

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 7 日現在

機関番号：32616

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350823

研究課題名(和文) 高地トレーニングに関する基礎研究：化学受容器における神経伝達物質の分子機構

研究課題名(英文) Basic study on high-altitude training: Molecular mechanisms of neurotransmitters in arterial chemoreceptor

研究代表者

日下部 辰三 (KUSAKABE, TATSUMI)

国土館大学・体育学部・教授

研究者番号：80117663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 高血圧ラット(SHR)の頰動脈小体(CB)は、正常圧ラット(WKY, NWR)に比べ肥大していた。チロシン水酸化酵素(TH)とドーパミン水酸化酵素の免疫活性は、SHRの化学受容細胞で高く、CB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。セロトニン(5-HT)は、化学受容細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)に影響を与えなかったが、低酸素暴露ラットでは上昇し、5-HTにより増強された。これらの結果は、5-HTが低酸素感受性を高めることを示す。一方、5-HTは細動脈平滑筋の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>に影響を及ぼさなかったが、毛細血管の周皮細胞では増加させ、阻害剤で抑制された。

研究成果の概要(英文)： The carotid body(CB) of hypertensive rat (SHR) was enlarged in the reconstructed images compared with that of normotensive rat (WKY). Immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine -hydroxylase (DBH) in CB was mainly observed in chemoreceptor cells, and the number of chemoreceptor cells with strong DBH immunoreactivity was increased in SHR. The present results suggested that the signal transduction from CB is regulated by noradrenaline in chemoreceptor cells under hypertensive conditions. 5-HT did not change intracellular Ca<sup>2+</sup> [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in chemoreceptor cells, whereas induced repetitive [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases during hypoxia. The frequency of hypoxia-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes was enhanced in the response of 5-HT. These results suggest that 5-HT may increase its own hypoxic chemosensitivity. 5-HT did not change [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in arteriole smooth muscle cells. However, 5-HT induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases in pericytes in capillary.

研究分野：総合領域

キーワード：低酸素 高血圧 化学受容器 神経伝達物質 細胞内カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

様々なスポーツ領域で高地トレーニングは盛んに行なわれるようになって来ている。高地トレーニングの目的は、低酸素環境下の高地で一定期間トレーニングすることで、体内の酸素運搬機序を高め、その結果として競技成績の向上を目指す点にある。これまでの高地トレーニングの基礎研究は、呼吸・循環器系の各種パラメーターの比較や血液分析等が主流で、呼吸・循環に関する動態変化のメカニズムに焦点を絞ったものは少なかった。我々は、血液中の酸素と炭酸ガス濃度を感受して呼吸・循環器系の調節をする器官である動脈系化学受容器(頸動脈小体)を研究対象として、特に、低酸素環境下における動態変化について、形態学的ならびに生理学的手法を駆使して、以下に示すような数多くの研究成果を報告してきた。形態学的には1) 頸動脈小体は血液中の炭酸ガス濃度に依存して小体内の血管は著しく拡張し、その結果、頸動脈小体は数倍に肥大する(Anat. Rec., 1993; Brain Res., 1998a; Histol. Histopathol., 2003, 2004, 2005; Adv. Exp. Med. Biol., 2006) 2) 頸動脈小体肥大の一因は、血管作動性ペプチド性神経線維の分布密度の変化に基づく(Brain Res., 1998a; Histol. Histopathol., 2003, 2004, 2005; Adv. Exp. Med. Biol., 2005a) 3) 高炭酸血漿の低酸素環境下(Hypercapnic hypoxia)では血管拡張率は低く、頸動脈小体の肥大率も低く、その一因は血管収縮性ペプチド神経線維の支配下にある(Histol. Histopathol., 2002) 4) 神経ペプチドの関与に加え、NO合成酵素(NOS)およびカルシウム結合タンパクも頸動脈小体内の血管動態に間接的に関与する(Brain Res., 1998b; Histol. Histopathol., 2000; Adv. Exp. Med. Biol., 2005b)等の点を明らかにした。一方、生理学的には、5) 低酸素暴露が化学受容細胞におけるカルシウムの増加と減少の両方に関与している(Adv. Exp. Med. Biol., 2000)ことを示すとともに、6) 低酸素環境下の情報伝達には細胞内セカンドメッセンジャーおよびリン脂質代謝経路が関与している可能性についても検討を加えた。最近では、7) 高血圧自然発症動物における頸動脈小体の形態学的特徴ならびに各種神経支配についても報告した(Histol. Histopathol., 2011)。

