

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580330

研究課題名（和文） 頸動脈小体における交感神経による化学受容調節機構の解明

研究課題名（英文） Sympathetic regulation on chemoreception of the carotid body.

研究代表者

山本 欣郎 (YAMAMOTO YOSHIO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：10252123

研究成果の概要（和文）：頸動脈小体主細胞における低酸素受容は、これまでに知られてきたドパミンによる調節以外にノルアドレナリンおよびセロトニンによって調節されていることが示唆された。また、低酸素反応時に頸部交感神経幹の活動が増加し、頸動脈小体は反射的に交感神経による調節を受ける可能性が示された。さらに、低酸素時には延髄の A1 ノルアドレナリン作動性ニューロン群が活動することがわかった。

研究成果の概要（英文）：Sensing of arterial hypoxia by glomus cells in carotid body is regulating by dopamine. In the present study, it is suggested that noradrenaline and serotonin also regulate chemosensitivity of glomus cells in autocrine manner during short term hypoxia. Furthermore, hypoxic gas enhanced activity of the cervical sympathetic trunk, and activate A1 noradrenergic neurons in the caudal region of ventrolateral medulla.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：(1) 頸動脈小体、(2) シグナル伝達、(3) ノルアドレナリン、(4) 低酸素、(5) 免疫組織化学、(6) 解剖学、(7) 生理学、(8) 獣医学

1. 研究開始当初の背景

頸動脈小体にある主細胞は動脈血中の酸

素分圧の低下や pH の低下を受容し、アセチルコリンや ATP などの興奮性伝達物質を介して舌咽神経の分枝である頸動脈洞枝によ

り延髄に興奮を伝えている。この際、化学受容細胞である主細胞から抑制性伝達物質であるドーパミンの分泌を増強して負のフィードバック調節を行っている。我々の実験でもラット生体への持続的な低酸素暴露（10% O₂、2-24 時間）により、ドーパミン合成に関与するチロシン水酸化酵素に関して、組織内 mRNA では 2 時間、主細胞に存在するタンパク質では 12 時間という比較的短期間の低酸素暴露によって発現が著しく増強されることを示した（加藤ら、2008; Wakai et al. 2009）。以上のように、頸動脈小体では感覚細胞からの調節物質分泌により機能調節されることがわかっている。さらに、ドーパミンのほかカテコラミンの 1 分子であるノルアドレナリンも低酸素に対する感覚神経の興奮を抑制するという報告があるが、ドーパミンに比較してノルアドレナリンが頸動脈小体に及ぼす影響を論じた論文はほとんどない。我々は、頸動脈小体における感覚受容において、ドーパミンやノルアドレナリン等の複数の調節物質によって調節が行われていると考えた。また、ノルアドレナリンは交感神経における神経伝達物質であるため、低酸素受容時に交感神経活動が変調する可能性を考えた。

2. 研究の目的

頸動脈小体による低酸素受容において、ドーパミンに加えノルアドレナリンが関与することを低酸素暴露によるノルアドレナリン合成酵素の量的変化を指標として明らかにすることを目的とした。また、低酸素受容における頸動脈小体の交感神経性調節の重要性を組織学的および電気生理学的に明らかにすることとした。さらに、研究途上でノルアドレナリンに加えて、興奮性調整物質であるセロトニンの重要性が明らかになってきたため、セロトニンについても検討することとした。以上をふまえ、本研究は 4 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) 低酸素暴露による頸動脈小体におけるノルアドレナリン合成酵素の発現変化

24 時間までの低酸素暴露個体において、カテコラミン合成酵素のうちノルアドレナリン合成に関わるドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) の頸動脈小体における発現変化を明らかにする。さらに、律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) のリン酸化の変化を検討する。

