

氏名(本籍地)	福士 勇 人 (神奈川県)		
学位の種類	博士(理工学)		
報告・学位記番号	甲第408号(甲理工第1号)		
学位記授与の日付	平成29年3月25日		
学位記授与の要件	本学学位規程第3条第1項該当		
学位論文題目	低酸素換気応答におけるアストロサイトの役割		
論文審査委員	主査 教授	博士(医学)	堀内 城 司
	副査 教授	博士(医学)	寺田 信 幸
	副査 教授	薬学博士	加藤 和 則
	副査 教授	博士(工学)	田中 尚 樹

【論文審査】

論文の構成

本論文は次の七章で構成されており、全84ページで、使用された図表30点(図27点、表3点)である。

- 1) はじめに
- 2) 呼吸調節機能の概要
- 3) 低酸素換気応答機構
- 4) アストロサイトについて
- 5) 低酸素負荷時の大脳皮質機能と換気応答に関する実験
- 6) 低酸素負荷時のけいれん発生と換気抑制に関する実験
- 7) おわりに

本研究において、福士勇人氏は生体が低酸素状態におかれた時の呼吸調節機能に対するグリア細胞(神経膠細胞)、特にアストロサイトの役割に関して、解剖学的、生理学的、薬理学的手法を駆使して、包括的にアプローチを行い、その結果から呼吸機能調節に対するアストロサイトの役割を考察し、新しい提言を行った。

我々の身体の様々な機能や反応は、脳の細胞の10%を占めるニューロン(神経細胞)とそれらのネットワークによってつくられており、残りの90%の細胞であるグリア細胞は、

ニューロンを構造的に支えたり、栄養を与えたり、免疫機能を行ったりする補助的な働きをもち、脳機能の発現には直接関与しないと考えられていた。しかし、最近の研究からグリア細胞のなかでも、特にアストロサイトが、ニューロンとは異なる仕組みで、学習や記憶などの脳機能の発現に積極的に関与していることが明らかになりつつあるが、このグリア細胞が、他のどの脳機能にどのように関わっているのかについてはほとんど分かっていない。

そこで、本論文ではアストロサイトと脳機能の一つである呼吸調節機構に着目した。ヒトは通常、低酸素状態になると呼吸が速くなったり、大きくなったりするが、急激に強い低酸素状態になると、逆にこの呼吸応答が抑制されてしまう。この反応は低酸素換気抑制とよばれ、ヒトを意識消失に導き、時には死に至らしめることがある。また、低酸素に曝されるとけいれんが惹起され、これに続いて呼吸の抑制や停止が起こることがある。これらはいずれも臨床上、非常に重要な問題であり、本論文では、そのメカニズムにアストロサイトが関与しているとの仮説のもと、様々な手法を使った実験を行い、考察している。

各章の概要は次のとおりである。

第一章「はじめに」では、本学位論文の背景と目的を、すでに解明されている呼吸調節メカニズムやグリア細胞、特にアストロサイトの役割を元に簡素に述べている。前述の通り、呼吸機能は動脈酸素分圧のホメオスタシス（恒常性）が維持されており、この調節機能はこれまでニューロンのネットワークの結果生じる換気量調節によって行われると述べた。

しかし、近年のグリア細胞の機能に関する研究から、これまで神経情報の伝達・統合には直接的な関与しないと考えられてきたアストロサイトが広範囲調節の機能を有し、呼吸機能調節への関与も示唆され始めており、本研究の目的は注目を集めるアストロサイトが呼吸調節において果たす役割を明らかにするために、低酸素曝露時の換気応答に焦点を当て、呼吸調節におけるアストロサイトの役割に関する最近の報告と自ら行った実験から論述している。

第二章「呼吸調節機構の概要」では、呼吸機能の調節メカニズムをホメオスタシスの観点のもと、ここまで明らかになっている呼吸調節メカニズムを脳幹部の呼吸ニューロンを中心に概説している。

脳幹部には pre-Bötzinger complex を含んで縦方向に分布する延髄腹側呼吸ニューロン群（VRG；ventral respiratory group）、延髄背側で左右対称に孤束核を中心として縦方向に分布する延髄背側呼吸ニューロン群（DRG；dorsal respiratory group）、橋の吻外側部に位置する結合腕傍核（parabrachial nucleus）および Kölliker-Fuse nucleus よりなる橋呼吸ニューロン群（PRG；pontine respiratory group）などにより構成される呼吸中枢ニューロン群が存在している。

