

令和 6 年 4 月 1 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05953

研究課題名（和文）頸動脈小体の感覚性長期増強反応および低酸素適応反応におけるシナプス可塑性の役割

研究課題名（英文）Role of synaptic plasticity in sensory long-term facilitation and/or depression caused after hypoxic adaptation responses in 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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：頸動脈小体におけるシナプス長期増強機構を検討するために、モデル動物の作成、電子顕微鏡的検索法の確立を行った。また、シナプス調節タンパク質の発現解析では、CAMK2 および、ERK1/2、CB1などのシナプス調節タンパクの感覚神経終末における局在を示し、頸動脈小体における感覚性のシナプス長期増強・長期抑制は感覚神経終末に存在するシナプス調節機構が重要な役割を担う可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

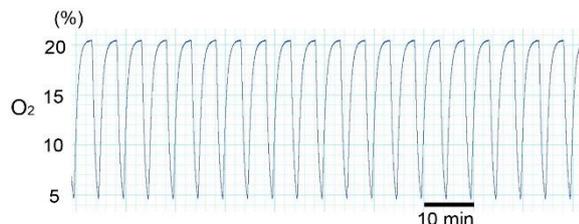
血中低酸素を受容する動脈性化学受容器である頸動脈小体におけるシナプスの長期増強の実験モデル、電子顕微鏡によるシナプス解析法を確立した。また、シナプス調節タンパクの検索により、臓器内の感覚神経終末におけるリン酸化酵素が、シナプス長期増強に関与することを示唆した。中枢神経系ではよく知られるシナプスの長期増強または長期抑制が末梢組織でも生じ、感覚強度の調節をしている可能性がある。このことは、末梢神経系における感覚調節、個体の適応反応に重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the mechanism of sensory long-term facilitation (sLTF) in the carotid body, we created model animals and established an electron microscopic method. In addition, expression analysis of synaptic regulatory proteins showed the localization of synaptic regulatory proteins such as CAMK2 and , ERK1/2, and CB1 in sensory nerve endings, suggesting that synaptic regulatory mechanisms in sensory nerve endings may play an important role in the long-term potentiation and inhibition of sensory synapses in the carotid bodies.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：頸動脈小体 低酸素 シナプス可塑性 ラット

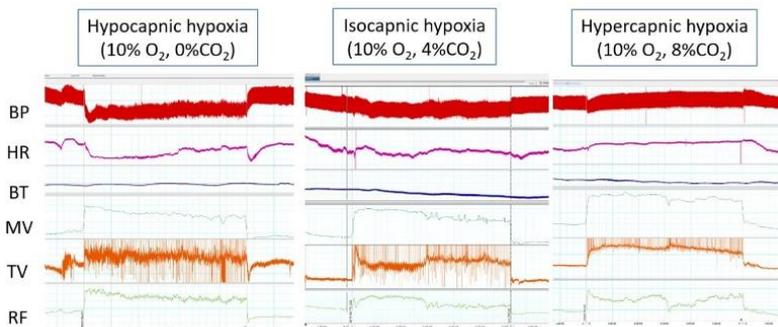
右図はチャンバー内の酸素濃度の変化を示した図で、5分あたりに1回酸素濃度が5%に達し、20%に回復する変化を繰り返していることがわかる。このことにより、慢性間歇低酸素曝露実験を確実に行うことが可能となった。



②低酸素および二酸化炭素に対する心血管系パラメーターの基本的変動

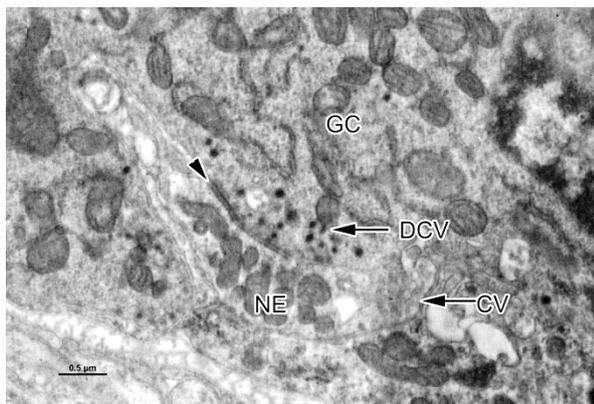
持続的低酸素刺激（10% O₂, 2時間）に対する血圧（BP）、心拍数（HR）、分時呼吸量（MV）、一回換気量（TV）、分時呼吸回数（RF）を記録したところ、二酸化炭素濃度により反応が異なることがわかった。低酸素刺激により、血圧の低下、心拍数の一次低下、分時呼吸量と呼吸回数の増加が認められるが、4%CO₂の付加