(2) 頸動脈小体におけるセロトニンの合成・分泌基盤

ラット頸動脈小体におけるセロトニン合成、分泌の分子基盤および形態学的基盤を明

らかにする。

(3) 低酸素による呼吸変化と呼吸中枢の活動変化

低酸素、高二酸化炭素、低酸素および高二酸化炭素の混合ガスによる呼吸変化と中枢神経系の Fos 発現の変化を検索し、カテコラミン作動性神経との関係を検討した。

(4) 高血圧モデルラットにおけるノルアドレナリン発現細胞の変化

頸動脈小体の拡大やノルアドレナリン含有量増加が報告されている高血圧動物において、ノルアドレナリンの作用の変化を検討することを目的とした。高血圧自然発症ラット (SHR) の頸動脈小体における頸動脈小体の形態変化やカテコラミン合成酵素の発現を検討した。

3. 研究の方法

(1) 低酸素暴露による頸動脈小体におけるノルアドレナリン合成酵素の発現変化

ラットを 6, 12, 18, 24 時間 10% 低酸素環境に暴露の後、頸動脈小体を採材して、チロシン水酸化酵素 (TH) およびドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) の主細胞における発現を免疫組織化学およびイムノブロットングにより検討した。さらに、低酸素暴露個体の頸動脈小体主細胞において、Ser31 と Ser40 の部位でリン酸化されたチロシン水酸化酵素

(Ser31-TH, Ser40-TH) の発現変化を同手法によって検討した。

(2) 頸動脈小体におけるセロトニンの合成・分泌基盤

ラット頸動脈小体を採材し、セロトニン合成酵素 (TPH-1, TPH-2)、セロトニン 2A (5-HT_{2A}) 受容体、セロトニントランスポーター (SERT) の発現と分布について RT-PCR 法および免疫組織化学によって検索した。

(3) 低酸素による呼吸変化と呼吸中枢の活動変化

材料として Wistar ラットを用いた。低酸素 (10% O₂)、高二酸化炭素 (10% CO₂)、混合ガス (10% O₂-10% CO₂) に 2-4 時間暴露し、ヘッドアウトプレチスモグラフ法により、分時換気回数および平均 1 回換気量を測定し、分時換気量を計算した。また、三種のガスに暴露したラットから脳を採材し、免疫組織化学法により呼吸関連核における Fos 発現細胞の数を計測した。さらに、TH 陽性細胞と二重染色を行いノルアドレナリンの関与を検討した。

(4) 高血圧モデルラットにおけるノルアドレナリン発現細胞の変化

高血圧症ラット (SHR) およびコントロールラットである Wistar Kyoto ラット (WKY) から頸動脈小体を採材後、ヘマトキシリン-エオシン染色および TH と DBH に対する免疫

染色を行った。また、頸動脈小体における両酵素のタンパク発現量をイムノブロット法により調べた。

4. 研究成果

(1) 低酸素暴露による頸動脈小体におけるノルアドレナリン合成酵素の発現変化

12 時間低酸素暴露群では TH 強陽性、DBH 強陽性を示す主細胞の数は共に増加した (図 1)。18 時間以降は、TH 陽性主細胞は増強を継続したが、DBH 陽性の主細胞は増加するもの、コントロールと著変のないものと個体差が認められた。また、DBH 陽性神経線維の数および免疫反応は変化が認められなかった。また、化学受容細胞における Ser31 と Ser40 リン酸化 TH の免疫反応性は、コントロール群に比べ 6, 12, 18, および 24 時間暴露群において有意に増加した ($p < 0.05$)。以上の結果から、6 時間の低酸素暴露によってラット CB のグロムス細胞の TH は Ser31 と Ser40 の部位でリン酸化が増強することを明らかにした (図 2)。これは、TH の新規合成に先立って酵素が活性化することを示しており、暴露初期段階では既に存在する TH によって合成されるドーパミンおよびノルアドレナリンによって化学受容機能を調整していることを示唆している。以上のことから、頸動脈小体における低酸素受容は、12 時間以内という短時間の間にドーパミン、ノルアドレナリン共に分泌増加していることが予測され、低酸素に対する反応に両分子による即応性の抑制的調節を行っていることが示唆された。

