

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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592202

研究課題名（和文）高血圧モデル動物の特殊臓性知覚系に関する分子組織学的研究

研究課題名（英文）Morphological studies on the chemoreceptors of spontaneously hypertensive rats (SHR).

研究代表者

松田 秀樹 (MATSUDA HIDEKI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：80305458

研究成果の概要（和文）：高血圧モデル動物の頸動脈小体（血液中の酸素と炭酸ガス濃度を感知する頸動脈分岐部に存在する化学受容器）は、正常血圧動物に比べ伸張・扁平化し有意に肥大する。頸動脈小体内の血管拡張は著明ではなく、血管周囲組織の増加が認められた。頸動脈小体は低酸素暴露動物でも肥大するが、その場合は血管拡張が著明であり、肥大のメカニズムは異なることが確認された。高血圧動物の化学受容細胞ではノルアドレナリン（神経伝達物質）合成能が増強していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The carotid bodies, which are located at the carotid bifurcation and are the primary chemoreceptive organs for sensing changes in arterial blood gases, became significantly enlarged in spontaneously hypertensive rats (SHR). In spite of enlargement, there was no obvious vascular enlargement in SHR. SHR showed a significant increase in extracellular matrix in the carotid body. These results indicate that the mechanism of carotid body enlargement in SHR is different from that in hypoxic animals. In addition, the present studies suggest facilitated noradrenaline biosynthesis in chemoreceptor cells of carotid bodies in SHR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：高血圧、低酸素、化学受容器、特殊臓性知覚、組織化学

1. 研究開始当初の背景

慢性低酸素暴露により呼吸および循環の生理動態にさまざまな変化が生じることが知られている。その変化は動脈血中酸素・二酸

化炭素濃度の特殊臓性知覚系（動脈系化学受容器）である頸動脈小体に顕著に現れ、形態学および生理学的研究の成果は多数報告されている。我々はこれまでに、慢性低酸素暴

露による頸動脈小体の形態的变化を多数報告してきた。まず頸動脈小体内の神経ペプチドの分布の変化を報告した (Brain Res., 1998, Adv. Exp. Med. Biol., 2000-1, 2)。さらに、炭酸ガス濃度の異なる低酸素状態 (Hypocapnic, Isocapnic, Hypercapnic hypoxia) に対する神経ペプチドの変化を検討するとともに (Histol. Histopathol., 2002, Adv. Exp. Med. Biol., 2003, Adv. Exp. Med. Biol., 2006-1)、神経ペプチドのみならず、化学受容細胞の感受性に影響を及ぼすと考えられている NO やカルシウム結合蛋白 (Calbindin D-28k) の変化を観察した (Brain Res., 1998, Histol. Histopathol., 2000, Adv. Exp. Med. Biol., 2003)。一方、低酸素暴露のみならず、暴露解除後の経時的变化をも観察した (Histol. Histopathol., 2003, Histol. Histopathol., 2004, Adv. Exp. Med. Biol., 2006-2)。これらの報告と同時に、上気道粘膜内の神経マーカーの分布も低酸素暴露によって変化することを報告してきた (Brain Res. Bull., 1998, Histol. Histopathol., 1999, Histochem Cell Biol., 2000, Histol. Histopathol., 2000)。また、頸動脈小体に加え、本来の化学受容器である舌味蕾と喉頭味蕾においても、慢性低酸素暴露による Calbindin D-28k の分布の変化を報告した (Histol. Histopathol., 2006)。これらの所見は特殊臓性知覚系および一般臓性知覚系に存在する神経マーカーが低酸素環境という外界の変化に順応することを示唆しており、我々のこれまでの研究成果は、臓性知覚機構における「構造-機能連関」の解明、さらには神経の可塑性の探究に大きく寄与するものと思われる。

高血圧自然発症ラット (SHR) は生後6週以降高血圧を発症し心血管系に形態学的・生理学的変化を生じるモデル動物である。SHR の頸動脈小体は生後8週以降に肥大し、慢性低酸素暴露ラットの頸動脈小体に極めて類似した形態を示す。しかし SHR の頸動脈小体を対象とした、神経マーカーの形態学的検討はほとんどなされていなかった。本研究課題では、低酸素環境下の化学受容器を対象に行ってきた様々な検討を、新たに高血圧自然発症動物を対象として行なったものであり、様々な角度から比較検討を加えることにより、頸動脈小体肥大のメカニズム解明のための一助を得ることができたと考える。

外因性環境変化 (低酸素環境下) と内因性環境変化 (高血圧) の両面から詳細な検討を加えた本研究課題の成果は、化学受容に対する生体内外からの影響の解明、さらには循環器系と呼吸器系疾患の関連性の解明に寄与すると思われる。

2. 研究の目的

動脈血の酸素および炭酸ガス分圧ならびに水素イオン濃度を感受する頸動脈小体は、慢性低酸素暴露により拡張する。頸動脈小体は主に血管の拡張を伴い肥大し、化学受容細胞は過形成を示す。しかしながら、前述のごとく肥大のメカニズムは明らかではない部分が多い。一方、高血圧動物でも頸動脈小体が肥大すると言われているが、組織計測を行なうなどの詳細な報告がなされるに至っていない。本研究課題の目的は、以下に示す 4 項目に要約される。

(1) まず、高血圧自然発症ラット (SHR) の頸動脈小体を組織計測するとともに、チロシン水酸化酵素 (TH) に対する抗体で免疫染色後に三次元構築プログラムを使用し、コンピュータ上で立体再構築した。頸動脈小体内血管の径に関する組織計測した (実験 1 : SHR 頸動脈小体の組織計測ならびに三次元構築)。

(2) さらに、ペプチド性神経線維の分布を調べ、低酸素暴露により肥大したラット頸動脈小体の形態学的特徴と比較検討した (実験 2 : SHR 頸動脈小体における各種神経ペプチドの免疫組織化学的検討)。

(3) 本研究課題で使用した高血圧自然発症ラット (SHR) は、生後6週以降に高血圧を発症し、心臓血管系に形態学的・生理学的変化を生じる実験モデルである。異なる病理学的状況、外因性環境変化 (低酸素環境下) と内因性環境変化 (高血圧)、における頸動脈小体の形態学的特徴を比較することで肥大のメカニズムの一端を解明するための手がかりを得ようとした。さらに、臓性知覚系である動脈系化学受容器・頸動脈小体に加え、体性知覚系である舌味蕾 (本来の化学受容器) を対象にカルシウム結合タンパクの局在を免疫組織化学的に検討し、総合的考察の一助とした (実験 3 : 舌味蕾におけるカルシウム結合タンパクの免疫組織化学的検討)。

(4) 頸動脈小体に存在する化学受容細胞はドーパミンやノルアドレナリンを合成し、刺激受容を抑制的に制御している。低酸素暴露ラットでは、カテコラミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) やノルアドレナリン合成酵素であるドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) が増強するという報告がある。さらに、高血圧ラットでは低酸素暴露ラットと同様に、低酸素に対する頸動脈小体の化学受容応答が増強することも報告されている。従って、高血圧ラットでも低酸素暴露ラットと同様な変化が起きている可能性が考えられる。そこで、高血圧症の病態モデルである高血圧自然発症ラット (SHR) の頸動脈小体でチロシン水酸化酵素 (TH) とドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) の発現についても検討を加えた (実験 4 : 頸動脈小体におけるチロシ

ン水酸化酵素 TH とドーパミンβ水酸化酵素 DBH の免疫組織化学的検討)。

この様に、本研究科課題は高血圧症動物と低酸素暴露動物の化学受容器の基本構築を比較することで、呼吸・循環器系との関わりにおいて高地トレーニングにおける最新の基礎データを提供することを目的として行なわれた。

3. 研究の方法

上記の研究目的に対応するために、下記の実験1から実験4を行った。

(1) 実験1：高血圧ラット (SHR) と対照ラット Wistar-Kyoto strain (WKY)、Normotensive Wistar rat (NWR) を常法に従い灌流固定後、頸動脈小体を採取し 16 μm のクリオスタット切片を作成した。HE 染色後、500 倍に拡大したモニター上で頸動脈小体の長径と短径、および小体内血管の短径を組織計測した (ARGUS 100)。頸動脈小体内血管の径に関しても組織計測した。チロシン水酸化酵素 (TH) に対する抗体で免疫染色後に三次元構築プログラムを用いてコンピューター上で立体再構築し、頸動脈小体の総容積を計測した。

(2) 実験2：実験1で作成したクリオスタット切片を PAP 法にて各種神経ペプチドの免疫染色を行なった。一次抗体には、anti-SP (Cambridge Res. Biochem., 1:2000)、anti-CGRP (Cambridge Res. Biochem., 1:1500)、anti-NPY (Incstar, 1:1500) および anti-VIP (Incstar, 1:1500) を用いた。対照試験として吸収試験を行なった。単位面積 (10⁴ μm²) 当たりの varicosity 数を測定し (ARGUS 100)、SHR と WKY 間で比較検討した。

(3) 実験3：実験1で作成したクリオスタット切片を PAP 法にてカルシウム結合タンパクの免疫染色を行なった。一次抗体には、anti-calbindin D-28k (Chemicon., 1:1000) を用いた。対照試験として吸収試験を行なった。陽性反応を SHR と WKY 間で比較検討した。

(4) 実験4：高血圧ラット (SHR) と対照ラット Wistar-Kyoto strain (WKY)、を常法に従い灌流固定後、頸動脈小体を採取し 8 μm のクリオスタット連続切片を作成した。頸動脈小体の形態変化を確認するため、HE 染色およびチロシン水酸化酵素 (TH) に対する抗体 (anti-TH, Chemicon., 1:1000) を用いて免疫染色を行なった。また、頸動脈小体におけるドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) の発現変化を調べるために、DBH に対する抗体 (anti-DBH, Chemicon., 1:1000) と化学受容細胞のマーカータンパク質であるシナプソトフィジンに対する抗体 (Frontier Sci., 1:1000) を用いて二重免疫蛍光染色を行なった。免疫染色後、画像解析ソフトを用いて化

学受容細胞における DBH 免疫反応性をグレースケール (256 階調：黒=0、白=255) により数値化した。さらに、化学受容細胞内の DBH 陽性線維の分布を検討するために、画像解析により単位面積当たりにおける DBH 陽性神経線維の割合を計測した。

4. 研究成果

実験1から実験4の結果を要約する。

(1) 実験1：1) HE 染色像で比較すると、SHR の頸動脈小体は頸動脈小体は内頸動脈に沿って伸張・扁平化する傾向を示し、NWR および WKY に比べ長径で約 1.3 倍 ($P < 0.05$) 大きかった (図1)。三次元構築像でより明瞭に確認することが出来た (図2)。SHR の頸動脈小体の総容積 (0.048 ± 0.003mm³) は WKY の頸動脈小体の総容積 (0.032 ± 0.006mm³) に比較して有意に増加した ($P < 0.05$)。2) SHR の頸動脈小体は肥大しているが、小体内には拡張した血管の割合は低く、その割合は NWR と WKY に比べて大きな差は認められなかった (図3)。細胞外基質が増加する傾向を示した。

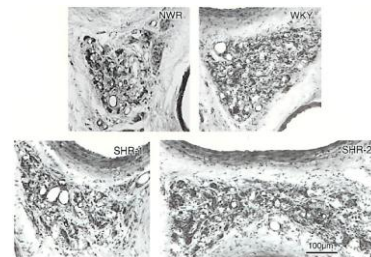


図1. SHR、WKY および NWR の頸動脈小体の HE 染色像。

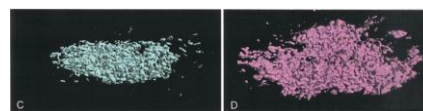


図2. SHR、WKY および NWR の頸動脈小体の立体構築像。

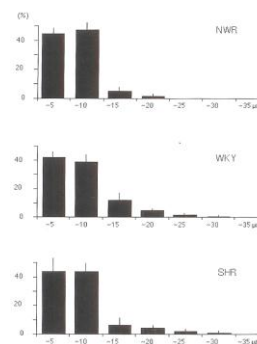


図3. SHR、WKY および NWR の頸動脈小体内の血管分布

(2) 実験2：SHR 頸動脈小体内の SP、CGRP および NPY 線維は、血管周囲および glomus

cells 間に認められ、その分布様式および密度は NWR と WKY と同様であったが、VIP 線維は低かった (図 4)。これらの結果をもとに頸動脈小体の肥大機序を比較してみると、低酸素暴露ラットの頸動脈小体肥大には、VIP による血管拡張がその一因と推察されるが、SHR の頸動脈小体肥大には、VIP による血管拡張は無関係であると思われる。SHR における VIP 線維密度の減少に関しては、VIP の低濃度投与が化学受容に対する神経活動を低下させるという報告を考慮すると、VIP 線維の減少は神経活動低下を抑制することになり、結果として頸動脈小体の化学受容への感受性を高めることになるのであろう。すなわち、SHR 頸動脈小体における肥大のメカニズムはこれまでに報告されている低酸素暴露ラットの頸動脈小体の肥大メカニズムとは異なるものと考えられる。

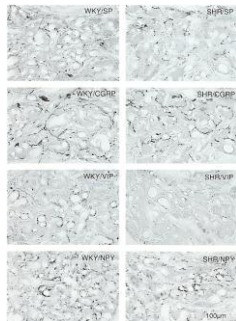


図 4. SHR および WKY の頸動脈小体に分布するペプチド性神経線維の分布.

(3) 実験 3 : Calbindin D-28k 免疫陽性反応は、上皮内の味蕾細胞および固有層に認められた。SHR の味蕾における Calbindin D-28k 陽性線維は WKY に比べ多く、固有層における Calbindin D-28k 陽性線維は WKY に比べ少なかった (図 5)。SHR では NaCl に対する感受性が低下しているという報告がある。この点を勘案すると、SHR の味蕾細胞における Calbindin D-28k の増加と固有層における陽性線維の減少は、求心性線維を介した味覚感受性の低下により、末梢受容器レベルにおける体内の電解質の恒常性維持のための適応であろうと推察する。

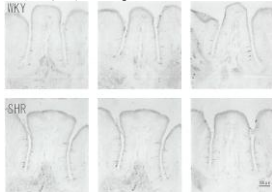


図 5. SHR (下段) および WKY ラット (上段) の舌・有郭乳頭に認められる Calbindin D-28k 免疫陽性神経線維.

(4) 実験 4 : 実験 1 で確認されたように、SHR の頸動脈小体は内頸動脈に沿って肥大し

ており、チロシン水酸化酵素 (TH) の免疫反応性は SHR と WKY の頸動脈小体において化学受容細胞とその周囲の神経線維に認められ、両者間には大きな差は認められなかった。一方、ドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) の免疫反応性に関しては、WKY では、主に血管周囲に陽性線維の分布が見られたが、DBH 陽性の化学受容細胞はほとんど認められなかった。SHR では WKY に比べ DBH 陽性神経線維は減少するが、DBH 陽性の化学受容細胞の数は増加した (図 6)。化学受容細胞で DBH の発現が増強することから、高血圧状態においては低酸素環境とは無関係に化学受容細胞における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。ノルアドレナリンは頸動脈小体の興奮を抑制することが報告され、さらに、SHR の正常酸素濃度環境における頸動脈小体の感覚神経応答および分時換気量は正常血圧動物と変わらないという報告を勘案すると、正常酸素濃度環境における SHR では、頸動脈小体の興奮はノルアドレナリンによって抑制的に調節されている可能性が考えられる。

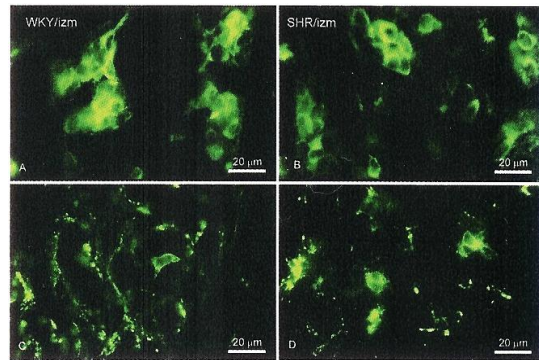


図 6. SHR および WKY の頸動脈小体の TH と DBH 免疫蛍光染色像

高血圧は致命的疾患の最も重要視すべきリスクファクターであり、その治療には薬物療法と非薬物療法がある。非薬物療法の中で、スポーツは大きな意味を持ち、高血圧の運動療法を考える際に、スポーツと降圧効果の関連について考慮しなければならないが、本研究課題の成果は、高地トレーニングとの関わりのみならず、広くスポーツとの関わりにおいて、基礎データを提供し得たものと考えられる。

本研究課題を行なうに当たり、文部科学省科学研究費 (基盤研究 C) の援助を受けたことに対し感謝の意を表す。

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 10 件)

