

氏 名	山 口 桂 司
(ふりがな)	(やまぐち けいじ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成27年1月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Intermittent but not sustained hypoxia activates orexin-containing neurons in mice (間欠的低酸素刺激はマウスのオレキシン神経を活性化する)
論文審査委員	(主) 教授 小 野 富 三 人 教授 木 村 文 治 教授 梶 本 宜 永

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《 背 景 》

オレキシンは覚醒維持のための視床下部神経ペプチドとして知られており、増加すると睡眠時間が減少し、不足により過眠症としてナルコレプシーを引き起こす。オレキシンを細胞質内に含有するオレキシン神経の活性は、睡眠時に最小となり、刺激で覚醒すると増強してくる。オレキシン神経は、視床下部外側野 lateral hypothalamic area (LHA)や脳弓周囲野 perifornical region (PeF)、視床下部背内側野 dorsomedial hypothalamus (DMH) に局在し、その軸索は脳全体に投射している。そのため、睡眠/覚醒だけでなく、摂食行動や呼吸調節など多くの機能に関与している。オレキシン神経の呼吸調節に関しては、高二酸化炭素刺激でオレキシン神経が活性化される報告や高二酸化炭素刺激による呼吸増強がオレキシン欠損マウスでは減弱する報告がある。一方、低酸素刺激による呼吸増強へのオレキシン神経の関与に関する報告はほとんどない。間欠的低酸素刺激 intermittent

hypoxia(IH)は睡眠時無呼吸のモデルで、低酸素刺激を中止してもその後約1時間にわたって呼吸が増強される状態 respiratory long-term facilitation (LTF)が認められるが、以前、我々は LTF にオレキシン神経が必要であることを報告した。この LTF は持続的低酸素刺激 sustained hypoxia (SH)では起こらず、オレキシンがないと減弱される報告はある。しかし、IH や SH によってオレキシン神経自体が活性化されるかどうかは分かっていない。本研究では、1) IH や SH によってオレキシン神経が活性化されるかを免疫染色によって明らかにする 2)間欠的高酸素刺激 intermittent hyperoxia (IO)による酸素濃度の変化とオレキシン神経の活性化についても調べた。

《対 象》

12～20 週齢、雄の C57BL/6 マウス 20 匹を用いた。

《方 法》

マウスを 750mL の容器に入れ、2L/min の空気を流し、非麻酔下で馴化させた。その後、(10%酸素を 5 分間+空気 5 分間) × 5 回の IH 群、(50%酸素を 5 分間+空気 5 分間) × 5 回の IO 群、10%酸素を 25 分間持続した SH 群、空気を 5 分間 × 9 回の sham 群に分け、各群 5 匹とした。刺激終了から 1 時間後に 1.8g/kg のウレタン麻酔下に 4%パラホルムアルデヒド・PBS による灌流固定を行った。脳切片にオレキシンと c-Fos の二重免疫染色を行い、蛍光顕微鏡 100 倍率で観察した。脳弓外側を境として、LHA と PeF/DMH の 2 つの領域に分けて、オレキシンのみの単一染色にてオレキシン陽性細胞数を、オレキシンと c-Fos の二重染色の数により活性化されたオレキシン細胞数を評価した。細胞数の計測は学位申請者とは別の共著者がブラインドで行い、photoshop ソフトによるバックグラウンドのレベル補正は全てのスライドにおいて同一基準で行った。

《結 果》

オレキシン陽性細胞数は、sham 群: 487 ± 76 , IO 群: 657 ± 24 , SH 群: 560 ± 35 , IH 群: 532

±38 であり、各群間に有意差を認めなかった($p=0.09$)。また、4 群をまとめてその分布を比較したところ、LHA: 293 ± 16 、PeF/DMH: 266 ± 13 であり、LHA に多く存在した($p=0.04$, $n=20$)。しかしながら、群別に比較すると n 数の減少もあつてか差のない群も存在した。オレキシンと c-Fos の二重染色された活性化オレキシン細胞数は、LHA と PeF/DMH で分布の差は無かった。しかし、LHA では sham 群(15 ± 5)に対して IH 群(74 ± 17 , $p=0.010$)、SH 群(23 ± 5 , $p > 0.99$)、IO 群(20 ± 3 , $p > 0.99$)であり、PeF/DMH では sham 群(16 ± 5)に対して IH 群(67 ± 10 , $p=0.007$)、SH 群(27 ± 4 , $p=0.69$)、IO 群 (16 ± 2 , $p > 0.99$)であり、両領域とも IH 群のみ有意に活性化オレキシン細胞数が増加していた。

《 考 察 》

本研究は、IH によってオレキシン神経が活性化され、SH や IO では活性化されないことを初めて報告した。本研究の結果は、以前報告した IH による LTF にオレキシン神経が必要であるという結果と一致した。また、脳波上の覚醒時も睡眠時も IH による LTF が同様に起こる報告があり、オレキシン神経の活性化には覚醒状態というよりも IH というパターンが重要であると考えられた。その理由として、繰り返し刺激によってニューロンの可塑性または記憶現象が引き起こされるために強い活性化が起こるのではないかと考えられる。以前、我々は免疫染色で高二酸化炭素刺激によって活性化されるオレキシン神経は PeF/DMH に存在し LHA 存在しないことを示した。本研究では PeF/DMH と LHA の両方のオレキシン神経を活性化していたことから、高二酸化炭素と低酸素ではオレキシン神経の活性化メカニズムは異なる可能性があるが、その機序や感度は明らかではない。

《 結 論 》

IH はオレキシン神経を活性化する。オレキシンは、低酸素刺激の繰り返しに対して呼吸活性を促すことに寄与し、無呼吸によって引き起こされる低酸素血症の防御として働いている可能性がある。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

オレキシンは視床下部神経ペプチドであり、これを含有するオレキシン神経は、視床下部外側野 lateral hypothalamic area (LHA)や脳弓周囲野 perifornical region (PeF)、視床下部背内側野 dorsomedial hypothalamus (DMH)に局在し、その軸索は脳全体に投射しており、睡眠/覚醒や摂食行動、呼吸調節など多くの機能に関与していることが知られている。オレキシン神経の活性化は呼吸増強をもたらす、高二酸化炭素刺激で活性化される報告はあるが、低酸素刺激によって活性化されるか否かは明らかになっていない。

申請者は、マウスの間欠的低酸素群、間欠的高酸素群、持続的低酸素群、sham 群に対して、脳切片のオレキシンと c-Fos の二重免疫染色を行い、オレキシン神経の活性化を検討し、以下の結果を得ている。

1) オレキシン陽性細胞数は各群間に有意差を認めなかった。2) 二重染色された細胞数は間欠的低酸素刺激群のみ有意に増加しており、LHA と PeF/DMH で分布の差は無かった。この結果は PeF/DMH のみ活性化される高二酸化炭素刺激による分布の報告と異なっていた。

低酸素刺激の繰り返しによりオレキシンが呼吸活性や覚醒を促し、無呼吸によって引き起こされる低酸素血症の防御として働いており、そのメカニズムは高二酸化炭素刺激とは異なる可能性を示唆している。間欠的低酸素は潜在患者約 200 万人と言われる睡眠時無呼吸を模したものであり、本研究はその病態解明に貢献するものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Respiratory Physiology & Neurobiology 206: 11-14, 2015