上記学術的背景に示したように、臍性知覚系である頸動脈小体の各種病理学的状況下での形態学的適応については研究成果が集積しつつある。そこで本研究課題では、外因性環境変化(低酸素環境下)と内因性環境変化(高血圧)の病理的状況下で、ノルアドレナリンおよびセロトニン等の神経伝達物質関連分子の発現機構を分子生物学的観点から解析を試みた。期待される研究成果は、高地トレーニングにおける基礎データを提供し、各種スポーツ種目における競技力向上に間接的に寄与するものである。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、低酸素環境下(高地)および高血圧状況の化学受容器における酸素および炭酸ガスの受容機構を明らかにするために計画されたものであり、循環・呼吸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に行われた。外因性環境変化(高地の低酸素環境)と内因性環境変化(高血圧)の両変化により誘発される化学受容器の動態変化について、特に、神経伝達物質関連分子の発現について分子生物学的手法を駆使して検討を行った。長年に渡り科学研究費補助金を得て進めて来た化学受容機構に関する研究の集大成とすることを目標とした。

頸動脈小体内に存在する化学受容細胞が、ノルアドレナリンやドーパミンを合成し分泌することにより各種刺激受容を抑制的に制御している。ラットを低酸素環境下で飼育すると、短時間で頸動脈小体内のカテコールアミン合成に関連する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水酸化酵素(DBH)の発現が増加する。一方、高血圧自然発症ラット(SHR)では低酸素暴露ラットと同様に、低酸素に対する応答が増強する。従って、同様な変化が起こっている可能性がある。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ならびに生理学的変化を生じる実験モデルである。高血圧自然発症ラット(SHR)を対象に、THとDBHに対する抗血清を用い免疫組織化学的に解析するとともに、THとDBHのタンパク発現について検討し、高血圧ラットの頸動脈小体でカテコールアミン合成能がどのように変化しているかを解明した(実験1:高血圧自然発症ラットの頸動脈小体化学受容細胞におけるドーパミン水酸化酵素の免疫反応性)。

さらに、頸動脈小体から入力される知覚神経が増強する際に、セロトニン(5-HT)が重要な役割を演じていることから、まず正常環境下のラットにおける5-HT合成・分泌関連分子の発現の有無を検討する目的で、5-HT合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素1、2(TPH1、TPH2)、5-HT<sub>2A</sub>受容体(5-HT<sub>2A</sub>)および5-HT輸送タンパク(SERT)の遺伝子発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって解析するとともに、5-HT、TPH1およびSERTに対する抗体を用いて免疫組織化学的にその局在を検討した(実験2:ラット頸動脈小体におけるセロトニン関連分子による調節)。

一方、化学受容細胞の低酸素応答に対する5-HTの作用を明らかにするために、細胞内カルシウム濃度の変化を興奮の指標とする生理学的検討も行った(実験3:化学受容細胞における細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の解析)。

これらの結果を総合的に検討することに

より、高地トレーニング時の化学受容機構を、特に、高血圧との関わりにおいて分析し、高地トレーニングに応用され得るような基礎的データを提供することを目標に行われた。

### 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3を行った。

(1) 実験1：高血圧自然発症ラットの頸動脈小体化学受容細胞におけるドーパミン水酸化酵素の免疫反応性

実験動物には高血圧自然発症ラット (SHR/izm、雄 16 週齢、n=3) および SHR/izm のコントロールとして対照ラット (WKY/izm、雄 16 週齢、n=3) を用いた。ネブタール麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドおよび 2%ピクリン酸を含む 0.1M リン酸緩衝液で灌流固定後、実態顕微鏡下で頸動脈分岐部を採取し、常法に従い 8 $\mu$ m 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調べるために、hematoxylin eosin (HE) 染色および tyrosine hydroxylase (TH) に対する抗体を用いた免疫染色を行った。TH 免疫染色後に、立体再構築ソフト (Delta Viewer) を用いて頸動脈小体をコンピューター上で立体再構築しその総容積を測定した。また、頸動脈小体における DBH 発現の変化を調べるために、DBH に対する抗体とグロムス細胞のマーカータンパク質であるシナプトフィジンに対する抗体を用いて二重蛍光染色を行った。染色後、画像解析ソフト (Image J) を用いてグロムス細胞における DBH 免疫反応性をグレースケールにより数値化した。さらに、頸動脈小体内の DBH 陽性神経の分布を調べるために、画像解析により単位面積当たり占有する DBH 陽性神経線維の密度を計測した。

