

平成21年06月05日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591816
 研究課題名（和文） 頸動脈小体と低酸素性化学受容体伝達の遺伝学的個体差について検討
 研究課題名（英文） Genetic differences in carotid body and hypoxic hypoxic chemoreceptor transmission
 研究代表者
 山口 重樹（YAMAGUCHI SHIGEKI）
 獨協医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：50306198

研究成果の概要：

近交系マウスを用いて、頸動脈小体の形態学的な遺伝的個体差の存在が明らかになった。さらに、頸動脈小体を構成する glomus 細胞における neuronal nicotinic acetylcholine receptors の発現様式における遺伝的個体差を明らかにし、glomus 細胞の低酸素性化学伝達の遺伝学的個体差の存在が明らかとなった。これらのことが、低酸素性呼吸応答の遺伝学的個体差の要因になっていると推測した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,100,000円	930,000円	4,030,000円
2008年度	500,000円	150,000円	650,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：医歯薬学

科研ひの分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：頸動脈小体, glomus 細胞, 低酸素性呼吸応答, 遺伝, イオンチャネル, アセチルコリン受容体, DBA/2J, A/J

1. 研究開始当初の背景

低酸素性呼吸制御には個人差が存在し、その要因として環境因子と遺伝因子の存在が示唆されており、特に遺伝的要因は乳児突然死症候群、潜在的な睡眠時無呼吸症候群、麻酔後の遷延性無呼吸などの低酸素性呼吸応答の脆弱、欠如に関与していることが報告されている。低酸素性呼吸応答の遺伝的個体差については、その存在を証明する多くの報告がある。臨床上の報告としては、Kobayashiら

が行った双生児を対象とした研究において、一卵性双生児では双生児間の低酸素性呼吸応答は酷似するが、二卵性双生児では異なることが立証されている。また、動物実験においては、Tankersleyらが行った8種類の近交系マウスに対する低酸素負荷試験において、個々の種類のマウス間に明らかな低酸素性呼吸応答の差が認められ、遺伝的背景の存在を証明している。また、Tankersleyらは彼らの結果から、頸動脈小体の個体差が低酸素性呼吸応答の個体差に強く関与していること

を示唆している。そのため、頸動脈小体の形態的・機能的個体差について調べることは低酸素性呼吸応答の個体差の原因解明に重要であり、またその遺伝的要因について調べることは、様々な低酸素性呼吸応答が低下する疾患の病因解明に不可欠な課題となっている。さらに、頸動脈小体を構成するglomus細胞の特徴について把握して、遺伝学的差異について調べるのが重要である。

2. 研究の目的

Glomus細胞は末梢の化学受容器、特に酸素感知器として低酸素性呼吸応答に重要な役割をしている。そのため、低酸素性呼吸応答および頸動脈小体の個体差を解明するためには、Glomus細胞の機能的個体差について調べる必要がある。Glomus細胞の情報伝達物質にはアセチルコリン、カテコラミン、サブスタンスPなどあり、このうちアセチルコリンを情報伝達物質としたコリン作動系はGlomus細胞の化学受容伝達に重要である。このコリン作動系の特徴を把握することは、Glomus細胞の機能を評価するために必要不可欠である。本研究の目的は、近交系マウスであるDBA/2J（低酸素性呼吸応答が優れている）とA/Jマウス（低酸素性呼吸応答が劣っている）におけるGlomus細胞のコリン作動系における個体差について、その形態、機能、各種受容体の発現等の違いについて調べることである。

3. 研究の方法

(1) 対象：

近交系マウスのうち最も低酸素性呼吸応答の優れているDBA/2Jと低酸素性呼吸応答の最も劣っているA/Jを使用した。

(2) 形態学的検討：

頸動脈小体のトルイジン・ブルー染色標本を作製し、各種マウスの各時の頸動脈小体の形態学的特長を調べた。具体的には、1) 頸動脈小体の外観(形状)、2) Glomus細胞の形成、3) 頸動脈小体内や周囲の血管・神経の走行、4) Glomus細胞の発達、5) 頸動脈小体の容積等について検討した。DBA/2JとA/Jの個体差について調べた。また、タイロシン・ヒドロキシラーゼ (TH) 染色を用いて、各、各種マウスの各時の頸動脈小体における正常に機能しているGlomus細胞の割合についても調べ、両マウスの個体差について調べた。