により、血圧低下は軽減し、8%CO₂ではむしろ増加することがわかった。また、心拍数の変化も血圧同様に8%CO₂では刺激直後の一過性の現象のみ認められ、増加傾向にあった。呼吸は分時呼吸量と一回換気量はCO₂濃度に依存して増加し、呼吸回数は減少した。これらの変化は、間歇低酸素刺激によっても同様の変化が認められた。これらのことから、心血管系は低酸素のみではなく高二酸化炭素の影響を強く受けることが明らかになったが、心血管とも大きな変化が認められた二酸化炭素を付加しない条件で実験を行うこととした。

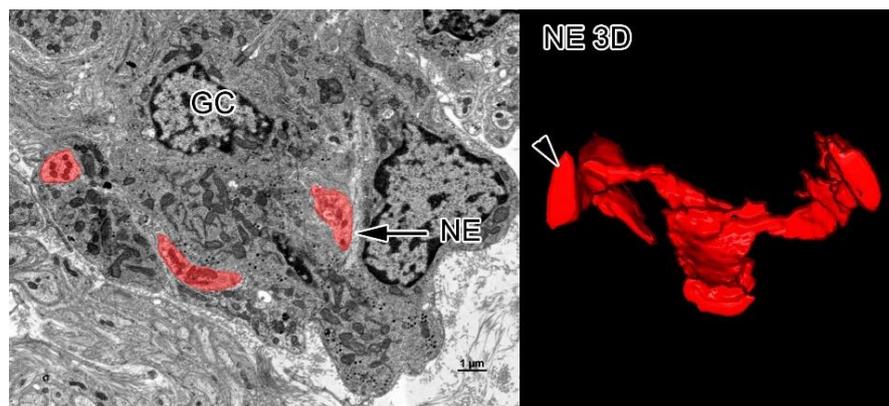


(2) シナプスの電子顕微鏡的解析

電子顕微鏡により、頸動脈小体の化学受容細胞と感覚神経終末間、化学受容細胞間のシナプスを確認した。右図は化学受容細胞（GC）と感覚神経終末（NE）間のシナプス（矢頭）を示す。化学受容細胞には有芯小胞（DCV）が認められるが、芯なし小胞も確認できた。また神経終末側には芯なし小胞（CV）が確認できた。GCのDCVはカテコラミン、CVはATP、NEのCVはグルタミン酸を含む分泌小胞であることが予測された。



さらに、終末の立体構造を追及するために、連続切片を用いた立体再構築を試みた。50枚の連続超薄切片上の神経終末から終末の立体像を構築した。技術的には喉頭蓋粘膜や頸動脈洞の神経終末の立体再構築に用いた手法を応用した。下図の矢頭が神経終末に向かう軸索であるが、軸索から枝分かれした神経終末が扁平になり、化学受容細胞を覆うのが認められた。一方で、頸動脈小体の組織内は予想以上に細胞膜の入り組んだ領域で、十分に立体構築を行うことが出来ず、モデル動物での解析は行うことが出来なかった。今後の検討が必要である。

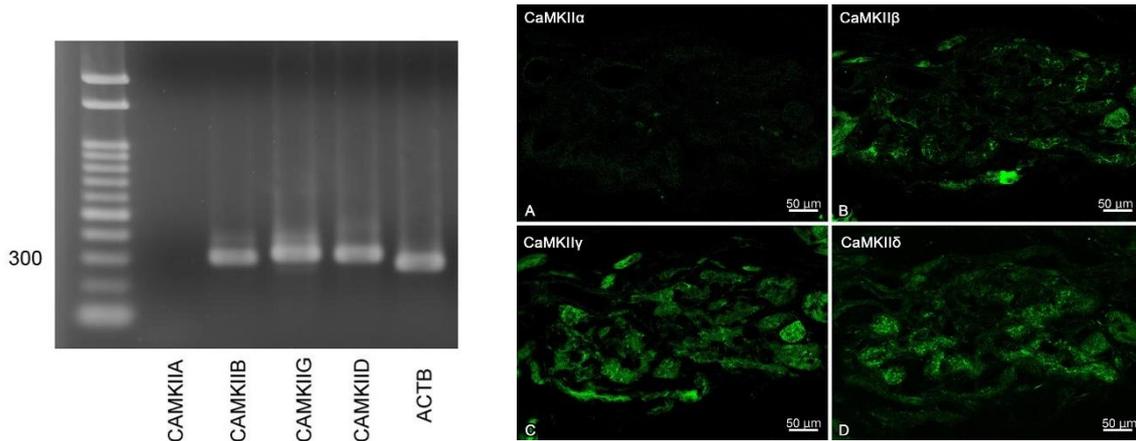


(3) シナプス調節タンパク質の発現解析

①カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ 2 (CAMK2)

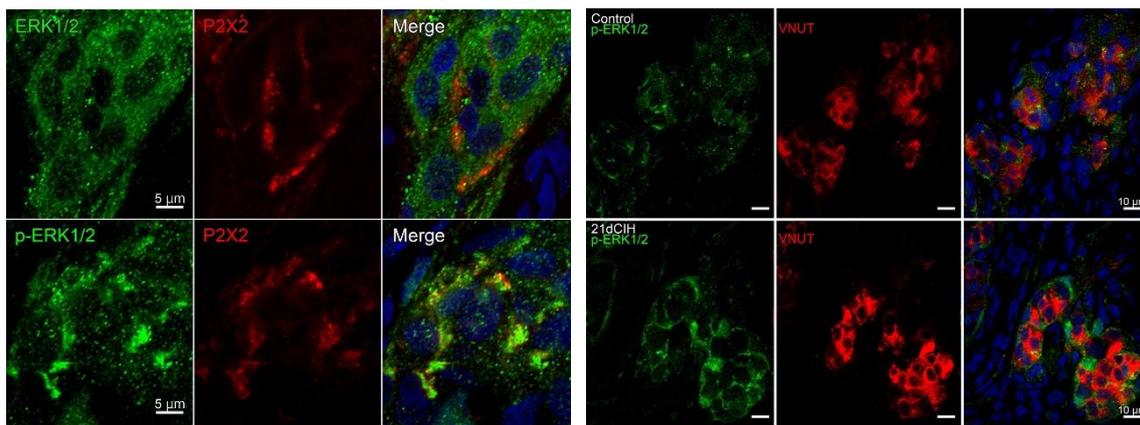
CAMK2 の α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種のサブユニットの発現を調べたところ、RT-PCR 法により頸動脈小体には α 以外のサブユニットが発現していることが明らかになった（下左図：CAMKIIA が α サブユニットの mRNA、ACTB はハウスキーピング遺伝子の β アクチン）。同様に感覚神経終末の起始細胞が存在する舌咽神経遠位神経節においては、全てのサブユニットの mRNA が発現していた。

さらに、免疫組織学により組織内分布を検索したところ、 α サブユニットでは反応は認められず、 β サブユニットでは感覚神経終末、 γ サブユニットでは感覚神経終末および化学受容細胞、 δ サブユニットでは化学受容細胞に陽性反応が認められた。化学受容細胞には γ および δ サブユニット、感覚神経終末には β および γ サブユニットが認められたことから、化学受容細胞および感覚神経終末において CAMK2 によるシナプス調節が行われている可能性があることがわかった。



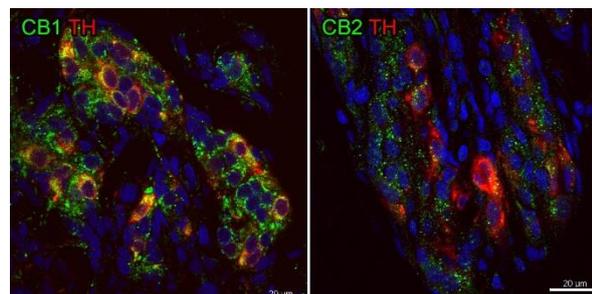
②細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2 (ERK1/2)