(2) 実験2：ラット頸動脈小体におけるセロトニン関連分子による調節

実験動物には Wistar ラット (n=6) を用いた。RT-PCR では、前頸神経節および頸動脈小体から total RNA を抽出し、5-HT 合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素 1、2 (TPH1、TPH2)、5-HT<sub>2A</sub> 受容体 (5-HT<sub>2A</sub>) および 5-HT 輸送タンパク (SERT) の遺伝子発現を RT-PCR 法によって解析した。免疫組織化学的検討に際しては、ネブタール麻酔した Wistar ラット (n=6) を用い、4%パラホルムアルデヒドおよび 2%ピクリン酸を含む 0.1M リン酸緩衝液で灌流固定後、実態顕微鏡下で頸動脈分岐部を採取し、常法に従い 8 $\mu$ m のクリオスタット連続切片を作成した。5-HT、TPH-1、SERT および DBH に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

(3) 実験3：セロトニンによる化学受容細胞および平滑筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の動態  
頸動脈小体から分離した化学受容細胞および血管平滑筋細胞に、Ca<sup>2+</sup>指示薬 Fluo-4 を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡により 5-HT に対する細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の動態を解析

した。さらに、Wistar ラット (n=5) の頸部交感神経活動を電気生理学的に記録し、10%酸素負荷時の神経活動変化を定常酸素状況下 (21% 酸素) の結果と比較検討した。

### 4. 研究成果

実験1から実験3の結果を要約する。

(1) 実験1：これまでも示されている様に、高血圧自然発症ラット (SHR) では頸動脈小体は内頸動脈に沿って扁平化し (図1)、TH の免疫染色像から作成した頸動脈小体の立体再構築像は肥大拡張しており、その容積は対照ラットに比べ有意 (p<0.05) に増加した。

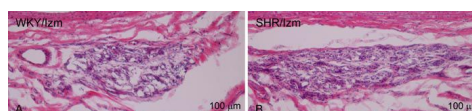


図1. WKY と SHR における頸動脈小体の比較

イムノプロット法で検討すると、高血圧ラットおよび対照ラットでは TH および DBH の染色性は類似しており、カテコールアミン合成酵素のタンパク発現量には差は認められなかった。TH の免疫染色像では、免疫陽性反応は頸動脈小体の化学受容細胞および近接する神経線維に認められ、その分布様式は高血圧ラットおよび対照ラット間で類似していた (図2)。DBH の免疫染色像では、化学受容細胞は強い陽性反応を示し、免疫陽性神経線維は主として血管周囲に認められた。DBH 免疫陽性化学受容細胞は、対照ラットに比較して高血圧ラットで有意 (p<0.05) に高い頻度で認められたが、免疫陽性神経線維の出現頻度は低かった (図2)。

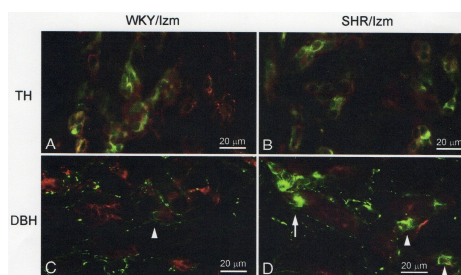


図2. WKY と SHR における TH および DBH 免疫蛍光像

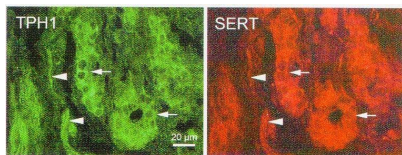
高血圧ラットに認められた DBH 強陽性化学受容細胞は細長い細胞質突起を伸ばしており、頸動脈小体内に散在していた。高血圧ラットおよび対照ラットでは、DBH 免疫陽性神経線維は血管と化学受容細胞の周囲に認められた。

