューロンがオレキシンレセプター 2 を発現するか否かを解析した。

KF 核へ投射する視床下部オレキシンニューロンの分布様態の解析

1) 成獣ラットの KF へコレラトキシン b サブユニット (CTb) を電気泳動的に微量注入し、その 1 週間後に灌流固定した。その後、フリージングミクロームにて前頭断脳切片を作成し、CTb 標識ニューロンとオレキシン陽性ニューロンを蛍光免疫組織化学により検出した。

2) 共焦点レーザー顕微鏡下で CTb 標識ニューロンとオレキシン陽性ニューロンおよび二重標識ニューロンの分布を視床下部にて検索した。取得した画像において、視床下部の脳弓が下端となるように $400\mu\text{m} \times 1000\mu\text{m}$ の計数枠を設置し、さらに、その内側と外側に接する $800\mu\text{m} \times 1000\mu\text{m}$ の計数枠を設置して、それぞれ脳弓周囲領域、内側領域および外側領域として、それらに領域における標識ニューロンを計数した。

オレキシン含有神経線維と rVRG、横隔神経核あるいは舌下神経核へ投射する KF ニューロンとの接合様態の解析

1) ラットの rVRG や横隔神経核あるいは舌下神経核へ逆行性標識物質であるフルオロゴールド (FG) を電気泳動的に微量注入した。1 週間後に還流固定を行い、ピプラームにて前頭断脳切片を作成し、オレキシン含有神経終末と FG 標識ニューロンを免疫組織化学的に検出した。なお、この場合、クロモゲンとしてオレキシン標識神経終末の検出には Vector SG を用い、FG 標識ニューロンの検出にはジアミノベンチジン (DAB) を用いた。

2) 顕微鏡下で、オレキシン含有神経終末とFG標識された rVRG、横隔神経核あるいは舌下神経核へ投射するニューロンとの分布様態や接合様態を、結合腕傍核にて詳細に解析した。

3) 顕微鏡観察の場合には、1) で作成した切片の1シリーズを用い、まず、オレキシン含有神経終末を免疫組織化学で検出した。この場合、クロモゲンとして DAB を用いて検出し、さらに銀増感処理を施した。次にFG標識ニューロンを抗FG抗体を用いて検出した。この場合クロモゲンとして DAB 用いて検出し、銀粒子の沈着したオレキシン標識終末と顕微鏡下で区別できるようにした。顕微鏡下で分布の一致が認められた KF を含む領域を切り出し、エポキシに包埋して顕微鏡試料とした。

4) 顕微鏡下にて、オレキシン含有神経終末とFG標識ニューロンとのシナプス構築を観察し、その画像を解析した。

(2) 幼若ラットの結合腕傍核における解析を行うために、まず、新生児期の結合腕傍核の細胞構築をニッスル染色、特異的マーカーおよび神経路標識法を用いて観察し、次にオレキシン含有神経終末とrVRGへ投射する結合腕傍核ニューロンの分布様態を形態学的に解析した。さらに、脳幹 - 脊髄摘出標本を用いて結合腕傍核へのオレキシン B の微量注入における呼吸活動の変化を生理学的に解析した。

幼若ラットにおける結合腕傍核の細胞構築

1) 0-1 日齢および 5-6 日齢ラットの rVRG あるいは延髄孤束核(NTS)を含む領域に CTb を微量圧注入し、1 日後に還流固定した。その後、フリージングマイクロトーム用いて前頭断脳切片を作成し、CTb 標識ニューロンを免疫組織化学的に検出した。

2) 一部の切片は、成獣ラットで結合腕傍核の亜核に特異的に発現する FoxP2 を抗 FoxP2 抗体を用いて検出した。

3) CTb 標識ニューロン、FoxP2 陽性ニューロ

ンおよびニッスル染色されたニューロンの分布を比較し、新生児期における結合腕傍核の細胞構築を観察した。

幼若ラットの結合腕傍核における rVRG 投射ニューロンとオレキシン含有神経線維の分布様態の解析

1) 0-1 日齢および 5-6 日齢ラットの rVRG を含む領域に CTb を微量圧注入し、1 日後に還流固定した。その後、フリージングマイクロトーム用いて前頭断脳切片を作成し、オレキシン含有神経線維と CTb 標識ニューロンを免疫組織化学的に検出した。この場合、オレキシン神経終末の検出には、TSA Kit を用いた増感処理により Cy3 で蛍光標識し、CTb 標識ニューロンは Alexa488 で蛍光標識した。

