

氏名 (本 (国) 籍)	加 藤 弘 毅 (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 3 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 5 年 3 月 1 3 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	Enhanced Expression of Catecholamine-synthesizing Enzymes in Rat Carotid Body by Short-term Hypoxia (ラット頸動脈小体におけるカテコールアミン合成酵 素の短期間低酸素暴露による発現増強)
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 北 村 延 夫 副査 岩手大学 教授 山 本 欣 郎 副査 東京農工大学 教授 柴 田 秀 史 副査 岐阜大学 教授 志 水 泰 武

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

頸動脈小体 (CB) は動脈血中の酸素分圧, 二酸化炭素分圧および水素イオン濃度の変化を検出する末梢化学受容器である。動脈血中酸素分圧の低下は CB のグロムス細胞 (I 型細胞) によって検出され, 延髄孤束核へ投射する頸動脈洞枝の発火頻度の増加が起こる。その結果, 低酸素環境下では代償的な呼吸数増加が引き起こされる。CB のグロムス細胞にはドーパミン (DA) とノルアドレナリン (NA) が存在することが知られており, 薬理学的研究および電気生理学的研究報告から, グロムス細胞の DA と NA はフィードバック抑制によりグロムス細胞からの興奮性神経伝達物質の放出を抑制することが示唆されている。日や週単位の長期間低酸素暴露を行うと, カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) がラット CB において増加することが報告されている。さらに, 長期間低酸素暴露を行ったラットでは CB における DA と NA の含有量増加が報告されている。これらの研究報告は長期間低酸素暴露により CB においてカテコールアミン合成能の亢進が生じることを示しており, 長期間の低酸素環境下では, 頸動脈洞枝の活性はグロムス細胞のカテコールアミンにより抑制的調節を受けていると考えられる。このように, 長期間の低酸素環境下では CB におけるカテコールアミン発現は増強することが知られているが, 1 日以内という短期間の低酸素環境下で CB におけるカテコールアミン発現増強が生じるかどうかはほとんど知られていない。しかしながら, 1 日以内という短期間低酸素暴露によってもラット CB において TH mRNA が増加するという報告が少数ある。本研究は, 短期間の低酸素環境下においても CB でカテコールアミン合成能の亢進が生じているという仮説に基づき, 24 時間までの短期間低酸素

(10% O<sub>2</sub>) 暴露を行ったラットを用い、CB における TH および NA 合成酵素であるドーパミン β-水酸化酵素 (DBH) の発現変化を免疫組織化学およびイムノブロット法により検索した。

TH 免疫蛍光強度をグレースケールに換算した結果、コントロール群に比べ 12, 18, および 24 時間暴露群において有意に増加した ( $p < 0.05$ )。グロムス細胞の断面積も同時に計測したが、実験群間で有意な変化はみられなかった。コントロール群において、グロムス細胞の TH 免疫蛍光強度と断面積に強い負の相関がみられた (Spearman's  $\rho = -0.70$ )。この相関係数は低酸素暴露時間とともに増加し、18 時間暴露群は最も高値を示した ( $\rho = -0.18$ )。また、コントロール群の TH 免疫蛍光強度のヒストグラムは一峰性の分布を示し、低酸素暴露時間とともにそのピークはより強い免疫蛍光強度の方へ移動した。これらの結果は、低酸素による TH 免疫反応性の増加はどのグロムス細胞においても生じていることを示唆している。さらに、イムノブロット法においても、コントロール群に比べ 12, 18, および 24 時間暴露群の CB における TH シグナル強度の増加が確認された。以上の結果から、12 時間の低酸素暴露によりラット CB のグロムス細胞において TH タンパク発現が増加することを明らかにした。

TH の酵素活性は Ser31 と Ser40 のリン酸化によって増加することが報告されている。そのため、短期間低酸素暴露によるラット CB における TH の Ser31 と Ser40 リン酸化レベルの経時変化を検索した。イムノブロット法では、CB における Ser31 と Ser40 リン酸化 TH のシグナル強度は、コントロール群に比べ 6, 12, 18, および 24 時間暴露群において強まった。免疫組織化学では、グロムス細胞における Ser31 と Ser40 リン酸化 TH の免疫反応性は、コントロール群に比べ 6, 12, 18, および 24 時間暴露群において有意に増加した ( $p < 0.05$ )。以上の結果から、6 時間の低酸素暴露によりラット CB のグロムス細胞において TH の Ser31 と Ser40 リン酸化が増強することを明らかにした。

イムノブロット法では、他の実験群に比べ 12 時間暴露群の CB において、DBH のシグナル強度が増加した。免疫組織化学では、12 時間暴露群において、DBH 陽性のグロムス細胞における DBH 免疫反応性がコントロール群に比べ有意に増加した ( $p < 0.05$ )。以上の結果から、低酸素暴露後 12 時間でラット CB のグロムス細胞において DBH タンパク発現が一過性に増強することを明らかにした。

本研究から、CB のグロムス細胞におけるカテコールアミン合成は低酸素暴露後 6 時間では TH リン酸化を介して、また低酸素暴露後 12 時間以降は TH タンパクの増加を介して増強されることが示唆される。さらに、NA 合成は DBH タンパクの増加を介して低酸素暴露後 12 時間で一過性に増強されることが示唆される。それゆえに、CB における短期間低酸素暴露によるカテコールアミン合成酵素増強の意義は、低酸素環境が継続した際にグロムス細胞の DA と NA を増加させてカテコールアミンによる頸動脈洞枝活性の抑制調節を増強することにあると考察した。以上のことから、低酸素環境の初期段階における適切な呼吸反射にグロムス細胞の DA と NA が貢献している可能性を示唆した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

週単位の長期間低酸素環境下では、末梢化学受容器である頸動脈小体において化学受容調節に関与するドーパミンおよびノルアドレナリンが増加することが報告されている。一方で、1 日以内の短期間の低酸素環境下での頸動脈小体におけるカテコールアミンの発現動態はほとんど知られていない。しかしながら、カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の mRNA が低酸素暴露後 1 日以内に頸動脈小体において増加するという報告が存在する。この研究報告に基づき、学位申請者は短期間の低酸素環境下においても頸動脈小体でカテコールアミン合成能亢進が生じるという仮説を立てた。そこで、申請者は 24 時間までの短期間低酸素 (10% O<sub>2</sub>) 暴露によるラット頸動脈小体におけるチロシン水酸化酵素の発現量とリン酸化の変化、ノルアドレナリン合成酵素であるドーパミン β-水酸化酵素の発現量変化を免疫組織化学およびウエスタンブロット法により検索した。

申請者は、ラットへの低酸素暴露後 12 時間以降、頸動脈小体で化学受容を行うグロムス細胞においてチロシン水酸化酵素タンパク発現が増加することを明らかにした。また、チロシン水酸化酵素はリン酸化によって酵素活性が増加することが知られているが、申請者はチロシン水酸化酵素のリン酸化が低酸素暴露後 6 時間でグロムス細胞において亢進されることを明らかにした。さらに、申請者はラットへの 12 時間の低酸素暴露によって、ドーパミン β-水酸化酵素のタンパク発現がグロムス細胞で一過性に増加することを明らかにした。以上の結果は、低酸素暴露後 1 日以内に頸動脈小体のグロムス細胞においてカテコールアミン合成が亢進していることを示唆している。申請者は短期間低酸素暴露によるカテコールアミン合成酵素の発現増強の意義は、低酸素環境が継続した際にグロムス細胞のドーパミンとノルアドレナリンを増加させて頸動脈小体の過剰な興奮を抑制的に調節することにあると考察した。

申請者は、生化学的手法と免疫組織化学的手法によって、低酸素暴露後 24 時間以内という短い時間軸で頸動脈小体におけるカテコールアミン合成能の亢進が生じることを明らかにした。さらに、そのカテコールアミン合成能増強には酵素タンパクの発現量増加とリン酸化による酵素活性増加という 2 つのメカニズムが関与していることを示した。これらの新しい知見は、低酸素環境の初期段階での呼吸調節に頸動脈小体のカテコールアミンが貢献している可能性を提示しており、生体の低酸素環境への順応機構を解明する上で必要不可欠な基盤となり得るものである。

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 : Short-term hypoxia increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in rat carotid body  
著 者 名 : Kato, K., Yamaguchi-Yamada, M. and Yamamoto, Y.  
学術雑誌名 : Journal of Histochemistry & Cytochemistry  
巻・号・頁・発行年 : 58 (9) : 839-846, 2010
- 2) 題 目 : Short-term hypoxia transiently increases dopamine β-hydroxylase immunoreactivity in glomus cells of the rat carotid body  
著 者 名 : Kato, K., Yokoyama, T., Yamaguchi-Yamada, M. and Yamamoto, Y.  
学術雑誌名 : Journal of Histochemistry & Cytochemistry  
巻・号・頁・発行年 : 61 (1) : 55-62, 2013
- 3) 題 目 : Short-term hypoxia increases phosphorylated tyrosine hydroxylase at Ser31 and Ser40 in rat carotid body  
著 者 名 : Kato, K. and Yamamoto, Y.  
学術雑誌名 : Respiratory Physiology & Neurobiology  
巻・号・頁・発行年 : 185 (3) : 543-546, 2013

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Increased total volume and dopamine β-hydroxylase immunoreactivity of carotid body in spontaneously hypertensive rats  
著 者 名 : Kato, K., Wakai, J., Matsuda, H., Kusakabe, T. and Yamamoto, Y.  
学術雑誌名 : Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical  
巻・号・頁・発行年 : 169 (1) : 49-55, 2012