(3) 電気生理学的検討：

マウスから摘出した頸動脈小体の急性標本を用いてホールセル・パッチクランプ記録を行い、glomus細胞の膜電位記録を行った。そし

て、以下の項目についてDBA/2JとA/Jについて比較検討した。

- ① 化学受容伝達に重要であると考えられているKチャンネル活性の特徴。
- ② Kチャンネル活性におよぼす低酸素の影響。
- ③ 低酸素性化学伝達応答に重要な役割をしているコリン作動系の特徴。

(4) 分子生物学的検討：

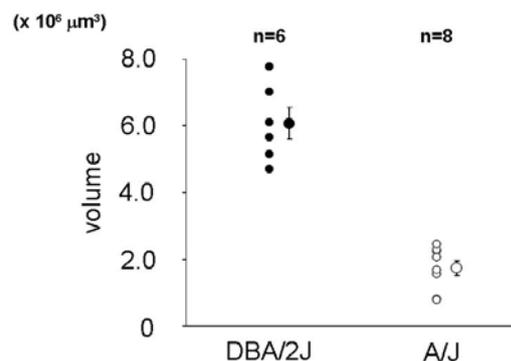
マウスの頸動脈小体から単体のglomus細胞を抽出、single cell RT-PCRを行い、glomus細胞に発現しているneuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs)のサブユニットについて調べ、DBA/2JとA/Jのコリン作動系の差異について検討した。

4. 研究成果

(1) 形態学的検討：

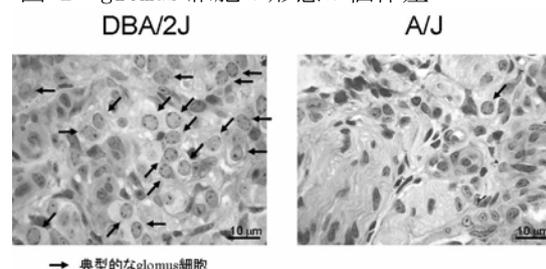
低酸素性呼吸応答の鈍いA/Jでは、頸動脈小体の大きさがDBA/2Jに比べて小さく、DBA/2Jの3分の1程度しかなかった(図1)。

図1：頸動脈小体の大きさの個体差



また、DBA/2Jでみられたような典型的な頸動脈小体の形態構造（正常なglomus細胞がよく発達し、多数のglomerulus (glomus細胞の集合体が存在した)の形成が、A/Jの頸動脈小体では認められず、血管や神経が複雑に頸動脈小体に入り込み、形も不整で周囲組織との境界も不鮮明であり、正常なglomus細胞の発達も悪く、glomerulusの形成もほとんど認められなかった(図2)。

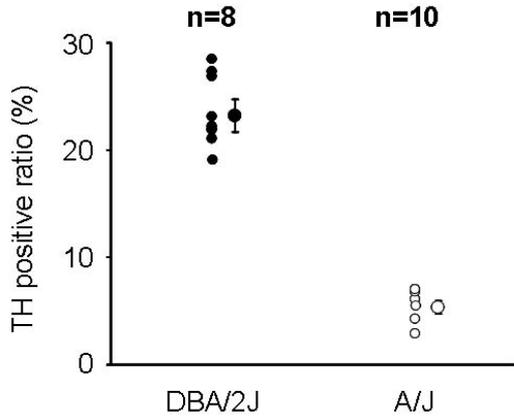
図2：glomus細胞の形態の個体差



→ 典型的なglomus細胞

そして、TH 染色によって評価した機能的 glomus 細胞の発現率は A/J では DBA/2J と比較して有意に少ない傾向を示した (図 3)。

図 3: 頸動脈小体における TH 染色細胞の比率の個体差



(2) 電気生理学的検討:
マウスの glomus 細胞で観察される voltage-gated K^+ current は、非特異的な K^+ チャンネル拮抗薬である 4-Aminopyridine で強く抑制され (図 4), Ca^{2+} 活性型高コンダクタンス K^+ チャンネル拮抗薬である iberiotoxin でも強く抑制され (図 5), さらにこの両者の併用により完全に抑制された。これらのことは、マウスの glomus 細胞における voltage-gated K^+ current の成分は A 型 K^+ チャンネルおよび Ca^{2+} 活性型高コンダクタンス K^+ チャンネルより構成され、その大部分が A 型 K^+ チャンネルであることを示唆している。

