

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16482

研究課題名(和文)頸動脈小体化学受容細胞の小胞型ヌクレオチド輸送体による神経伝達制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of neurotransmission by vesicular nucleotide transporter in carotid body chemoreceptor cells

研究代表者

横山 拓矢 (YOKOYAMA, Takuya)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：70772094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頸動脈小体における神経伝達物質ATPの開口放出に関わる小胞型ヌクレオチド輸送体(VNUT)の発現と局在を検索した。RT-PCRによって頸動脈小体においてVNUTのmRNA発現が認められた。免疫組織化学では、約23%の化学受容細胞にVNUT陽性反応が認められた。VNUT陽性反応は、P2X3型ATP受容体を発現する感覚神経終末に取り囲まれる化学受容細胞集団に限局していた。以上の結果から、VNUTは感覚神経終末が選択的に分布する化学受容細胞集団に限局することが明らかとなった。VNUTを有する化学受容細胞が特異的にATPを小胞分泌し、頸動脈小体から感覚神経終末へ低酸素の情報を伝達している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頸動脈小体の化学受容細胞は神経伝達物質ATPを分泌する機能的に同一な細胞集団とみなされており、その分泌機構を追及した研究はなかった。本研究は、VNUTを発現する化学受容細胞のみが低酸素の情報を伝達しているという新たな機能局在性の可能性を示した。今後、VNUTが化学受容細胞においてATPの小胞内蓄積と分泌を制御している事実を捉えることができれば、低酸素に対する呼吸反射経路の起動に関わる重要な知見を示すことができる。

研究成果の概要(英文)：Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is the neurotransmitter from chemoreceptor cells to sensory nerve endings in the carotid body. The present study investigated mRNA expression and immunohistochemical localization of VNUT, the vesicle loading protein for exocytosis of ATP, in the rat carotid body. RT-PCR analysis detected the expression of mRNA for VNUT, in extracts of the carotid body. Immunohistochemistry detected the immunoreactivity for VNUT in 23.1% of chemoreceptor cells. Furthermore, VNUT immunoreactivity was selectively localized in chemoreceptor cells surrounded by sensory nerve endings immunoreactive for P2X3 purinoceptors. These findings revealed the selective localization of VNUT in the subpopulation of chemoreceptor cells receiving sensory innervation and suggested that suggest these cells release ATP by exocytosis for chemosensory transmission in the carotid body.

研究分野：組織学

キーワード：頸動脈小体 免疫組織化学 小胞型ヌクレオチド輸送体 ATP

## 1. 研究開始当初の背景

頸動脈小体は動脈血酸素分圧の変動をモニターする器官であり、環境変化や呼吸器疾患により生体が低酸素状態に陥ると、化学受容細胞が酸素分圧の低下を感知する。細胞は神経伝達物質であるアデノシン三リン酸(ATP)を分泌し、P2X受容体を介して舌咽神経の分枝である感覚神経(頸動脈洞枝)を興奮させることにより延髄へ低酸素の情報を伝える。その結果、呼吸反射が引き起こされ、呼吸数が増加することによって体内への酸素供給は正常に保たれている。

小体において化学受容細胞は細胞集団を形成し、各細胞には抑制性物質ドパミンやノルアドレナリン等が存在するが、ATPを介した神経伝達機能は共通していると考えられていた。ところが、申請者はP2X2およびP2X3受容体の発現を指標として感覚神経終末の分布を検索した結果、神経終末はドパミン合成酵素(チロシン水酸化酵素; TH)を有する化学受容細胞に分布しているのに対して、ノルアドレナリン合成酵素(ドパミン水酸化酵素; DBH)を有する細胞集団には分布しないことが分かった。この研究成果から、化学受容細胞の中にATPの分泌を専業とする細胞集団が存在する可能性を見出した。予備実験として、ATPの小胞内蓄積と分泌を担う小胞型ヌクレオチド輸送体(VNUT)の組織局在を検索すると、THを有する化学受容細胞にVNUTが限局していた。したがって、VNUTを発現する化学受容細胞からのみATPが小胞分泌され、頸動脈小体から感覚神経へ低酸素の情報が伝達されていることが示唆された。しかしながら、化学受容細胞におけるVNUTの局在・機能の全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、頸動脈小体におけるVNUTの局在を特定することを目的とした。また、蛍光標識ATPのイメージング解析を用いてVNUTによるATPの小胞内蓄積・分泌機能を立証すると共に、ATPの小胞分泌に起因する呼吸反射制御の詳細を明らかにし、低酸素時の呼吸反射に対する頸動脈小体化学受容細胞におけるVNUTによる神経伝達制御機構を解明する予定であった。しかしながら、イメージング解析と呼吸反射に関する実験が難航し、結果を得ることができなかった。一方で、研究途上で低酸素曝露動物の頸動脈小体におけるVNUTの発現変化および細胞外ATP分解酵素ecto-ATPase(ENTPD2)の重要性が明らかになってきた。以上の背景を踏まえ、本研究は3つの実験から構成した。以下に、各項目における目的を示す。

### (1) 頸動脈小体におけるVNUTの局在解析

VNUTのmRNA発現および局在を特定する。各種免疫組織化学マーカーを用いてVNUT陽性反応と化学受容細胞、支持細胞および感覚神経終末との形態学的関係性を明らかにする。

### (2) 短時間低酸素曝露によるVNUT陽性反応の発現変化解析

ラットに低酸素曝露を行い続けると、曝露後24時間の時点でも呼吸数が増加するという報告から、低酸素曝露によってVNUTの発現も増強することが推測された。そこで、24時間までの低酸素曝露を行い、時間経過による頸動脈小体におけるVNUTの発現変化を解析した。

### (3) 頸動脈小体におけるecto-ATPaseの局在解析

ATPによる化学受容細胞-感覚神経終末間の神経伝達終息機構を明らかにする目的で、細胞外のATPをADPに加水分解する酵素ecto-ATPase(ENTPD2)の免疫組織化学的局在を解析する。また、ADPに高い親和性を示すGi蛋白共役型P2Y12受容体の局在を検索し、ecto-ATPaseによるATPの分解産物ADPの動態を考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) 頸動脈小体におけるVNUTの局在解析

材料として、Wistarラット(8週齢、雄)を用いた。ラットから頸動脈小体を採取後、RT-PCR法によってVNUTのmRNA発現を検索した。また、ラットを4%パラホルムアルデヒド加リン酸緩衝液で灌流固定後、頸動脈小体の凍結切片を作製し、以下の抗体を用いた多重蛍光抗体法により染色した。標本は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、VNUTの局在を解析した。

### (2) 短時間低酸素曝露によるVNUT陽性反応の発現変化

低酸素曝露チャンパー内でラットを0、2、4、6、12、24時間の低酸素(10% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>)に曝露した。曝露後に頸動脈小体の凍結切片を作製し、VNUT抗体およびSYN抗体により二重蛍光染色を施した。画像解析によりSYN陽性化学受容細胞におけるVNUT蛍光強度の変化を解析した。VNUT蛍光強度は、0-4,095階調のグレースケールで数値化した。

### (3) 頸動脈小体におけるecto-ATPaseの局在解析

ラットを灌流固定後、頸動脈小体の凍結切片を作製し、以下の抗体を用いて蛍光抗体法により染色した。作製した標本は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ecto-ATPaseの局在および周囲細胞・

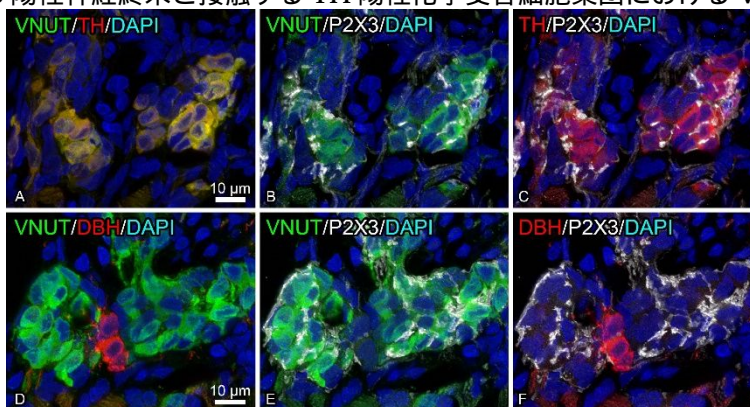
神経終末との形態学的関係を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 頸動脈小体における VNUT の局在解析

RT-PCR 法では、頸動脈小体の抽出産物において VNUT の mRNA 発現が認められた。多重蛍光抗体法では、SYN 陽性反応を示す化学受容細胞のうち、23.1%の核周囲細胞質に VNUT 陽性反応が認められた。一方で、S100B 陽性反応を示す支持細胞に VNUT 陽性反応は認められなかった。また、VNUT 陽性反応は P2X3 陽性神経終末と接触している TH 陽性化学受容細胞集団に局在し(図 1A-C)、DBH 陽性化学受容細胞には認められなかった(図 1D-F)。VNUT 陽性化学受容細胞の P2X3 陽性神経終末との接触面には、シナプス前部足場蛋白 Bassoon 陽性反応が集積しており、小胞分泌された ATP はシナプス伝達により感覚神経終末を興奮させることが示唆された。以上の結果から、VNUT は感覚神経終末が選択的に分布する化学受容細胞集団に限局することが示唆された。VNUT を有する化学受容細胞が特異的に ATP を小胞分泌し、頸動脈小体から感覚神経終末へ低酸素の情報を伝達している可能性がある。

図 1. P2X3 陽性神経終末と接触する TH 陽性化学受容細胞集団における VNUT の局在



##### (2) 短時間低酸素曝露による VNUT 陽性反応の発現変化

0 時間曝露群 (対照群) において VNUT 強陽性反応を示す化学受容細胞は散在性に認められ、6、12、24 時間曝露群ではほぼ全ての細胞が強陽性反応を示した(図 2)。VNUT 陽性化学受容細胞の平均蛍光強度は、6、12、24 時間曝露群では対照群に比べ有意に増加し ( $p < 0.05$ )、このうち、12 時間曝露群は 6、24 時間曝露群と比べ有意に増加した ( $p < 0.05$ , 図 3)。以上の結果から、早期低酸素環境下では化学受容細胞における VNUT の発現が亢進されることで、頸動脈小体から感覚神経終末への神経伝達が増強されていることが示唆された。

図 2. 低酸素曝露による VNUT 蛍光強度の増強

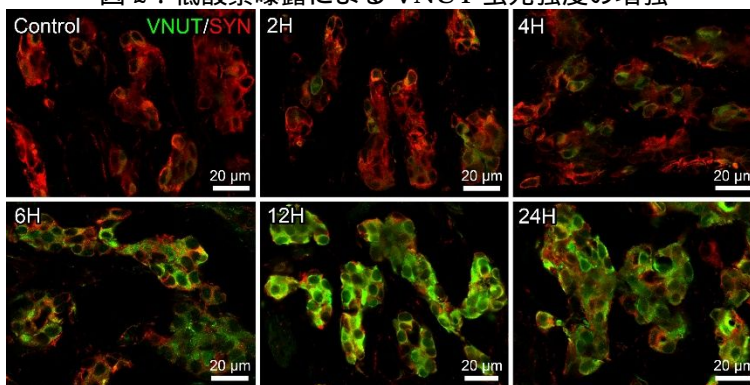
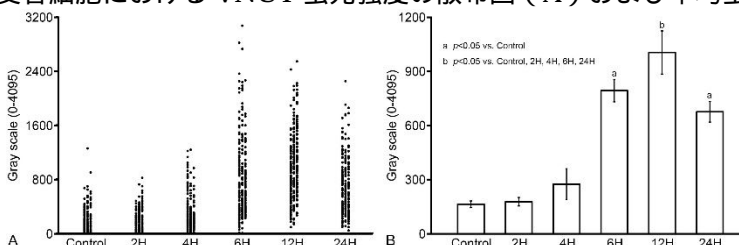


図 3. 化学受容細胞における VNUT 蛍光強度の散布図 (A) および平均蛍光強度 (B)

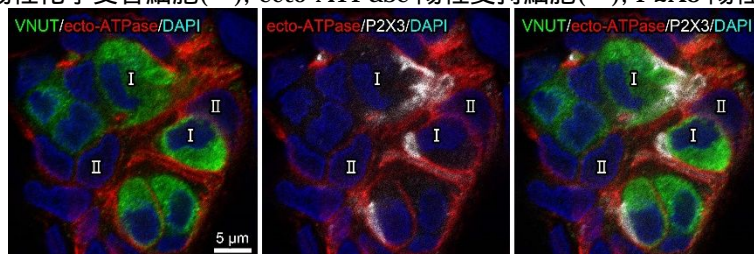


##### (3) 頸動脈小体における ecto-ATPase の局在解析

S100B 陽性反応を示す支持細胞において ecto-ATPase 陽性反応は認められ、強陽性反応は特に

細胞質突起の膜領域に局在していた。ecto-ATPase 陽性支持細胞は細長い細胞質突起を伸ばし、VNUT 陽性化学受容細胞間および細胞集団を緊密に取り囲む一方で、VNUT 陽性化学受容細胞と P2X3 陽性神経終末の接触面に ecto-ATPase 陽性反応は認められなかった (図 4)。以上の結果から、ecto-ATPase は支持細胞に発現し、VNUT を有する化学受容細胞 - 感覚神経終末間の神経伝達において過剰な ATP を除去することにより神経伝達の終息に関与していることが示唆された。また、ADP に高い親和性を示す Gi 蛋白共役型 P2Y12 受容体が、VNUT 陽性化学受容細胞に局在していた。ATP の分解産物 ADP は、P2Y12 受容体を介して化学受容細胞の興奮を負のフィードバック調節している可能性が見出された。