- ① K. Kato, J. Wakai, H. Matsuda, T. Kusakabe, Y. Yamamoto: Total volume of caroti body and dopamine β -hydroxylase immunoreactivity of glomus cells in spontaneously hypertensive rats., *Histol. Histopathol.*, (in press, 2012). (査読・有)
- ② M. Komatsu, M. Tsukuda, H. Matsuda, C. Horiuchi: Comparison of concurrent chemoradiotherapy versus induction chemotherapy followed by radiation in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.*, 32:681-686, 2012. (査読・有)
- ③ M. Takahashi, H. Matsuda, Y. Hayashida, Y. Yamamoto, M. Tsukuda, T. Kusakabe: Morphological characteristics and peptidergic innervation in the carotid body of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Histol. Histopathol.*, 26:369-375, 2011. (査読・有)
- ④ M. Mori, M. Tsukuda, H. Matsuda, C. Horiuchi, T. Taguchi, M. Takahashi, G. Nishimura, M. Komatsu, T. Niho, N. Sakuma, A. Miyakoshi, Y. Isono, S. Iwahana: Efficacy and toxicity of concurrent chemoradiotherapy in patients with advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 68:855-862, 2011. (査読・有)
- ⑤ M. Mori, M. Tsukuda, C. Horiuchi, H. Matsuda, T. Taguchi, M. Takahashi, G. Nishimura, M. Komatsu, T. Niho, N. Sakuma, K. Shibata, S. Sugisaki: Efficacy of fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography to evaluate responses to concurrent chemoradiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 38:724-729, 2011 (査読・有)
- ⑥ T. Kusakabe: The amphibian carotid labyrinth. In: Structure, evolution and function of airway chemoreceptors in the vertebrates. G. Zaccane, et al. (eds). Plymouth UK., pp.125-139, 2010. (査読・有)
- ⑦ N. Kondo, M. Tsukuda, M. Kimura, K. Fujita, A. Sakakibara, M. Takahashi, Y. Ishiguro, G. Toth, H. Matsuda: Antitumor effects of telomelysin in combination with paclitaxel or cisplatin on head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 23: 355-363, 2010. (査読・有)
- ⑧ M. Tsukuda, J. Ishitoya, H. Matsuda, C. Horiuchi, T. Taguchi, M. Takahashi, G.

- Nishimura, M. Kawakami, M. Watanabe, T. Niho, T. Kawano, Y. Ikeda, Y. Sakuma, O. Shiono, M. Komatsu: Randomized controlled phase II comparison study of concurrent chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil versus CCRT with cisplatin, 5-fluorouracil, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 66:729-736, 2010. (査読・有)
- ⑨ T. Kamimura, K. Yoshioka, S. Ito, T. Kusakabe: Increased rate of force development of elbow flexors by antagonist conditioning contraction. *Hum. Mov. Sci.*, 28: 407-414, 2009. (査読・有)
- ⑩ G. Nishimura, M. Tsukuda, M. Mikami, H. Matsuda, C. Horiuchi, T. Taguchi, M. Takahashi, M. Kawakami, M. Watanabe, T. Niho, H. Abo, S. Yamamoto: Efficacy of concurrent chemoradiotherapy for T1 and T2 laryngeal squamous cell carcinoma regarding organ preservation. *Anticancer Res.*, 29: 661-666, 2009. (査読・有)

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 目下部 辰三、高橋 優宏、松田 秀樹、加藤 剛、山本 欣郎、林田 嘉朗: 動脈系化学受容器の内因性および外因性環境変化に対する適応、第 88 回日本生理学会、横浜、2011. 3.
- ② 林田 嘉朗、松田 秀樹、山本 欣郎、川上 倫、竹中 敏文、目下部 辰三: 舌・化学受容器に対する内因性および外因性環境変化の影響、第 116 回日本解剖学会、横浜、2011. 3.
- ③ 加藤 剛、目下部 辰三、松田 秀樹、山口-山田 美鈴、林田 嘉朗、山本 欣郎: 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 116 回日本解剖学会、横浜、2011. 3.
- ④ 横山 拓也、松田 秀樹、目下部 辰三、山田 美鈴、山本 欣郎: 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、東京、2011. 3.
- ⑤ 松田 秀樹、林田 嘉朗、川上 倫、竹中 敏文、目下部 辰三: 低酸素暴露および高血圧による頸動脈小体肥大の比較、第 115 回日本解剖学会、盛岡、2010. 3.
- ⑥ 松田 秀樹、林田 嘉朗、川上 倫、竹中 敏文、目下部 辰三: 高血圧自然発症ラット (SHR) の舌味蕾における calbindin D-28k 免疫活性、第 114 回日本解剖学会、岡山、2009. 3.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 秀樹 (MATSUDA HIDEKI)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：80305458

(2) 研究分担者

日下部 辰三 (KUSAKABE TATSUMI)
国土館大学・体育学部・教授
研究者番号：80117663