図 4: マウスの glomus 細胞で観察される voltage-gated K^+ current への 4-Aminopyridine の影響

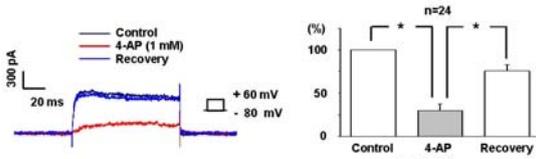
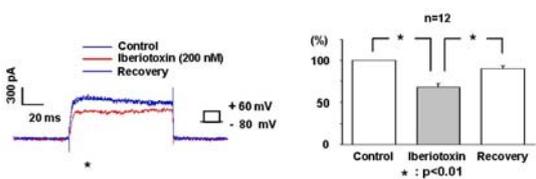


図 5: マウスの glomus 細胞で観察される voltage-gated K^+ current への iberiotoxin の影響



そしてこの voltage-gated K^+ current は低酸素負荷 (酸素濃度 10%) や ACh の暴露により可逆的に抑制された。DBA/2J 系および A/J 系マウスの voltage-gated K^+ current の特徴について比較検討したところ、以下のことが判明した。1) voltage-gated K^+ current の大きさに差は認められなかった (図 6), 2) 低酸素負荷により反応を示す glomus 細胞の割合は A/J 系マウスと比較して DBA/2J 系マウスで有意に多かった (図 7), 3) ACh に反応を示す glomus 細胞の割合は A/J 系マウスと比較して DBA/2J 系マウスで有意に多かった (図 8)。

図 6: voltage-gated K^+ current と低酸素の影響

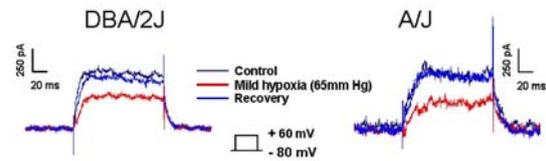


図 7: 低酸素に反応する glomus 細胞の割合

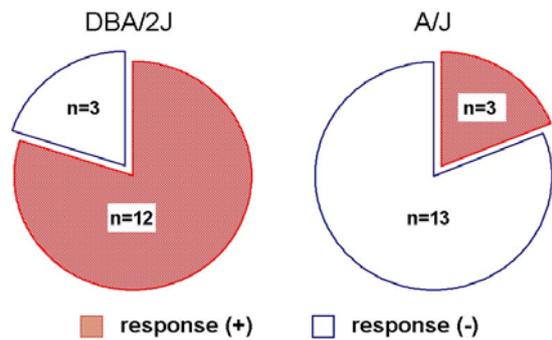
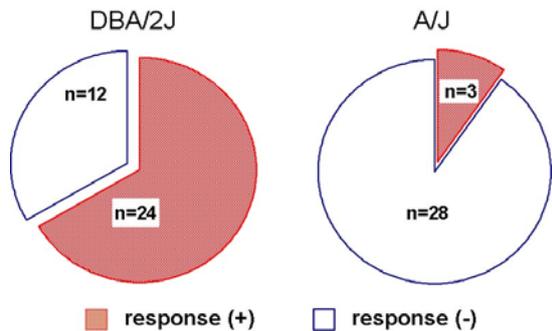


図 8: アセチルコリンに反応する glomus 細胞の割合



(3) 分子生物学的検討:
A/J と DBA/2J の glomus 細胞において、多くの oxygen-sensitive K channel のサブユニットの発現が確認された。しかし、A/J の

glomus 細胞では DBA/2J と比較して、いくつかのサブユニットの発現が減少していた (図 9)。

図 9 : glomus 細胞における K channel サブユニットの発現

Gene description	Δ CT (n=3 sets)	
	DBA/2J	A/J
Kv1.2	4.28	3.74
Kv1.5	8.22	9.38
Kv2.1	3.34	3.91
Kv3.4	4.54	5.75
Kv4.3	6.68	6.93
BK α	4.55	5.72
BK β 1	5.76	6.22
BK β 2	3.37	6.81
BK β 4	5.26	4.61