ERK1 と ERK2 の双方を標識する抗体を用いて、頸動脈小体の組織内分布を検索したところ、化学受容細胞と感覚神経終末の双方に中等度のドット上の陽性反応が認められた（下左図上段、P2X2 は ATP 受容体で感覚神経終末を標識する）。リン酸化抗体では、化学受容細胞の反応性は感覚神経終末を強く標識した（下左図下段）。さらに、慢性間歇低酸素曝露モデルラット（21 日曝露）では、コントロールと比較して感覚神経終末における陽性反応の蛍光強度が著しく増強するとともに陽性面積が拡大した（下右図下段）。このことから、ERK は神経終末において高い酵素活性を発現し、長期増強等のシナプス可塑性に関与していることが示唆された。



③カンナビノイド受容体 1/2 (CB1、CB2)

CB1 は頸動脈小体の化学受容細胞および感覚神経終末に、CB2 は化学受容細胞に免疫組織化学的分布が認められた。頸動脈小体における内因性カンナビノイドの挙動は不明であるが、カンナビノイド調節系がシナプス可塑性の一端を担う可能性がある。



(4) まとめ

本研究では、頸動脈小体のシナプス可塑性の発現機構を検索するためのツールとして、モデルラットの作製装置を開発し、電子顕微鏡連続切片を用いた立体再構築による解析法を提案した。また、頸動脈小体における可塑性の発現機構に CAMK2 β および γ 、ERK1/2、CB1 などのシナプス調節タンパクの感覚神経終末における局在を示し、感覚神経終末においてシナプス調節機構が存在することを示唆した。頸動脈小体の感覚神経終末は、化学受容細胞からの ATP を受容する P2X 型 ATP 受容体が発現し、グルタミン酸の小胞放出を行っていることが知られている。このことから、慢性間歇低酸素曝露による感覚活動の増強は、頸動脈小体内で生じる ATP 受容体の発現増強による化学受容細胞から感覚神経終末に向けた信号伝達の増強、感覚神経終末におけるグルタミン酸含有分泌小胞のプール形成とその解除を介したグルタミン酸放出調節に起因すると予測される。すなわち、頸動脈小体における感覚性のシナプス長期増強・長期抑制は感覚神経終末に存在するシナプス調節機構が重要な役割を担う可能性が高い。

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 Saito, H., Yokoyama T., Nakamuta, N. Yamamoto, Y.	4. 巻 125
2. 論文標題 Immunohistochemical distribution of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II subunits in the rat carotid body	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Histochem.	6. 最初と最後の頁 152043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.acthis.2023.152043	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 Kato Kouki, Morinaga Ryosuke, Yokoyama Takuya, Fushuku Seigo, Wakai Jun, Nakamuta Nobuaki, Yamamoto Yoshio	4. 巻 300
2. 論文標題 Effects of CO ₂ 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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤優気, 横山拓矢, 中牟田信明, 山本欣郎
2. 発表標題 ラット頸動脈小体におけるシナプシンの免疫組織化学的分布
3. 学会等名 日本解剖学会 第69回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤優気, 横山拓矢, 中牟田信明, 山本欣郎
2. 発表標題 ラット頸動脈小体における CB1カンナビノイド受容体の分布
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本欣郎、横山拓矢、中牟田信明
2. 発表標題 ラット喉頭蓋における上皮内神経終末の微細構造
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本欣郎、佐々木邦明、小室岬、横山拓矢、中牟田信明
2. 発表標題 ラット喉頭蓋に分布する葉状神経終末の微細構造
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 (Web開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斎藤優気、中牟田信明、山本欣郎
2. 発表標題 ラット頸動脈小体におけるExtracellular signal-Regulated kinases (ERK1, ERK2)の分布
3. 学会等名 第68回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会, (札幌・ハイブリッド)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本欣郎、村上侑亮、佐々木邦明、小室岬、Abdali Sayed Scharif、横山拓矢、中牟田信明
2. 発表標題 ラット頸動脈洞における感覚神経終末の微細構造
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 (仙台)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤優気、中牟田信明、山本欣郎
2. 発表標題 慢性間歇低酸素刺激によるラット頸動脈小体におけるリン酸化ERK1/2の変化
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会（仙台）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本欣郎、齋藤優気、横山拓矢、中牟田信明
2. 発表標題 ラットSIF細胞におけるVNUT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 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

〔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
---------	---------