

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14619

研究課題名（和文）本態性高血圧発症への頸動脈小体由来ノルアドレナリンの役割

研究課題名（英文）The role of noradrenalin within carotid body in essential hypertension

研究代表者

加藤 弘毅（Kato, Kouki）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・動物実験施設・助教

研究者番号：30771026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、高血圧発症に対する頸動脈小体由来ノルアドレナリンの役割を解明することを目的とした。本研究では高血圧症のモデルの一つであるDahl食塩感受性高血圧ラットに着目し、その頸動脈小体においてカテコールアミン合成酵素の免疫反応性が減弱していることを明らかとした。このことから、食塩感受性高血圧症では、頸動脈小体においてカテコールアミン合成が低下していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧症の代表的なモデルである高血圧自然発症ラットでは、頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵素の発現は増強していることが知られている。しかしながら、本研究で明らかとなったDahl食塩感受性高血圧ラットの頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵素の発現低下は、高血圧自然発症ラットの知見と対照的な結果である。このことは、食塩感受性高血圧症と本態性高血圧症では、頸動脈小体のカテコールアミン発現に差異があることを意味している。すなわち、高血圧の種類によって頸動脈小体由来カテコールアミンの役割が異なることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the role of noradrenalin within carotid body in hypertension. This study revealed that immunoreactivities of catecholamine-synthesizing enzymes in carotid body of Dahl salt-sensitive rats as hypertensive animal models were decreased. It was suggested that catecholamine synthesis is decreased in carotid body under salt-sensitive hypertension.

研究分野：実験動物学

キーワード：高血圧症 食塩感受性高血圧 Dahlラット 頸動脈小体 カテコールアミン 免疫組織化学

### 1. 研究開始当初の背景

末梢化学受容器である頸動脈小体は、その器官内に求心性感覚神経終末に囲まれた化学受容細胞を有している。この化学受容細胞が低酸素などの刺激を検出すると、求心性神経を介した反射が起こり、呼吸数増加・交感神経活性増加・血圧上昇が生じる。このように、化学受容器反射は自律神経活動や循環器系に影響を与えることから、頸動脈小体が様々な心血管性疾患の病態形成に関与している可能性が指摘されてきた( )。その一つが高血圧症であり、ヒトやモデル動物である高血圧自然発症ラット(SHR)の知見から( )、頸動脈小体の機能変調が本態性高血圧症発症に関与していることが示唆される。その一方で、高血圧発症過程で生じる頸動脈小体の神経化学的变化は不明であった。

### 2. 研究の目的

化学受容細胞には多くの神経伝達物質が含まれており、その一つがカテコールアミンのノルアドレナリンである。本研究は、高血圧モデルラット(SHR、Dahl ラット)のノルアドレナリン産生化学受容細胞に着目し、生理学的・組織学的・生化学的手法による生体レベルと組織レベルの多面的解析により、頸動脈小体由来ノルアドレナリンの高血圧症発症に対する役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Dahl ラットの頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵素の発現

頸動脈小体と高血圧症の関連性を調べた既報の研究では、SHR を用いた研究報告数は多いが、SHR 以外の高血圧モデルを用いた研究成果は乏しい。他の高血圧モデルとして高食塩食給餌により高血圧を発症する Dahl ラットがあり、Dahl ラットにおいて頸動脈小体の除神経を行うと血圧増加が低減することが報告されている( )。このことから、Dahl ラットの頸動脈小体では、SHR と同様にカテコールアミン発現に変化が生じている可能性があるが、その詳細は明らかではない。そこで、Dahl ラットの頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵素発現を免疫組織学的に解析した。動物は、雄性 DSS ラット(DIS/Eis、Dahl 食塩感受性ラット、n=10)及び対照系統として雄性 DSR ラット(DIR/Eis、食塩抵抗性ラット、n=10)を用いた。各系統で高食塩食給餌(HSD)群と通常食給餌(ND)群を設定した。HSD 群は7週齢から11週齢まで8%高食塩食(オリエンタル酵母社製 F2Dahl-8.0)を給餌し、ND 群は0.3%標準食塩食(日本クレア社製 CE-2)を同じ期間給餌した。実験期間中は、体重測定に加え、非観血式自動血圧測定装置(ソフトロン社製 BP-98AL)を用いた血圧・心拍数測定を週に一度行った。血圧・心拍数は一度の計測において3回測定し、その平均値を算出した。11週齢時に頸動脈小体を採材し、カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)及びノルアドレナリン合成酵素であるドーパミン-水酸化酵素(DBH)に対する抗体を用いた二重蛍光抗体法を実施した。共焦点レーザー顕微鏡(Leica 社製 TCS SP8)を用いて染色標本の画像を取得し、化学受容細胞における両酵素の免疫反応性をグレースケール強度(0-4,095階調)として数値化し評価した。

#### (2) 頸動脈小体における小胞モノアミントランスポーターの局在

小胞モノアミントランスポーター(VMAT)は、ノルアドレナリンを含めたモノアミンの分泌小胞内への輸送・貯蔵を行う( )。また、VMAT アイソフォームは、VMAT1 と VMAT2 の二種類が存在することが知られている( )。頸動脈小体における VMAT の局在を検索することは、高血圧症発症に対するノルアドレナリンの役割を理解する上での一助となる。そこで VMAT に着目し、頸動脈小体における VMAT の局在を免疫組織学的に明らかにすることを目的とした。頸動脈小体における VMAT の基本的分布を明らかにする必要性があったため、正常血圧動物である Wistar ラット(8-9週齢、n=16)を用いて実験を行った。ラットから頸動脈小体を採材し、VMAT1、VMAT2 に加え、TH 及び DBH に対する特異抗体を用いた二重蛍光抗体法を行った。

#### (3) 持続的低酸素が誘起する呼吸循環応答への二酸化炭素の作用

頸動脈小体は血中酸素分圧低下や二酸化炭素分圧上昇を検出すると化学受容器反射を誘起するが、高血圧症における頸動脈小体の機能変化を明らかにするためには、低酸素や二酸化炭素に対する生理反応を解明することが重要である。そこで、二酸化炭素濃度の異なる3種類の低酸素ガスをラットに吸入させ、持続的低酸素が誘起する呼吸循環応答の変化を解析した。低酸素に対する生理反応の基礎所見を明らかにする必要性があったため、動物は正常血圧動物である Wistar ラット(8-9週齢)を用いて実験を行った。ラットは、Hypocapnic hypoxia 群(Hypo、10%O<sub>2</sub>、n=15)、Isocapnic hypoxia 群(Iso、10%O<sub>2</sub>+4%CO<sub>2</sub>、n=12)、Hypercapnic hypoxia 群(Hyper、10%O<sub>2</sub>+8%CO<sub>2</sub>、n=13)に分け、低酸素ガスを2時間吸入させた。低酸素暴露中は、解析ソフト(ADInstruments 社製 LabChart 7)を用い呼吸パラメータ(分時換気量・呼吸数・一回換気量)及び循環パラメータ(血圧・心拍数)をモニタリングした。

#### 4. 研究成果

##### (1) Dahl ラットの頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵素の発現

生理学的解析において、体重は各群で実験期間中増加したが、11 週齢時点で DSS-ND 群は  $340.1 \pm 12.9\text{g}$ 、DSS-HSD 群は  $323.6 \pm 17.1\text{g}$ 、DSR-ND 群は  $365.4 \pm 15.9\text{g}$ 、DSR-HSD 群は  $383.1 \pm 11.8\text{g}$  であり、DSS ラットは DSR ラットに比べ有意な低体重を示した (図 1、 $p < 0.05$ )。一方で、DSS-HSD 群は週齢とともに平均血圧が増加し、11 週齢時点で  $170.7 \pm 13.5\text{mmHg}$  と他の 3 群 (DSS-ND 群:  $112.3 \pm 2.5\text{mmHg}$ 、DSR-ND 群:  $97.1 \pm 4.8\text{mmHg}$ 、DSR-HSD 群:  $106.1 \pm 4.0\text{mmHg}$ ) と比較し有意な高値であった (図 2、 $p < 0.05$ )。各群の心拍数は、実験期間中に大きな変化は認められなかった。

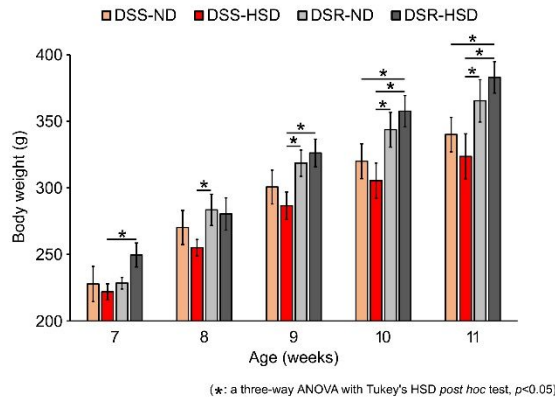


図 1: 実験群の体重の推移

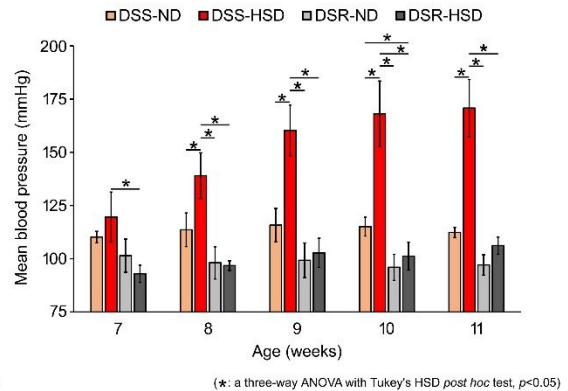


図 2: 実験群の平均血圧の推移

免疫組織学的解析では、TH 免疫反応性は化学受容細胞の細胞質に認められた。しかしながら、TH 強陽性化学受容細胞は、DSR ラットと比較し DSS ラットで少なく観察された (図 3、図 4)。化学受容細胞の TH 陽性率は、実験群間に有意な差は認められなかった (DSS-ND 群:  $70.8 \pm 18.6\%$ 、DSS-HSD 群:  $81.6 \pm 14.6\%$ 、DSR-ND 群:  $89.2 \pm 8.4\%$ 、DSR-HSD 群:  $83.2 \pm 10.1\%$ )。一方、TH 陽性化学受容細胞における TH 免疫反応性は、DSS-ND 群は  $314.7 \pm 87.8$ 、DSS-HSD 群は  $313.6 \pm 77.8$ 、