2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて結合腕傍核の画像を取得し、オレキシン含有神経線維および CTb 標識ニューロンの分布様態および接合様態を解析した。

幼若ラットの結合腕傍核へのオレキシン B の微量注入における呼吸活動の変化の解析

1) 0-2 日齢のラットから脳幹 - 脊髄を取り出す。この場合、結合腕傍核を含む橋を露出した。

2) 舌下神経および第 4 頸神経から吸引電極により呼吸性の活動を記録した。

3) 結合腕傍核を含む領域へオレキシン B を微量注入(10 μ M, 0.1 - 0.2 μ L)し、呼吸性活動の変化を記録した。この場合、注入するオレキシン B 溶液に Alexa488 蛍光ビーズ(0.5%)を混入させておいた。

4) 標本をホルマリンで浸漬固定した。

5) 割断面における蛍光ビーズを蛍光顕微鏡で解析し、注入部位を確認した。また、標本を抗 FoxP2 抗体および抗 NeuN 抗体を用いた蛍光免疫組織化学により蛍光標識し、フリージングマイクロトームにて前頭断脳切片を作成した。FoxP2 陽性細胞および NeuN 陽性細胞の分布と蛍光ビーズを観察し、注入部位を特定した。

4. 研究成果

(1) 成獣ラットの rVRG、横隔神経核および舌下神経核へ投射する結合腕傍核ニューロンへのオレキシン含有ニューロンの投射について、以下のような結果を得た。

1) 脳弓周囲領域、内側領域および外側領域に存在する CTb で標識された KF 投射ニューロンのうち、それぞれ 21.8%、23% および 7.3% のニューロンがオレキシンに免疫陽性を示した。

2) オレキシンに免疫陽性を示す神経線維と、FG 標識された rVRG、横隔神経核および舌下神経核へ投射するニューロンの分布域が KF で強く重なった。

3) KF において、オレキシン含有神経終末は FG 標識された rVRG 投射ニューロンの細胞体および樹状突起と、また、横隔神経核および舌下神経核投射ニューロンの樹状突起と非対称性のシナプスを形成していた。

4) オレキシンレセプター2 の免疫組織化学と FG を用いた逆行性標識法を併用することにより、rVRG、横隔神経核および舌下神経核へ投射する KF ニューロンがオレキシンレセプター2 を発現することを確認した。

以上により、KF はオレキシン作動性の入力を受けていること、また、オレキシン含有神経終末がシナプスを介して rVRG、横隔神経核および舌下神経核へ投射する KF ニューロンへ接合していること、さらに rVRG、横隔神経核および舌下神経核へ投射する KF ニューロンはオレキシンレセプター2 を発現していることが明らかとなり、KF を介して睡眠・覚醒状態による呼吸調節がなされている可能性が示唆された。

(2) 幼若ラットの結合腕傍核におけるオレキシン含有線維と rVRG へ投射するニューロンの分布様態、および、幼若ラットの結合腕傍核へのオレキシンの微量注入による呼吸活動の変化を解析し、以下の結果を得た。

1) 幼若ラットの橋で認められる FoxP2 陽性細胞の分布は、ほぼ成獣と同じであった。

2) 逆行性標識された rVRG あるいは孤束核へ

投射するニューロン、および、順行性標識された孤束核からの神経線維が結合腕傍核領域に認められた。1)と2)の結果を比較検討することにより、幼若動物の結合腕傍核の同定を行った。

3) CTb を用いた逆行性標識法とオレキシンの免疫組織化学の併用により、0-1 日齢および 5-6 日齢ラットの KF において、オレキシン含有神経線維と rVRG 投射ニューロンの分布の一致が認められた。

4) オレキシン B (10 μ M, 0.1 - 0.2 μ L) の外側結合腕傍核への注入は、横隔神経および舌下神経から記録される呼吸性活動の頻度を増大させた。

以上の結果より、0-1 日齢および 5-6 日齢ラットにおいてもオレキシン含有線維が結合腕傍核に投射し、覚醒に伴う呼吸の促進に関わっていることが示唆された。

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 8 件)