本実験結果から、高血圧自然発症ラットでは頸動脈小体の容積が増加するという低酸素環境下の動物の所見と類似した特徴を示すことが明らかとなった。すなわち、頸動脈小体の容積増加が生じることで、その低酸素感受性が増加することが考えられる。また、



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下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高まっ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という薬理的報告が知られている。また、高血圧自然発症ラットの定常酸素濃度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のラットと変わらないという結果も報告されている。以上のことを勘案すると、定常酸素濃度において高血圧自然発症ラットでは、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推測される。(詳細は発表論文 6 を参照)

(2) 実験 2 : RT-PCR 法による解析では、頸動脈小体の抽出産物において TPH1 mRNA および SERT mRNA の発現が認められたが、TPH2 mRNA の発現は確認出来なかった。免疫組織化学的検索では、化学受容細胞に TPH1 および SERT に対する陽性反応が観察された(図 3)。また、血管周囲に認められる神経繊維にも TPH1 および SERT に対する陽性反応が確認された。神経線維に検出される SERT 陽性反応は、交感神経線維を標識するドーパミン水酸化酵素 (DBH) と共存していたことから、SERT 免疫陽性線維は交感神経であると考えられ、頸動脈小体に分布する交感神経線維はノルアドレナリンによる調節のみならず、5-HT による調節機構も合わせ持つことが推測された。



矢頭：神経線維 矢印：化学受容細胞

図 3. 化学受容細胞における TPH1 および SERT 免疫蛍光像

これらの結果から、頸動脈小体において化学受容細胞および交感神経線維が 5-HT を合成および分泌している可能性が示唆された。(詳細は発表論文 4 を参照)

(3) 実験 3 : 定常 21% 酸素状況下では、5-HT は化学受容細胞内のカルシウムイオン濃度に影響を与えなかった。低酸素刺激液を投与すると、同一細胞において間歇的な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められた(図 4)。

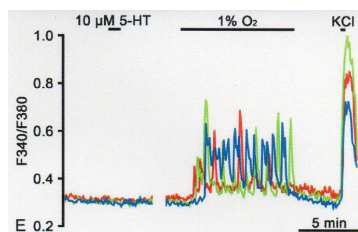


図 4. 化学受容細胞内 Ca イオン濃度に対する 5HT の影響

この上昇は 5-HT により増強し、5-HT<sub>2</sub> 受容体の阻害剤により抑制された。RT-PCR 法による検討では、頸動脈小体からの抽出産物で 5-HT<sub>2</sub> 受容体 mRNA の発現が確認された。これらの結果から、5-HT は 5-HT<sub>2</sub> 受容体を介して化学受容細胞の低酸素感受性を増強していることが推測された。

電気生理学的検討では、ラットに低酸素ガス (10% 酸素) を吸入暴露すると、頸部交感神経幹からの神経活動頻度は増加した。すなわち、低酸素状況下では頸動脈小体への交感神経系入力が増加していると考えられた。頸動脈小体内から小血管 (細動脈と毛細血管) を分離抽出した標本では、ノルアドレナリンによって細動脈平滑筋において細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇が確認されたが、5-HT では変化は認められなかった。一方、毛細血管の標本では、反応は正反対であり、5-HT<sub>2</sub> 受容体阻害剤で抑制された。以上の実験結果から、ノルアドレナリンは細動脈平滑筋に、5-HT は毛細血管周皮細胞に対して収縮性に作用していることが考えられた。毛細血管周皮細胞の収縮による血流低下で低酸素状況以下の頸動脈小体内の毛細血管血流量が低下すると、化学受容細胞の低酸素状態が持続することが予測される。すなわち、低酸素状況下で活性化した交感神経は、5-HT を介して毛細血管血流量を低下させることにより、頸動脈小体の化学受容機構を間接的に増強している可能性がある。(詳細は発表論文 2 と 4 を参照)

実験 2 および実験 3 の結果から、頸動脈小体において 5-HT は化学受容細胞および交感神経線維で合成されていることが明らかとなり、5-HT は 1) 化学受容細胞の低酸素感受性を増強すること、2) 毛細血管周皮細胞の収縮を介して血流量低下を起こすことが示唆された。この 2 つの調節機構を介して、5-HT が頸動脈小体の機能である呼吸反射の求心性活動を興奮性に調節している可能性を示した。

これまで我々が行ってきた数多くの低酸素暴露実験では低酸素環境下における末梢神経の順応を検討したものであったが、本研究課題は低酸素環境という外因性環境変化に加え、高血圧という内因性環境変化をも加味した実験系で行った点に特色があり、血圧変動に代表される循環動態の変化に対する臓性知覚系が示す反応がより一層と明らかになった。さらには、競技力向上を目的とする高地トレーニングにおける更なる基礎研究データを提供することが出来たものと考えられる。平成 5 年より 9 回の科学研究費補助金を得て行なわれた動脈系化学受容器に関する研究は、今回の神経伝達物質の分子機構の研究課題の達成をもってその集大成を成し得た。

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る。

#### 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 6 件）

J.Wakai, A.Takayama, T.Yokoyama, N.Nakamura, T.Kusakabe, Y.Yamamoto: Immunohistochemical localization of dopamine D2 receptor in the rat carotid body. *Acta Histochem.*, 117:784-789, 2015. (査読・有)

DOI: 10.1016/j.acthis.2015.07.007

T.Yokoyama, N.Nakamura, T.Kusakabe, Y.Yamamoto: Serotonin-mediated modulation of hypoxia-induced intracellular calcium responses in glomus cells isolated from rat carotid body. *Neurosci. Lett.*, 597:149-153, 2015. (査読・有)

DOI: 10.1016/j.neulet.2015.04.044

F.Takaki, N.Nakamura, T.Kusakabe, Y.Yamamoto: Sympathetic and sensory innervations of small intensely fluorescent (SIF) cells in rat superior cervical ganglion. *Cell Tissue Res.*, 359:441-451, 2015. (査読・有)

DOI: 10.1007/s0044-014-2051-1

T.Yokoyama, N.Nakamura, T.Kusakabe, Y.Yamamoto: Sympathetic regulation of vascular tone via noradrenaline and serotonin in the rat carotid body as revealed by intracellular calcium imaging. *Brain Res.*, 1596:126-135, 2015. (査読・有)

DOI: 10.1016/j.brainres.2014.11.037

T.Yokoyama, N.Nakamura, T.Kusakabe, Y.Yamamoto: Vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive afferent nerve terminals in the carotid body of the rat. *Cell Tissue Res.*, 358:271-275, 2014. (査読・有)

DOI: 10.1007/s00441-014-1921-x

K.Kato, J.Wakai, H.Matsuda, T.Kusakabe, Y.Yamamoto: Increased total volume and dopamine -hydroxylase immunoreactivity of carotid body in spontaneously hypertensive rats. *Auton. Neurosci.*, 169: 49-55, 2012. (査読・有)

DOI: 10.1016/j.autneu.2013.03.005

〔学会発表〕（計 5 件）

横山拓矢、柴田秀史、中牟田伸明、日下部辰三、山本欣郎：ウサギ頸動脈小体の形態学および免疫組織化学的特徴。第

158 回日本獣医学会、青森・十和田、2015.9.

横山拓矢、中牟田伸明、日下部辰三、山本欣郎：ラット頸動脈小体の化学受容活性に対するセロトニンによる調節。第120回日本解剖学会、神戸、2015.3.

横山拓矢、中牟田伸明、日下部辰三、山本欣郎：セロトニンによるラット頸動脈小体化学受容細胞における低酸素応答の増強。第157回日本獣医学会、札幌、2014.9.

高木杏奈、横山拓矢、中牟田伸明、日下部辰三、山本欣郎：ラット頸動脈小体におけるドーパミン D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>受容体の免疫組織化学的検索。第157回日本獣医学会、札幌、2014.9.

日下部辰三：動脈系化学受容体の比較形態。第13回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム、大阪、2012.11

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

日下部辰三 (KUSAKABE, Tatsumi)

国土館大学・体育学部・教授

研究者番号：80117663

##### (2) 研究分担者

山本欣郎 (YAMAMOTO, Yoshio)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：10252123

高橋優宏 (TAKAHASHI, Masahiro)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：50315800