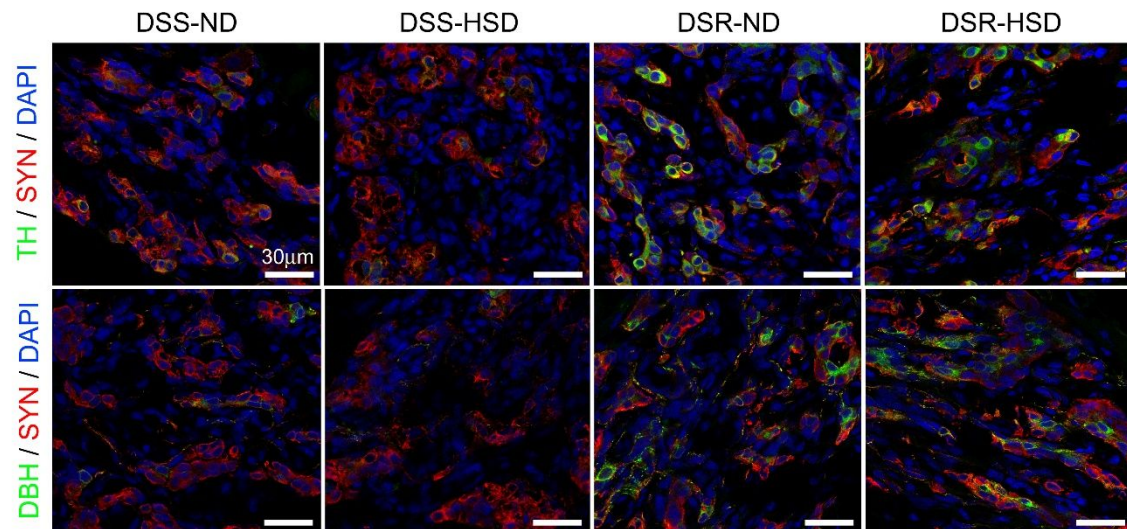


図 3: Dahl ラットの頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵素の免疫反応性

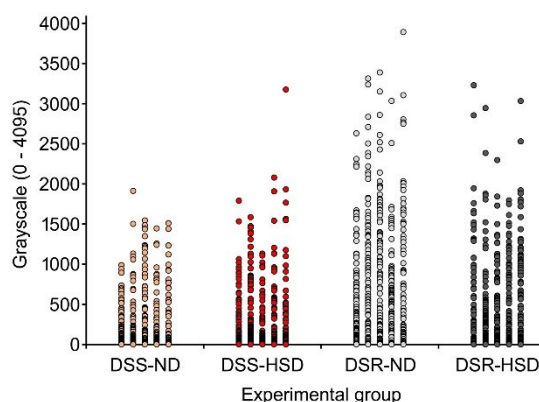


図 4: 化学受容細胞の TH 免疫反応性の散布図

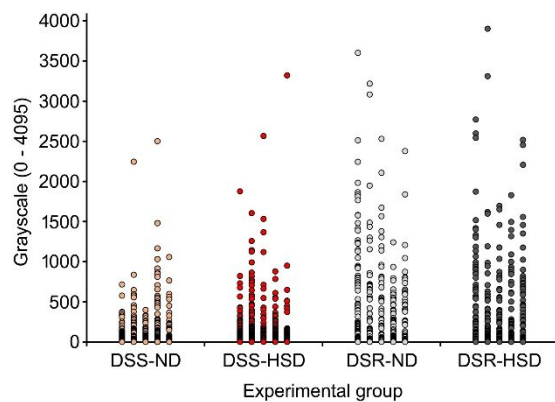


図 5: 化学受容細胞の DBH 免疫反応性の散布図

DSR-ND 群は  $794.7 \pm 163.0$ 、DSR-HSD 群は  $538.0 \pm 94.4$  であり、DSS ラットは DSR ラットに比べ有意な低値であった ( $p < 0.05$ )。DBH 染色態度も TH と類似していた。DBH 免疫反応性は化学受容細胞の細胞質に観察され、DBH 強陽性化学受容細胞は DSR ラットと比較して DSS ラットで少なかった (図 3、図 5)。化学受容細胞の DBH 陽性率は実験群間に差がない一方で (DSS-ND 群:  $65.2 \pm 12.7\%$ 、DSS-HSD 群:  $71.2 \pm 20.9\%$ 、DSR-ND 群:  $63.0 \pm 14.8\%$ 、DSR-HSD 群:  $69.4 \pm 13.1\%$ )、DBH 陽性化学受容細胞における DBH 免疫反応性は DSR ラットに比べ DSS ラットで有意な低値を示した (DSS-ND 群:  $159.7 \pm 78.7\%$ 、DSS-HSD 群:  $200.3 \pm 55.2\%$ 、DSR-ND 群:  $442.5 \pm 148.3\%$ 、DSR-HSD 群:  $405.9 \pm 132.0\%$ 、 $p < 0.05$ )。

以上の結果から、高血圧状態とは無関係に、DSS ラットの化学受容細胞ではカテコールアミン合成酵素の発現が低下していることが明らかとなった。SHR の頸動脈小体では DBH が高発現していることを考慮すると、食塩感受性高血圧症と本態性高血圧症では、頸動脈小体のカテコールアミン発現に差異があることを意味している。すなわち、高血圧の種類によって頸動脈小体由来カテコールアミンの役割が異なることが示唆される。

### (2) 頸動脈小体における小胞モノアミントランスポーターの局在

頸動脈小体においては、VMAT1 陽性反応は多数の化学受容細胞で観察されたが、VMAT2 陽性反応は少数の化学受容細胞において認められた。また、VMAT1 と VMAT2 の二重蛍光染色では、化学受容細胞はいずれか一つの抗体のみに陽性を示し、両抗体に陽性を示す細胞は稀であった。さらに、VMAT アイソフォームとカテコールアミン合成酵素の多重染色では、VMAT1 と TH の免疫反応性には正の相関があり、一方で、VMAT2 免疫反応性は DBH 免疫反応性と正の相関があった (図 6)。

これらの結果は、正常血圧状態下の頸動脈小体化学受容細胞において、VMAT1 はドーパミンの小胞輸送に関与し、VMAT2 はノルアドレナリンの小胞輸送に関与することを示唆している。また、VMAT アイソフォーム発現の観点から化学受容細胞には異種性が存在することが示唆される。

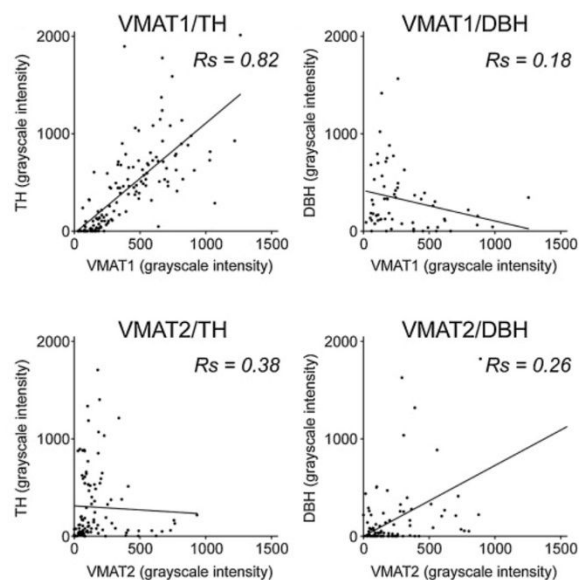


図 6: 化学受容細胞における VMAT アイソフォームとカテコールアミン合成酵素の免疫反応性の関連性

### (3) 持続的低酸素が誘起する呼吸循環応答への二酸化炭素の作用

各群の暴露前の平均血圧 (図 7 上段) は 80-90mmHg であり、Hypo 群では暴露により有意に減少し低値を維持したが ( $53.0 \pm 2.7\text{mmHg}$ 、 $p < 0.05$ )、Hyper 群では暴露前と同程度で推移した ( $91.5 \pm 4.3\text{mmHg}$ )。心拍数 (図 7 下段) は、暴露前は 380-400bpm であり、Hypo 群では暴露後増加、減少、再増加という経時変化を示したが、Hyper 群では増加後に暴露前と同程度を維持した ( $407.1 \pm 7.8\text{bpm}$ )。Iso 群は、Hypo 群と Hyper 群の中間の変化であった。

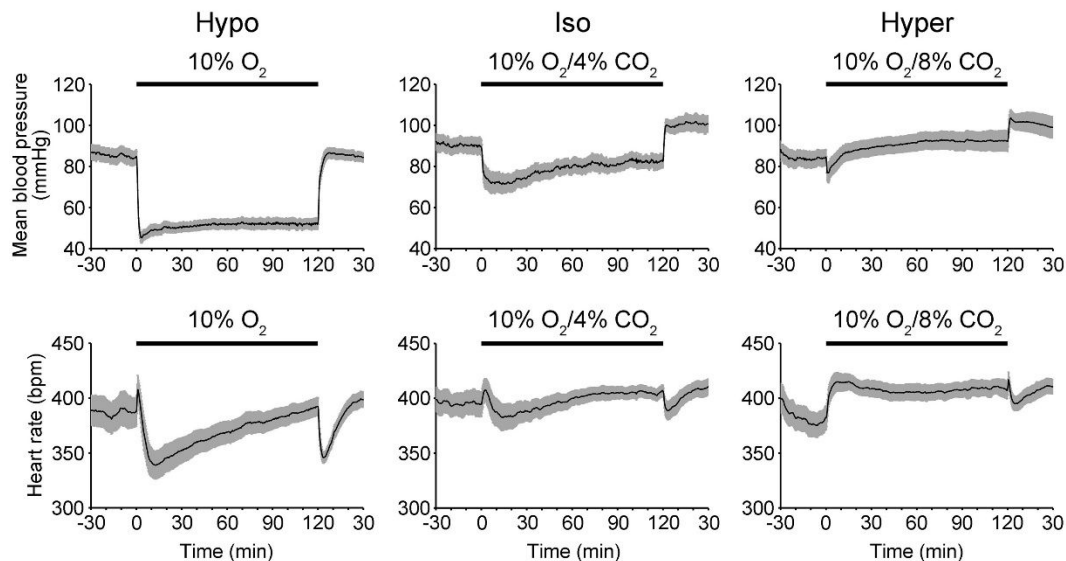


図 7: 低酸素暴露下での循環パラメータ (平均血圧・心拍数) の推移

分時換気量（図8上段）は、暴露前は440-500mL/min/kgであり、Hypo群では暴露により有意に増加したが（ $680.8 \pm 41.0 \text{ mL/min/kg}$ ,  $p < 0.05$ ）Hyper群では増加の程度はより大きく、 $1,060.5 \pm 72.2 \text{ mL/min/kg}$ であった（ $p < 0.05$ ）。この分時換気量増加には、Hypo群では呼吸数増加が寄与しており（図8中段）Hyper群では一回換気量増加が寄与していた（図8下段）。Iso群は、Hypo群とHyper群の中間の変化を示した。

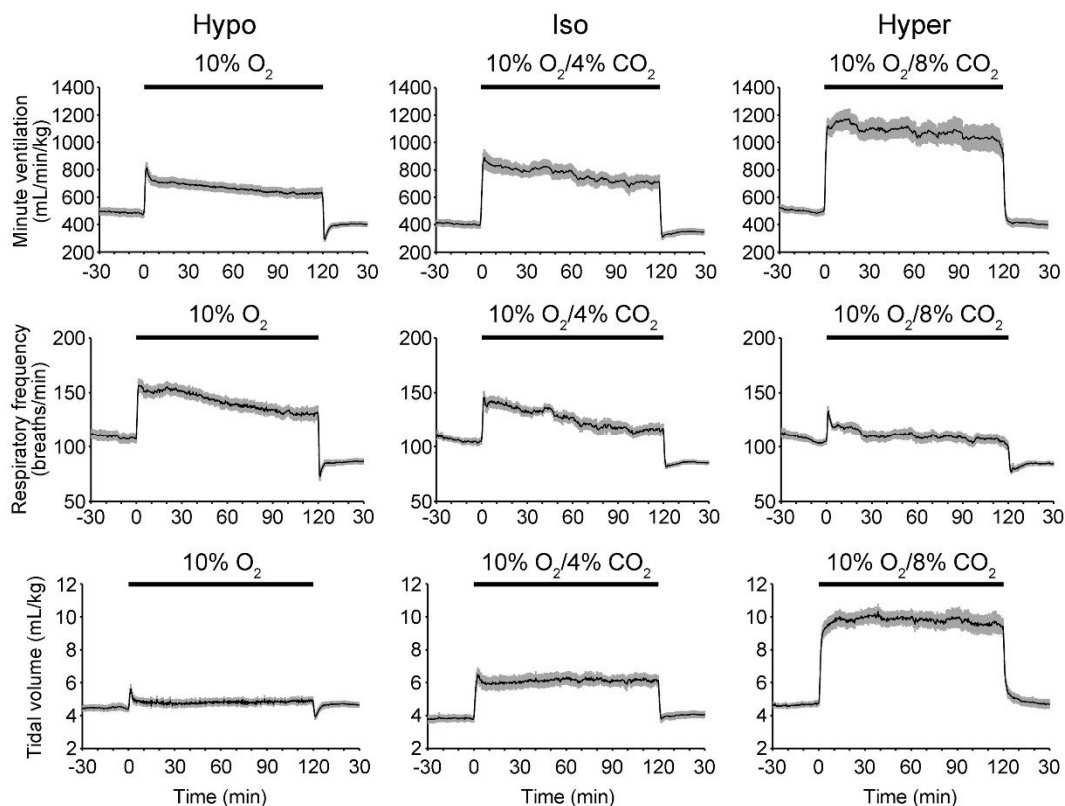


図8：低酸素暴露下での呼吸パラメータ（分時換気量・呼吸数・一回換気量）の推移

以上の結果から、二酸化炭素は、低酸素による循環抑制を無効化する一方で、換気増加をより強めることが示唆された。

<引用文献>

Schultz HD, Li YL, Ding Y. 2007. Hypertension. 50(1):6-13.  
 Trzebski A, Tafil M, Zoltowski M, Przybylski J. 1982. Cardiovasc Res. 16(3):163-172.  
 Smith P, Jago R, Heath D. 1982. J Pathol. 137(4):287-304.  
 Judy WV, Farrell SK. 1979. Hypertension. 1(6):605-614.  
 Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, Sobotka PA, Gourine AV, Paton JF. 2012. J Physiol. 590(17):4269-4277.  
 Fujii K, Saku K, Kishi T, Oga Y, Tohyama T, Nishikawa T, Sakamoto T, Ikeda M, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K. 2017. Am J Hypertens. 30(8):791-798.  
 Henry JP, Botton D, Sagne C, Isambert MF, Desnos C, Blanchard V, Raisman-Vozari R, Krejci E, Massoulie J, Gasnier B. 1994. J Exp Biol. 196:251-262.  
 Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. 1992. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(22):10993-10997.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Kouki, Morinaga Ryosuke, Yokoyama Takuya, Fushuku Seigo, Wakai Jun, Nakamuta Nobuaki, Yamamoto Yoshio	4. 巻 300
2. 論文標題 Effects of CO2 on time-dependent changes in cardiorespiratory functions under sustained hypoxia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Physiology & Neurobiology	6. 最初と最後の頁 103886 ~ 103886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resp.2022.103886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kouki Kato, Takuya Yokoyama, Tatsumi Kusakabe, Katsuhiko Hata, Seigo Fushuku, Nobuaki Nakamuta, Yoshio Yamamoto	4. 巻 122
2. 論文標題 Differences in the Expression of Catecholamine-Synthesizing Enzymes Between Vesicular Monoamine Transporter 1- And 2-immunoreactive Glomus Cells in the Rat Carotid Body	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta histochemica	6. 最初と最後の頁 151507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤弘毅
2. 発表標題 本態性高血圧症における頸動脈小体のカテコールアミン発現
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤弘毅、森永涼介、横山拓矢、冨宿誠吾、中牟田信明、山本欣郎
2. 発表標題 持続的低酸素に対する呼吸循環応答への二酸化炭素の影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤弘毅、富宿誠吾
2. 発表標題 Dahl食塩感受性高血圧ラットの頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵素の低発現
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------