これらの呼吸中枢には、肺および気道にある末梢の機械受容器で感知された換気状態の情報と、ガス交換の結果としての血液ガスの状態が大動脈弓や頸動脈洞にある末梢化学受容器および主に延髄にある中枢化学受容器からの情報が入力され、自律的な呼吸活動を形成・維持する呼吸ネットワークを修飾して、呼吸出力が最適化されるように、フィードバック制御が行われている。これらの古典的な呼吸リズム形成の脳幹部呼吸リズム形成ネットワークに対して、大脳皮質などの高位の脳は、呼吸パターンとリズムを修飾するが、それらの形成に必須の機能を果たしているわけではないことを指摘し、また、大脳辺縁系や視床下部外側部は運動、情動、ストレス時の呼吸機能増強に関与し、大脳皮質は呼吸パターン形成機構に影響を及ぼしていると述べている。

第三章「低酸素換気応答機構」では、まず二章で述べた呼吸調節機構をさらに掘り下げ、低酸素状態に生体が負荷された際の呼吸反応メカニズムのこれまでの考え方を概説したあと、末梢化学受容器の低酸素受容機構に関する最新の知見を解説している。

動脈血中の酸素分圧は末梢化学受容器である頸動脈小体によって感知されるが、この頸動脈小体は Type I cell と Type II cell から構成されている。Type I cell は3種類のカリウムチャンネルを発現し、このカリウムチャンネルのサブタイプのいずれかが低酸素状態を感知していると考えられ、現在もその特定を目指した研究が続けられている。Type II cell は頸動脈小体での情報伝達において、パラクライン的に関与し、化学受容体機能の発現や呼吸ニューロン活動に対してグリア細胞のような働きをしていることを指摘した。

次に、中枢内の酸素受容部位とそのメカニズムを最新の知見を交えて解説し、低酸素状態の際には呼吸中枢内のニューロンが、低酸素状態を感知して末梢化学受容器とは独立して、呼吸を増強させるよう働いていると指摘した。このように生体は組織内の酸素分圧のホメオスタシスを維持するために、末梢や中枢内に酸素状態を受容するメカニズムを持ち、換気量の調節を行っていることを示すとともに、現在までに解明されている点と、未だ不明な点を示した。

第四章「アストロサイトについて」では、グリア細胞に関する一般的な知識を解説し、続いて本研究の研究対象となるアストロサイトの特性に関する最新の知見を紹介しながら、脳機能発現に関して、これまで知られていなかったアストロサイトの新たな役割について言及している。

アストロサイトは、シナプス前ニューロンの軸索終末から放出される様々な神経伝達物質に対する受容体を持つとともに、グリオトランスミッター（グリア細胞がもつ神経伝達物質）を放出し、ニューロンに対して情報伝達を行う。これらの構造的・機能的関係に基づき、シナプスはシナプス前ニューロンとシナプス後ニューロンとアストロサイトの三者から構成されるという「tripartite synapse」説が提唱されていることを示した。

次に、低酸素応答以外の呼吸調節機構におけるアストロサイトの役割に関して、新知見

を交えて解説している。アストロサイトは、呼吸リズムの形成にも関与している可能性を示した。アストロサイトが、ATPやBDNFなどの物質を介して、ニューロンとのやり取りを調整して、安定的なリズム形成・維持に関与していることを紹介している。続いて、アストロサイトの中枢内化学受容への関与について、解説している。中枢内の化学的状態は、呼吸調節のみならず、血圧をはじめとした生体の様々な機能を変化させるが、これらの機能調節にアストロサイトが深く関与している可能性を示した。

さらに、脳内の化学的状態の一つである低酸素状態が呼吸調節に与える影響とアストロサイトの役割に関して詳述している。下位脳幹部のアストロサイトは、低酸素に曝露すると、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇からこれを感じ、ATPなどのグリオトランスミッターを遊離させる。遊離されたATPは、呼吸ニューロンのP2Y₁受容体に作用して興奮させ、呼吸増強に働く。アストロサイトは、既述の三者間シナプスにより相互に様々な神経伝達物質をやり取りしつつ、ニューロンとともに呼吸調節に関与している。また、アストロサイト自体が、低酸素を感知するセンサー細胞として働いている可能性を示すとともに、アストロサイトは長時間の低酸素曝露や短時間でも強い低酸素への曝露は脳機能を抑制するが、低酸素曝露時にニューロンに対して保護的な機能を果たし、呼吸の恒常性を維持しようとする。以上のように、本章ではアストロサイトがニューロンとともに低酸素状態に対応して、呼吸機能の変化に関与していることを解説した。