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 12 件)

- 1) Takiguchi T, Yamaguchi S, et al. Measurement of shift of the cauda equina in the subarachnoid space by changing position. Regional Anesthesia and Pain Medicine 34: in press: 2009, 査読 (有)
- 2) Kaneko M, Yamaguchi S, et al. Effects of landiolol on QT interval and QT dispersion during tracheal intubation using computerized measurement. Journal of Clinical Anesthesia 21: in press: 2009, 査読 (有)
- 3) Tezuka N, Yamaguchi S, et al. Assessment of QT interval and QT dispersion during electroconvulsive therapy using computerized measurements. Journal of ECT 25: in press: 2009, 査読 (有)
- 4) Yamaguchi S, Tezuka N, et al. Evaluation of QT interval and QT dispersion in patients with major depression. Anesthesiology 109: A1645: 2008, 査読 (有)
- 5) Yamaguchi S, Tezuka N, et al. Movement of the cauda equina in the subarachnoid space during the lateral decubitus position with or fully flexed legs in children. Anesthesia and Analgesia 160: S176: 2008, 査

読 (有)

- 6) Tezuka N, Yamaguchi S, et al. Assessment of QT interval and QT dispersion during electroconvulsive therapy using computerized measurements. Anesthesia and Analgesia 160: S53: 2008, 査読 (有)
- 7) Iwasaki T, Yamaguchi S, et al. Comparison of 0.25% levobupivacaine, 0.25% bupivacaine, and 0.125% bupivacaine for duration and magnitude of action in peripheral arterial blood flow induced by sympathetic block in dogs. Regional Anesthesia and Pain Medicine 32: 97-101: 2007, 査読 (有)
- 8) Iwata H, Yamaguchi S, et al. NMDA receptor 2B subunit-mediated synaptic transmission in the superficial dorsal horn of peripheral nerve-injured neuropathic mice. Brain Research 1135: 92-101: 2007, 査読 (有)
- 9) Hashizume Y, Yamaguchi S, et al. Comparison of 0.2% ropivacaine and 0.25% bupivacaine in pediatric caudal block: evaluation of postoperative pain and plasma concentration of local anesthetics. Dokkyo Journal of Medical Sciences 34: 1-6: 2007, 査読 (有)
- 10) Yamaguchi S, Furukawa T, et al. Morphological finding of the cauda equine in children during the lateral decubitus position. Anesthesia and Analgesia 104: S271: 2007, 査読 (有)
- 11) Yamaguchi S, Takiguchi T, et al. The shift of the cauda equine in children is not obvious during the lateral decubitus position. Anesthesiology 106: S367, 2007, 査読 (有)
- 12) Takasusuki T, Yamaguchi S, et al. Large-conductance, calcium-activated potassium channels control excitatory synaptic transmission in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord. FASEB Journal 21: 911: 2007, 査読 (有)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Furukawa N, Yamaguchi S, et al. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in neurons containing serotonin or GABA in the ventrolateral subdivision of the periaqueductal gray matter of the mouse, Society for Neuroscience 2009 Annual Meeting, 2008.11.16,

Washington DC, US

- 2) Takasusuki T, Yamaguchi S, et al, Altered nociceptive response and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the superficial dorsal horn of the spinal cord in serine racemase knockout mice, Society for Neuroscience 2008 Annual Meeting, 2008.11.18, Washington DC, US
- 3) Yamaguchi S, Tezuka N, et al, Evaluation of QT interval and QT dispersion in patients with major depression, American Society of Anesthesiology 2009 Annual Meeting, 2008.10.22, Orland, US
- 4) Takasusuki T, Yamaguchi S, et al, Pre- and postsynaptic mechanisms for plasticity of nociceptive processing in the spinal superficial dorsal horn of adult mice, Society for Neuroscience 2007 Annual Meeting, 2007.11.04, San Diego, US
- 5) Shinozaki M, Yamaguchi S, et al, Sympathectomy with radiofrequency thermocoagulation induces significant increase of peripheral artery blood flow compared with sympathetic block with mepivacaine in dogs, European Society of Regional Anesthesia & Pain Therapy, 2007.09.14, Valencia, Spain

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 重樹 (YAMAGUCHI SHIGEKI)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50306198

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし