

氏名(本(国)籍)	若井 淳 (富山県)
主指導教員名	岩手大学 教授 山本 欣郎
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第321号
学位授与年月日	平成23年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	Expression of Tyrosine Hydroxylase and Vascular Endothelial Growth Factor in Rat Carotid Body (ラット頸動脈小体におけるチロシン水酸化酵素および血管内皮細胞増殖因子の発現)
審査委員	主査 岩手大学 教授 谷口 和之 副査 帯広畜産大学 教授 石井 利明 副査 岩手大学 教授 山本 欣郎 副査 東京農工大学 教授 渡辺 元 副査 岐阜大学 教授 阿閉 泰郎

論文の内容の要旨

生体が低酸素や高二酸化炭素環境に暴露されると、血中の酸素分圧は低下し、二酸化炭素分圧は上昇することが知られている。頸動脈小体は酸素分圧、二酸化炭素分圧、酸に感受性を持つ化学受容細胞を含み、血中ガス分圧に変化が起きると呼吸反射を引き起こす。化学受容細胞の興奮はドーパミンによるフィードバック抑制を受けていることが知られているが、ドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) は、長時間の低酸素暴露によって発現増加を示すことが報告されている。一方で、頸動脈小体は長期間の低酸素暴露によって、血管拡張や化学受容細胞の増加などの形態学的な変化を示す。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) が 24 時間以上の長期間の低酸素暴露によって発現増加を示すことから、低酸素暴露に伴う頸動脈小体の形態学的変化に VEGF が関与している可能性がある。しかしながら、24 時間以内の短時間低酸素暴露によって TH および VEGF の発現が変化するかどうかはほとんど分かっていない。さらに高二酸化炭素暴露の際にこれらの分子が変化するかどうかは全く知られていない。

以上の背景をふまえ、学位申請者は 24 時間以内の低酸素暴露 (10% O₂)、高二酸化炭素暴露 (10% CO₂)、そして低酸素と高二酸化炭素の同時暴露 (10% O₂ および 10% CO₂) をラットに行い、TH および VEGF の mRNA 発現がどのように変化するかをリアルタイム RT-PCR 法を用いて調べた。TH に関しては、間接蛍光抗体法を用いて、その免疫反応性の変化を検討した。

ラット頸動脈小体における TH mRNA 発現は低酸素暴露によって強い発現増加を示し、4 時間、

6 時間、8 時間の暴露によって無暴露のラットと比較して各々6.6 倍、6.0 倍、7.8 倍の増強を示した。また、低酸素暴露による発現増加よりは低いレベルだが、12 時間の低酸素と高二酸化炭素の同時暴露によっても mRNA の発現が 4.8 倍増加することを示した。TH の免疫反応性は、12 時間および 24 時間の低酸素暴露、そして 24 時間の低酸素と高二酸化炭素暴露を受けたラット頸動脈小体において有意な増強が観察された。VEGF mRNA は 2 時間 (4.7 倍)、4 時間 (5.8 倍) の低酸素暴露によって発現増加を示した。8 時間の低酸素と高二酸化炭素の同時暴露によっても発現増加を示したが、その値は低酸素暴露による増加よりも低いものであった。高二酸化炭素刺激による TH の mRNA 発現および免疫反応性、そして VEGF mRNA 発現は変化を示さなかった。すなわち、二酸化炭素は単独では TH および VEGF の発現に影響を与えないが、低酸素による両分子の発現増加を抑制することが明らかにした。

今回の研究において、TH および VEGF の mRNA がそれぞれ 4 時間、2 時間という短時間の低酸素によって増加することを証明した。また、TH の免疫反応性が mRNA 増加に遅れて増強していることから、mRNA の発現増加はタンパク発現の増加を誘導するものであると考察している。すなわち、TH の発現増加はドーパミン合成の増加を誘導し、増加したドーパミンは頸動脈小体における化学伝達の抑制を行う一方で、VEGF の発現増加は低酸素暴露による血管拡張や血管新生に関与すると推察している。また、二酸化炭素が低酸素誘導性の TH および VEGF 発現の増加を抑制することから、二酸化炭素は低酸素に対する呼吸反射を間接的に調節する重要な因子であると考察した。

低酸素暴露、高二酸化炭素暴露、低酸素と高二酸化炭素の同時暴露に対する呼吸反射はそれぞれ異なることが報告されている。三種のガスを暴露した際の TH および VEGF 発現の違いは、呼吸反射の違いを反映していると結論付けた。

審 査 結 果 の 要 旨

頸動脈小体において、化学受容調節に関与しているドーパミンの律速酵素であるチロシン水酸化酵素と血管拡張に関与する血管内皮細胞増殖因子の発現増加は 24 時間以上の長期間低酸素暴露によって誘起されることが報告されている。しかしながら、24 時間以内の短期間低酸素暴露による分子発現の変化の詳細は明らかでない。また、二酸化炭素は頸動脈小体への至適刺激であるが、二酸化炭素刺激による分子発現変化に関する報告はない。

申請者は頸動脈小体における分子レベルの変化は短時間の低酸素暴露でも起こると考え、チロシン水酸化酵素と血管内皮細胞増殖因子の発現変化を 24 時間まで経時的に観察した。さらに、高二酸化炭素暴露あるいは低酸素と高二酸化炭素の同時暴露を行い、これら分子の発現変化を観察した。

申請者は低酸素暴露によってチロシン水酸化酵素 mRNA は 4 時間で有意な発現増加を示すこと、血管内皮細胞増殖因子 mRNA は 2 時間で有意な発現増加を示すことを明らかにした。また、高二酸化炭素暴露ではどちらの分子も発現変化が観察されなかった。低酸素・高二酸化炭素暴露ではチロシン水酸化酵素 mRNA は 12 時間で有意な発現増加を、血管内皮細胞増殖因子 mRNA は 8 時間で有意な発現増加が観察されたが、どちらも低酸素暴露による発現増強より低い値を示した。チロシン水酸化酵素については免疫組織化学を用いたタンパクレベルでの発現変化も検討し、低酸素暴露では 12 時間から有意な免疫反応性の増強が観察され、高二酸化炭素暴露では変化は観察されず、低酸素・高二酸化炭素暴露では 24 時間から有意な増強を示すことを証明した。以上より、申請者は二酸化炭素は単独ではチロシン水酸化酵素や血管内皮細胞増殖因子の発現に影響を与えないが、低酸素暴露によって誘導される分子の発現増加を抑制すると考察した。

本研究において、申請者はまず環境ガスによる頸動脈小体の分子発現変化が2-4時間という短時間で誘起されることを明らかにした。また、その分子発現は環境ガスの種類によって異なることを示した。さらに二酸化炭素単独では頸動脈小体の分子発現を変化させないが、低酸素受容時の分子発現の調節を行う作用を持つことを示唆した。これらの新知見は環境ガスの変化に対する呼吸反射の調節機構を解明するために不可欠な基盤となる可能性があると考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目： Differences in tyrosine hydroxylase expression after short-term hypoxia, hypercapnia or hypercapnic hypoxia in rat carotid body
著 者 名： Wakai, J., Kizaki, K., Yamaguchi-Yamada, M. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名： Respiratory Physiology & Neurobiology
巻・号・頁・発行年： 173 (1) : 95-100, 2010

既発表学術論文

- 1) 題 目： Expression of Fos protein in brainstem after application of L-menthol to the rat nasal mucosa
著 者 名： Wakai, J., Yoshizaki, K., Taniguchi, K., Yamaguchi-Yamada, M. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名： Neuroscience Letters
巻・号・頁・発行年： 435 (3) : 246-250, 2008