(1) Yokota S, Kaur S, VanderHorst VG, Saper CB, Chamberlin NL. Respiratory-related Outputs of Glutamatergic, Hypercapnia-Responsive Parabrachial Neurons in Mice. *J. Comp. Neurol.*, 523:907-920. 2015, doi: 10.1002/cne. 23720. 査読有

(2) Koshiya N, Oku Y, Yokota S, Oyamada Y, Yasui Y, Okada Y. Anatomical and functional pathways of rhythmogenic inspiratory premotor information flow originating in the pre-Bötzinger complex in the rat medulla. *Neuroscience*. 268: 194-211: 2014. doi: 10.1016/j.neuroscience. 2014.03.002.

査読有

(3) Tsumori T, Oka T, Yokota S, Niu JG, Yasui Y. Intrapancreatic ganglia neurons receive projection fibers from melanocortin-4 receptor-expressing neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve of the mouse. *Brain*

Res. 1537: 132-42: 2013. doi: 10.1016/j.brainres.2013.09.002.2013 査読有

(4) Kaur S, Pedersen NP, Yokota S, Hur EE, Fuller PM, Lazarus M, Chamberlin NL, Saper CB. Glutamatergic signaling from the parabrachial nucleus plays a critical role in hypercapnic arousal. *J Neurosci.* 33(18): 7627-40: 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0173-13.2013. 査読有

(5) Fujiki Y, Yokota S, Okada Y, Oku Y, Tamura Y, Ishiguro M, Miwakeichi F. Standardization of size, shape and internal structure of spinal cord images: comparison of three transformation methods. *PLoS One.* 8(11): e76415: 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0076415. eCollection 2013. 査読有

(6) Vetrivelan R, Fuller PM, Yokota S, Lu J, Saper CB. Metabolic effects of chronic sleep restriction in rats. *Sleep.* 35: 1511-20: 2012. doi: 10.5665/sleep.2200. 査読有

(7) Oka T, Yokota S, Tsumori T, Niu JG, Yasui Y. Glutamatergic neurons in the lateral periaqueductal gray innervate neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventrolateral medulla of the rat. *Neurosci Res.* 74: 106-115, 2012. doi: 10.1016/j.neures.2012.08.001. Epub 2012 Aug 17. 査読有

(8) Niu JG, Yokota S, Tsumori T, Oka T, Yasui Y. Projections from the anterior basomedial and anterior cortical amygdaloid nuclei to melanin-concentrating hormone-containing neurons in the lateral hypothalamus of the rat. *Brain Res.* 1479: 31-43: 2012. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.011. Epub 2012 Aug 10. 査読有

[学会発表](計16件)

(1) Okada Y, Oku Y, Yokota S, Oyamada Y, Yasui Y, Koshiya N. Connectomics of the inspiratory center: Anatomical tract and propagation dynamics from the preBöttinger

complex. The 44th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington DC (USA), 2014/11/15-19.

(2) Yokota S, Kaur S, Vanderhorst VG, Saper C, Chamberlin NL. Mouse parabrachial neurons projecting to the rostral ventral respiratory group, phrenic and hypoglossal motor nuclei are activated by hypercapnia. The 26th Annual Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, LCC, Boston (USA), 2012/6/9-13.

(3) Yokota S, Kaur S, Saper C, Chamberlin NL, Arrigoni E. Extrernal lateral parabrachial neurons are activated by a glutamatergic input from the nucleus of solitary tract – a potential chemosensory pathway for hypercapnia induced arousal. The 26th Annual Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, LCC, Boston (USA), 2012/6/9-13.

(4) Kaur S, Yokota S, Pedersen NP, Hur EE, Chamberlin NL, Saper C. Glutamatergic signaling from the parabrachial nucleus is required for hypercarbic arousal. The 26th Annual Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, LCC, Boston (USA), 2012/6/9-13.