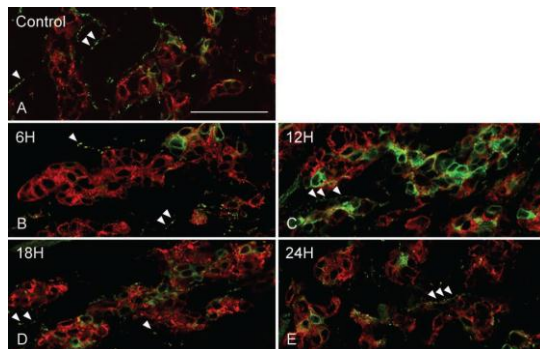


図 1. 低酸素暴露による DBH 陽性細胞の変化。12 時間暴露で最強の蛍光強度を示した。(Kato et al., 2012)

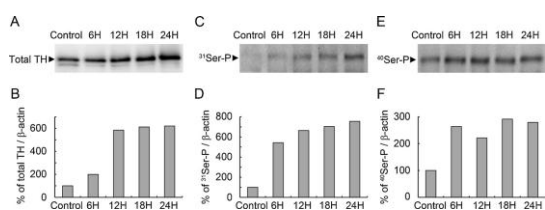


図 2. イムノブロットングによる総 TH 発現量

(A, B)、Ser31-TH 発現量 (C, D)、Ser40-TH 発現量 (E, F) の比較。低酸素暴露 6 時間後に発現強度が増加した。(Kato and Yamamoto, 2012)

(2) 頸動脈小体におけるセロトニンの合成・分泌基盤

RT-PCR では、頸動脈小体において TPH-1、TPH-2、5-HT_{2A} 受容体、SERT mRNA の発現が認められた。TPH-1 mRNA と比較して、TPH-2 mRNA は非常に低い発現量を示した。また、前頸神経節においても TPH-1、TPH-2、SERT mRNA の発現が認められた。免疫組織化学では、主細胞に 5-HT、TPH-1、SERT 陽性反応が認められた (図 3)。そのうち、一部の主細胞は 5-HT に対して強い免疫反応性を示した。また、頸動脈小体内に分布する神経線維では、TPH-1、SERT に対する強い免疫反応性が認められた。頸動脈小体内に分布する神経線維で認められた SERT 強陽性反応は、DBH 陽性反応と共存していた。これらのことから、頸動脈小体主細胞にはセロトニン合成・分泌能があること、頸動脈小体に分布する交感神経はノルアドレナリンに加えてセロトニンを有することが予測された。過去の報告と照らし合わせると、頸動脈小体のセロトニンは低酸素による反応を増強している可能性が高い。また、セロトニンの作用は主細胞による直接作用と自律神経反射を介した間接作用があると考えられた。

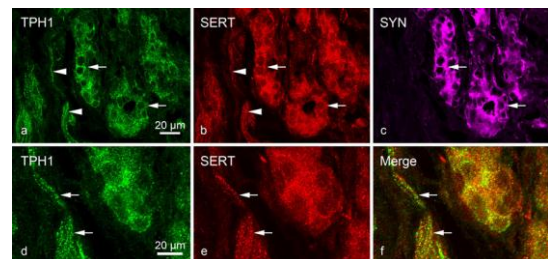


図 3. ラット頸動脈小体における TPH1、SERT の分布。a-c は主細胞のマーカであるシナプトフィジンとの三重染色、d-f は二重染色による重ね合わせ像を示す。(Yokoyama et al., 2013)

(3) 低酸素による呼吸変化と呼吸中枢の活動変化

呼吸測定の結果、コントロールでは分時換気量 (VE) は 0.053 L/min、呼吸数 (RR) は 175 breath/min であった。低酸素暴露によって 10 分後に VE は 0.066 L/min、呼吸数は 189 breath/min に増加したが、4 時間の持続暴露中 VE は 0.055 - 0.073 L/min、RR は 82-189 breath/min と変動し、不定期 (3~5 回程度) に平常時に近い値に変化した。延髄腹外側前部 (rostral ventrolateral medulla; rVLM) における Fos 陽性ニューロンは高二氧化碳暴露群ならびに混合ガス暴露群で観察された。しかしながら低酸素暴露群およびコントロール群では陽性ニューロンはほとんど

認められなかった。同中部 (mVLM) は、呼吸ニューロンを含むが Fos 陽性ニューロンは全ての曝露群において観察された。延髄尾側の領域、cVLM 領域では低酸素曝露群と混合ガス曝露群で多くの Fos 陽性ニューロンが観察された。cVLM 領域における Fos 陽性ニューロンは、そのほとんどが DBH 陽性であった (図 4)。さらに、電気生理学的に低酸素曝露による交感神経活動が変化するかを検討した。頸部交感神経幹を双極白金電極に載せ、ラットに 30 分間低酸素曝露した。低酸素曝露後 5 分程度で同神経の発火頻度は増加し、通常気に戻すと元の状態に戻った (投稿準備中)。これらの結果は、低酸素曝露において中枢のカテコラミン作動性神経が活性化されていることを示唆する。すなわち、低酸素曝露では高二氧化碳素や混合ガス曝露と異なり、中枢神経および末梢交感神経の両部位でカテコラミンによる呼吸調節が行なわれていると考えられた。

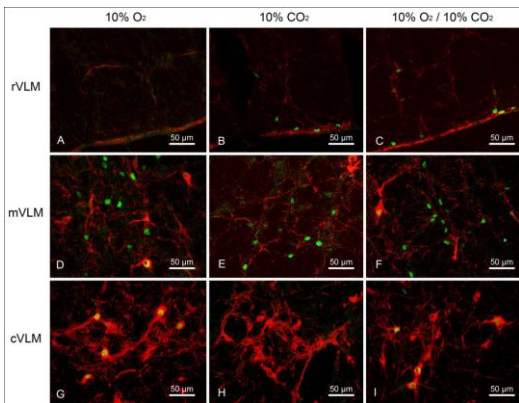


図 4. 延髄における Fos 陽性細胞 (緑) と DBH 陽性細胞 (赤)。低酸素曝露群の cVLM 領域における Fos 陽性細胞は DBH 陽性を示した。

(4) 高血圧モデルラットにおけるノルアドレナリン発現細胞の変化

SHR では頸動脈小体は扁平化しており、CB 容積は WKY に比べ有意に増加した。免疫ブロット法では、両系統間で TH および DBH のシグナル強度は類似し、カテコラミン合成酵素のタンパク発現量に差はみられなかった。TH の免疫染色では、主細胞および神経線維に陽性反応がみられ、染色態度は WKY と SHR 間で類似していた。DBH の免疫染色では、WKY に比べ SHR において強陽性を示す主細胞が多かった。SHR の DBH 強陽性のグロムス細胞は CB 内に分散して存在し、細胞質突起を伸ばしていた。また、両系統において DBH 陽性神経線維が血管および主細胞の周囲に観察された。本研究の結果から、SHR の主細胞

ではノルアドレナリン合成能が増強していることが示唆された。

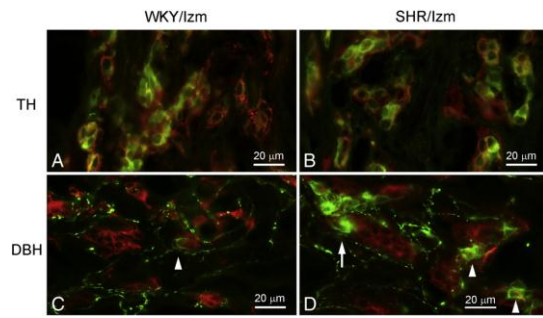


図 5. 高血圧自然発症ラットにおける DBH 陽性主細胞。コントロールの WKY ラットに比較して、反応が強い。(Kato et al., 2012)

(5) 結論

本研究によって、低酸素環境の初期段階における適切な呼吸反射は、頸動脈小体のカテコラミン、延髄の A1/C1 カテコラミン作動性ニューロン群が関与して調節されていることが示唆された。また、低酸素に対して交感神経活動が増強することが明らかになり、この反応はノルアドレナリンに加えて、セロトニンが関与している可能性が示された。

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 5 件)

- ① Yokoyama, T., Yamaguchi-Yamada, M., Yamamoto, Y. (2013) Immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter in the carotid body of the rat. *Histochem. Cell Biol.* DOI: 10.1007/s00418-012-1066-5. (査読有)
- ② Kato, K., Yamamoto, Y. (2013) Short-term hypoxia increases phosphorylated tyrosine hydroxylase at Ser31 and Ser40 in rat carotid body. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 543-546. DOI: 10.1016/j.resp.2012.11.004. (査読有)
- ③ Kato, K., Yamaguchi-Yamada, M., Yamamoto, Y. (2013) Short-term hypoxia transiently increases dopamine β-hydroxylase immunoreactivity in glomus cells of rat carotid body. *J. Histochem. Cytochem.* 61, 55-62. DOI:10.1369/0022155412464639. (査読有)
- ④ Kato, K., Wakai, J., Matsuda, H., Kusakabe, T., Yamamoto, Y. (2012) Increased total volume and dopamine β-hydroxylase immunoreactivity of carotid body in

spontaneously hypertensive rats. *Autonom. Neurosci. Basic and Clinical* 169, 49-55.
DOI:10.1016/j.autneu.2012.03.005. (査読有)

- ⑤ Kato, K., Yamaguchi-Yamada, M., Yamamoto, Y. (2010) Short-term hypoxia increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in rat carotid body. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 839-846.
DOI:10.1369/0022155412464639. (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① 高村大地、若井淳、山田美鈴、山本欣郎 (2012) 低酸素および高二酸化炭素曝露時の間期応答と脳幹における Fos 発現細胞の分布. 第154回日本獣医学会学術集会, (岩手大学・盛岡市), 2012年9月16日.
- ② 加藤弘毅、日下部辰三、山口ー山田美鈴、松田秀樹、山本欣郎 (2011) 高血圧自然発症ラットの頸動脈小体グロムス細胞におけるドーパミンβ-水酸化酵素免疫反応性の増強. 第152回日本獣医学会学術集会, (大阪府立大学・堺市), 2011年9月21日.
- ③ 横山拓矢、若井淳、松田秀樹、山田美鈴、日下部辰三、山本欣郎 (2011) ラット頸動脈小体におけるセロトニン関連分子の形態学的基盤. 第152回日本獣医学会学術集会, (大阪府立大学・堺市), 2011年9月21日.
- ④ 加藤弘毅、山田美鈴、山本欣郎 (2011) 短期間の低酸素曝露によるラット頸動脈小体におけるリン酸化チロシン水酸化酵素の増加. 第57回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会, (岩手大学・盛岡市), 2011年9月10日.
- ⑤ 横山拓矢、若井淳、松田秀樹、日下部辰三、山田美鈴、山本欣郎 (2011) ラット頸動脈小体におけるセロトニン合成・分泌関連分子の発現. 第151回日本獣医学会学術集会 (震災のため誌上開催)
- ⑥ 加藤弘毅、日下部辰三、松田秀樹、林田嘉朗、山田美鈴、山本欣郎 (2011) 高血圧自然発症ラットの頸動脈小体グロムス細胞におけるドーパミンβ-水酸化酵素免疫反応性の増強. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, (震災のため誌上開催)

[その他]

ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/cgi-bin/list/list.cgi?id=94>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 欣郎 (YAMAMOTO YOSHIO)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 10252123

(2) 研究分担者

木崎 景一郎 (KIZAKI KEIICHIRO)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号: 40337994