第五章「低酸素負荷時の大脳皮質機能と換気応答に関する実験」は、これまで論述した呼吸のホメオスタシスとアストロサイトの役割を踏まえ、臨床上非常に重要な問題である低酸素換気抑制のメカニズムに対するアストロサイトの役割を明らかにする実験を行い、その実験結果とこれまでの先行研究から、呼吸調節に対するアストロサイトの役割を考察している。

通常、ヒトが低酸素環境におかれると生体内酸素分圧の恒常性維持のため、換気量の増加反応が出現するが、急激に強い低酸素に負荷された場合は、このような呼吸調節がなされず、低酸素換気抑制とよばれる状態が出現し、ヒトを意識消失に導き、時には死に至らしめることがある。この低酸素換気抑制の脳内メカニズムに関して、大脳皮質の関与を強く示唆する実験エビデンスが示されており、大脳皮質からの呼吸抑制入力増加や呼吸抑制物質の増加など、大脳皮質ニューロンの役割を中心にいくつかの説が提唱されているが、いずれも大脳皮質の活動と低酸素換気抑制との因果関係を示す有力な実験結果を得るには至っておらず、低酸素換気抑制反応の出現時に大脳皮質が果たす機能的役割は不明なままである。

そこで、本章ではアストロサイトが低酸素曝露時の大脳皮質機能維持と呼吸機能維持に役割を果たしているとの仮説をたて、これを検証する動物実験を行った。本実験は、生理学的、薬理的、解剖学的な異なる3つの手法を駆使してデータを取得し、多角的な視点

から解析している。生理学的手法として、覚醒度および大脳皮質機能の発現度合を示す指標となる脳波のガンマ波帯域のパワーを算出・解析するとともに、whole body plethysmography を用いて換気量の測定をはじめとした呼吸機能の測定を行っている。薬理学的手法として、アストロサイトの活性化阻害薬である arundic acid を用いて、アストロサイトの不活化前後での脳皮質機能と呼吸機能の解析を行っている。さらに、解剖学的手法として、低酸素負荷時に呼吸機能増強に関与する視床下部背内側核 (DMH) の活動状態を観察するために神経興奮マーカーである c-Fos の免疫組織染色を行っている。

生理学的ならびに薬理学的手法を駆使した実験結果は、急激で強い低酸素負荷時に出現する換気抑制反応が、アストロサイトの活性化阻害薬である arundic acid の投与群で、用量依存的に増強されることを示した。さらに、この時 arundic acid の投与群では大脳皮質機能の発現度合を示す脳波のガンマ波帯域のパワーが、用量依存的に抑制されていた。これらの結果は、アストロサイトが低酸素曝露時における大脳皮質機能の維持、および呼吸の維持・増強の役割を持つ可能性を示唆するものと結論づけている。

加えて、本論文では解剖学的手法を用いて、低酸素換気抑制の発現機序にも迫っている。Arundic acid の前投与群では、急激かつ強い低酸素曝露による神経興奮マーカーの c-Fos タンパクの視床下部での発現は、投与されなかった場合に比較して、ストレス時の呼吸反応を制御する視床下部背内側野 (DMH) で明らかに減少した。急激かつ強い低酸素曝露は、大脳皮質機能を抑制し、大脳皮質によって賦活化されている呼吸増強反応の中核の一つである視床下部からの central command が減弱し、その結果として低酸素換気抑制が起こるといった機序を支持する結果を得ている。

これらの結果から、呼吸出力は主に脳幹によって調節されるが、高位脳、特にアストロサイトが呼吸調節に関与していることを明確に示し、さらにアストロサイトの機能を活性化することによって、低酸素換気抑制を防ぐ薬剤の開発に貢献する可能性や従来のニューロンのみに焦点を当てた研究からは解明できなかった乳幼児突然死症候群、過換気症候群、睡眠時無呼吸症候群などの病態に深く関与している可能性を示し、呼吸調節におけるアストロサイトの役割について知見を得ることが、上記疾患の病態解明や治療・介入方法の確立に寄与することを示唆している。

本章で得られた研究成果は、自律神経科学の国際学会 ISAN2015 (2015年9月、Stresa, Italy) にて発表され、その後に執筆された論文は、呼吸調節分野の国際誌である *Respiratory Physiology & Neurobiology* の Vol. 226, p24-29 (2016年6月) に掲載された。

補足実験として、大脳皮質と呼吸機能の関係を明らかにするために、ナルコレプシー治療薬で覚醒度を上げる Modafinil をマウスに投与して、大脳皮質の機能を促進させたところ、安静時の呼吸を増大させず、高二酸化炭素負荷や低酸素負荷時の換気応答にも影響を及ぼさないことを示した。すなわち、通常の外気環境や換気促進を起こす低酸素状態では、

大脳皮質は呼吸調節に大きく関与せず、脳幹部の呼吸調節ネットワークがその中心であることを示唆した。このことは、急激で強い低酸素状態に現れる換気応答には大脳皮質とアストロサイトの役割が重要であることを示している。この成果は、呼吸調節分野の国際誌である *Respiratory Research* の Vol. 17 の 148 番目 (2016年11月) に掲載された論文の重要な一部を構成している。

第六章「低酸素負荷時のけいれん発生と換気抑制に関する実験」では、アストロサイトが低酸素由来のけいれんの発生・進展、およびそれに伴う呼吸抑制に重要な役割を果たしているとの仮説を検証し、考察している。先行研究によってアストロサイトの賦活化が発作的なけいれんの発生に関連する可能性が示され、低酸素負荷時に一過性の呼吸増強の後にけいれんが発生し、けいれん後に呼吸抑制や呼吸停止という臨床上重要な現象が引き起こされるが、その発生機序は明らかになっていないことを指摘している。

本研究では第五章と同様に生理学的手法と薬理学的手法を組み合わせることで、急激かつ強い低酸素負荷時のけいれん発生状況と呼吸出力応答をアストロサイトの活性化を阻害する *arundic acid* 投与前後で解析した。呼吸停止したマウスはすべて、急激かつ強い低酸素に負荷すると、けいれんが発生し、呼吸が抑制され、呼吸停止に至るという経過を辿っていた。*Arundic acid* 投与は低酸素負荷による呼吸抑制を軽減する方向に働くとともに、低酸素負荷によってけいれんが誘発され、引き続いて呼吸停止を起こしたマウスの生存曲線は *arundic acid* 投与群で明らかに延長した。また、*arundic acid* 投与は低酸素負荷によって引き起こされるけいれんの発生時間を有意に延長していることも明らかにした。

けいれんの原因は、ニューロンの過剰な興奮とニューロンネットワーク活動の興奮と抑制のバランスが外的および内的な刺激により変化することであると考えられている。低酸素に負荷された際に引き起こされるけいれんは、前脳部のアストロサイトが興奮し、このアストロサイトの興奮がこの興奮と抑制のバランスを乱すことが原因であることが先行研究によって示唆されていることを指摘した。従って、本研究で示されたアストロサイト活性化阻害剤 *arundic acid* の投与が、低酸素負荷によるけいれんの発生とそれに引き続く呼吸停止を遅らせたことは、アストロサイトの賦活化が、けいれんの発生と進行に関係していることを支持することを示している。*Arundic acid* の作用機序は、今のところ完全に解明されていないが、*arundic acid* がアストロサイトに特異的に発現するカルシウム結合タンパク質 *S100b* 合成を抑制することで、アストロサイトの活性化を阻害することを指摘している。

これらの結果と他研究機関による成果を総合して、生体への急激で強い低酸素負荷は、前脳部のアストロサイトを活性化し、これがけいれんの発生とその後の呼吸抑制に関係している可能性を示したが、第五章では同負荷はアストロサイトを活性化させ、呼吸機能を

増強する働きを持つ可能性を示した。この低酸素時のアストロサイトの呼吸制御機序に対する働きは、一見反対の効果を持っているようだが、アストロサイトの活性化が低酸素状況に対して打ち勝てるかどうかで、低酸素負荷時の呼吸応答が変化するものと推論し、予想される機序を本文の図27を用いて提案している。

また、本実験の方法論上の問題点も検証している。複数回の低酸素負荷が低酸素への耐性を高め、酸素負荷時の生存時間を長くした可能性を、arundic acid 投与前後の低酸素負荷時の計測データを比較することで検証し、その結果として低酸素耐性が生じた可能性を否定した。

てんかん発作時のけいれんは強く呼吸を抑制する場合があります、てんかん患者の突然死 (SUDEP ; Sudden unexpected death in epilepsy) の要因になる可能性が指摘され、てんかん患者にとって深刻な脅威であるが、その病態・機序は完全には明らかになっていない。本実験の結果により、アストロサイトの興奮は、けいれん発生とけいれんによる呼吸抑制を引き起こし、SUDEP の病態の一因になることを指摘した。従って、arundic acid やその他のアストロサイトの抑制薬が、抗けいれん薬として、SUDEP の高リスク患者に対する予防薬として有効である可能性を指摘した。

この研究成果は、神経科学の国際学会 Neuroscience2016 (2016年11月、San Diego, USA) にて発表され、その後に論文を執筆し、現在、脳神経科学の国際誌に投稿中である。

最終章の第七章「おわりに」では、前章までの内容を総括しまとめるとともに、今後の研究の展開や本研究成果が社会にもたらす貢献や展望に関しても言及している。

急激で強い低酸素に生体がおかされると、大脳皮質機能が抑制され、覚醒度が低下し、視床下部から脳幹へ投射する central command が減弱し、低酸素換気抑制が引き起こされるが、脳幹部のアストロサイトは、低酸素により活性化し、呼吸抑制に対し拮抗的に働いている可能性を示す一方で、強い低酸素負荷による前脳部のアストロサイトの活性化が、けいれんを発生させ、その後の呼吸抑制を促進する可能性も同時に示した。この結果に対して、前脳部のアストロサイトと脳幹部のアストロサイトとでは、急激で強い低酸素負荷に対する反応が異なる可能性を示唆することで、本研究の問題点と今後の研究の方向性を示した。

本研究の成果は、低酸素負荷時の換気応答におけるアストロサイトの役割を明らかにし、中枢性呼吸調節機構におけるアストロサイトの役割についての理解を深め、アストロサイトの関与が指摘されている乳幼児突然死症候群やてんかん患者の突然死など呼吸調節異常を呈する各種疾患の病態の理解とこれら疾患に対する新しい治療法を開発するための基礎的知見を提供する可能性を指摘している。本研究、特に第5、6、7章を総括した成果が、日本自律神経学会の学術雑誌「自律神経」に査読付きの総説として投稿されていたが、2017年2月1日付で受理され、現在掲載を待っている。

【審査結果】

近年、脳機能発現において重要な役割を果たしているとして注目を集めているアストロサイトが、低酸素負荷時の大脳皮質機能と換気の応答にどのように関与しているかを最新の知見と自ら行った実験結果にもとづいて考察している。低酸素換気抑制、けいれん発生およびけいれん後の呼吸停止という臨床上重要で、かつその機序が明らかになっていない現象の解明を行ったところに本学位論文の特色がある。さらに、従来から脳の機能研究の主演であったニューロンだけではなく、アストロサイトが低酸素条件の呼吸抑制作用に重要な役割を果たしていることを示したところに本学位論文の独自性がある。本学位論文は、酸素濃度の変化に対する呼吸出力応答および大脳機能変化に対するアストロサイトの役割を明らかにした。これらは呼吸調節機序の解明の一助となるだけでなく、ヒトの脳機能の理解に対して新しい方向を示すものとなる。また、本研究から得られた知見は、低酸素換気抑制時の有効な対処方法の確立に寄与する可能性があり、さらに、脳機能の調節に対してニューロンと同等の役割を果たしていると予想されているアストロサイトについて、その役割の解明に寄与するものである。正常な呼吸調節機能に対するアストロサイトの役割、大脳皮質と脳幹部、それぞれ分布するアストロサイトの呼吸調節における役割と相互関係、arundic acid の作用機序など、本研究に関していくつかの疑問は残るが、この点に関しては今後の研究課題として、申請者に研究のさらなる発展を望みたい。

本学位申請論文は、本主題のもと適切に構成され、文献や結果の提示も適切になされ、上記で紹介したように、各章の分析は緻密かつ着実で、論理展開も明快である。また、理工学研究科（生体医工学専攻）の博士学位審査基準に照らしても妥当な研究内容であると認められる。従って、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致を以って富士勇人氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。