図 4 . VNUT 陽性化学受容細胞( ), ecto-ATPase 陽性支持細胞( ), P2X3 陽性神経終末の関係



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Masato Hirakawa, Takuya Yokoyama, Yoshio Yamamoto, Tomoyuki Saino	4. 巻 529
2. 論文標題 Distribution and morphology of P2X3-immunoreactive subserosal afferent nerve endings in the rat gastric antrum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2024-2028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25069.	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 Yokoyama Takuya, Yamamoto Yoshio, Hirakawa Masato, Kato Kouki, Saino Tomoyuki	4. 巻 528
2. 論文標題 Vesicular nucleotide transporter immunoreactive type I cells associated with P2X3 immunoreactive nerve endings in the rat carotid body	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24837	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 Yokoyama Takuya, Settai Kazuya, Nakamuta Nobuaki, Yamamoto Yoshio	4. 巻 122
2. 論文標題 Vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive afferent nerve terminals in rat carotid sinus baroreceptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151469 ~ 151469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.acthis.2019.151469	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 Yokoyama Takuya, Yamamoto Yoshio, Hirakawa Masato, Saino Tomoyuki	4. 巻 155
2. 論文標題 GluN2A- and GluN2B-immunoreactive type I cells attached to vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive afferent nerve terminals of the rat carotid body	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 719 ~ 726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-01970-5	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 Ito Motoi, Yokoyama Takuya, Hirakawa Masato, Yamamoto Yoshio, Sakanoue Wakana, Sato Kenichi, Saino Tomoyuki	4. 巻 240
2. 論文標題 Morphology and chemical characteristics of taste buds associated with P2X3 immunoreactive afferent nerve endings in the rat incisive papilla	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 688 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joa.13583	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 Hirakawa Masato, Yokoyama Takuya, Yamamoto Yoshio, Saino Tomoyuki	4. 巻 529
2. 論文標題 Morphology of P2X3 immunoreactive basket like afferent nerve endings surrounding serosal ganglia and close relationship with vesicular nucleotide transporter immunoreactive nerve fibers in the rat gastric antrum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 3866 ~ 3881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25219	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 横山拓矢, 山本欣郎, 平川正人, 齋野朝幸
2. 発表標題 頸動脈小体のATPによる低酸素情報伝達を制御する分子形態基盤
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川正人, 横山拓矢, 山本欣郎, 齋野朝幸
2. 発表標題 ラット胃漿膜下組織におけるP2X3型ATP受容体陽性感覚神経終末の形態学的解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山拓矢, 山本欣郎, 加藤弘毅, 平川正人, 松浦誠, 齋野朝幸
2. 発表標題 ラット頸動脈小体における小胞型ヌクレオチド輸送体の局在および短時間低酸素曝露による免疫反応性の増強
3. 学会等名 日本解剖学会第66回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横山拓矢, 平川正人, 齋野朝幸
2. 発表標題 ラット副腎髄質細胞内在性のセロトニンによる細胞内Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇の抑制的調節
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会 誌上開催のみ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川正人, 横山拓矢, 齋野朝幸
2. 発表標題 ラット胃幽門前庭に局在するP2X <sub>3</sub> 陽性神経終末の起始神経節の同定
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会 誌上開催のみ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川正人, 横山拓矢, 齋野朝幸
2. 発表標題 ラット胃幽門前庭のP2X <sub>3</sub> 陽性神経終末に局在する小胞グルタミン酸輸送体VGLUT2
3. 学会等名 日本解剖学会第65回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山拓矢、平川正人、齋野朝幸
2. 発表標題 ラット大唾液腺における塩素イオン輸送関連分子の特異的局在
3. 学会等名 日本解剖学会第65回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山拓矢、山本欣郎、平川正人、齋野朝幸
2. 発表標題 ラット頸動脈小体におけるNMDA型グルタミン酸受容体GluN2AおよびGluN2Bの局在
3. 学会等名 日本解剖学会第67回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤元、横山拓矢、平川正人、坂野上和奏、齋野朝幸、佐藤健一
2. 発表標題 ラット切歯乳頭における味蕾様細胞集塊の形態
3. 学会等名 第49回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山拓矢、山本欣郎、斎藤優気、平川正人、齋野朝幸
2. 発表標題 ラット頸動脈小体の感覚神経終末における小胞分泌関連蛋白質の局在
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 平川正人、横山拓矢、山本欣郎、齋野朝幸
2. 発表標題 ラット胃幽門前庭のP2X3陽性漿膜下神経終末に局在する小胞分泌関連分子
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山拓矢、伊藤元、平川正人、山本欣郎、坂野上和奏、齋野朝幸、佐藤健一
2. 発表標題 ラット切歯乳頭における味蕾の免疫組織化学的特徴および感覚神経支配
3. 学会等名 第2回獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2022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
---------	---------