(5) 横田茂文, Kaur S, Vanderhorst VG, Saper CB, 岡達郎, 安井幸彦, Chamberlin NL. 高炭酸ガス負荷によって活性化する結合腕傍核から横隔神経核への連絡路. シンポジウム「橋結合腕傍核における記憶想起メカニズム」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 神戸国際会議場(神戸). 2015年3/21-23

(6) 岡田泰昌, 横田茂文. 呼吸リズム形成の中核・延髄 pre-Böttinger complex の解剖. シンポジウム「延髄脊髄呼吸調節機構: 形態と機能の統合的理解」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 神戸国際会議場・展示場(神戸). 2015年3/21-23

(7) 横田茂文, Kaur S, Vanderhorst VG, Saper CB, 安井幸彦, Chamberlin NL. Cre-loxP システ

ムを用いた高炭酸ガス負荷による呼吸促進の形態学的解析. 日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 広島大学(広島), 2014 年 10/25-26

(8) 荒田晶子, 志賀真理, 横田茂文, 山中章弘. 低酸素/高二酸化炭素下における橋腕傍核の呼吸性ニューロンに対するオレキシンの修飾作用. シンポジウム「感覚と自律機能の調節機構: 橋結合腕傍核の機能と役割」第 37 回神経科学大会, パシフィコ横浜(横浜), 2014 年 9/11-13

(9) 岡 達郎, 横田茂文, 浅野裕彦, 安井幸彦. ラット中心灰白質外側部ニューロンによる脚橋被蓋核コリン作動性ニューロンの支配. 第 37 回神経科学大会, パシフィコ横浜(横浜), 2014 年 9/11-13

(10) 横田茂文, 岡 達郎, 浅野裕彦, 安井幸彦. オレキシン線維は延髄腹外側部、横隔神経核および舌下神経核へ投射する Kölliker-Fuse 核ニューロンと接合する. 第 37 回神経科学大会, パシフィコ横浜(横浜), 2014 年 9/11-13

(11) 岡田泰昌, 越久仁敬, 横田茂文, 小山田吉孝, 安井幸彦, 越谷直弘. ラット延髄断面における吸息性呼吸神経活動伝播の機能解剖. 第 37 回神経科学大会, パシフィコ横浜(横浜), 2014 年 9/11-13

(12) 横田茂文, 岡 達郎, 浅野裕彦, 安井幸彦. Orexinergic inputs to Kölliker-Fuse neurons projecting to the ventrolateral medulla and phrenic and hypoglossal nuclei in the rat. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 自治医科大学(栃木), 2014 年 3/27-29

(13) 横田茂文, Kaur S, Vanderhorst VG, Saper CB, 安井幸彦, Chamberlin NL. 結合腕傍核へ投射する孤束核ニューロンは高炭酸ガス負荷によって活性化される. 第 36 回日本神経科学会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会, 京都国際会議場(京都), 2013 年 6/20-23.

(14) 横田茂文, Kaur S, Vanderhorst VG, Saper

CB, 安井幸彦, Chamberlin NL. 高炭酸ガス負荷によって活性化されるマウス孤束核ニューロンの結合腕傍核への投射. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, かがわ国際会議場(高松), 2013 年 3/28-30

(15) 横田茂文, Kaur S, Vanderhorst VG, Saper CB, 安井幸彦, Chamberlin NL. 高炭酸ガス負荷によって活性化されるマウス結合腕傍核ニューロンの呼吸関連領域への投射. 日本解剖学会第 67 回中国・四国支部学術集会, 山口大学(宇部), 2012 年 10/20-21

(16) 横田茂文, Kaur S, Vanderhorst VG, Saper CB, Chamberlin NL. 腹側呼吸性ニューロン群、横隔神経核及び舌下神経核へ投射するマウス結合腕傍核ニューロンは高炭酸ガス負荷によって活性化される. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場(名古屋), 2012 年 9/18-21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 茂文(YOKOTA, Shigefumi)

島根大学・医学部・助教

研究者番号:50294369

(2) 連携研究者

安井 幸彦(YASUI, Yukihiko)

島根大学・医学部・教授

研究者番号:30174501

岡田 泰昌(OKADA, Yasumasa)

独立行政法人国立病院機構村山医療センター

(臨床研究センター)・電気生理学研究室・室長

研究者番号:80160688

津森 登志子(TSUMORI, Toshiko)

県立広島大学・保健福祉学部・教授

研究者番号:30217377

岡 達郎(OKA, Tasuro)

島根大学・医学部・助教

研究者番号:20508923