

学位論文要約

氏 名 横山 拓矢

題 目 Excitatory Modulation of Serotonin on Chemosensory
Activity in Rat Carotid Body
(ラット頸動脈小体におけるセロトニンによる興奮性調節)

頸動脈小体は、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頸動脈小体のグロムス細胞によって検出され、頸動脈洞枝の感覚神経終末を興奮させる。頸動脈小体からの情報は、頸動脈洞枝を介して呼吸中枢である延髄孤束核へ伝えられる。その結果、低酸素環境下では、低下した血中酸素分圧を正常に戻すための呼吸数増加が引き起こされる。これまでに、頸動脈小体には様々な伝達物質や調節物質が存在していることが報告されている。このうち、セロトニン (5-HT) は頸動脈洞枝の神経活動や呼吸頻度の増加を引き起こすという生理学的研究報告から、頸動脈小体の化学受容活性を興奮性に調節していることが推測されている。しかしながら、頸動脈小体における 5-HT の動態・作用の詳細は明らかでない。

本研究では、免疫組織学的・生理学的解析を用いてラット頸動脈小体における 5-HT による化学受容活性調節機構を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、頸動脈小体における 5-HT の合成・放出部位を明らかにする目的で、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 (TPH1), TPH2, および 5-HT 輸送蛋白 (SERT) の遺伝子発現を RT-PCR 法によって解析した。また、これらの分子の局在を免疫組織化学によって検索した。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。一方、TPH2 mRNA の発現は認められなかった。免疫組織化学では、グロムス細胞において TPH1 および SERT に対する陽性反応が観察された。一方、頸動脈小体において TPH2 陽性反応は認められなかった。TPH1 および SERT に対する抗体を用いた免疫組織化学では、グロムス細胞に加えて、血管周囲に認められる神経線維においても、両分子に対する陽性反応が観察された。神経線維において認められる SERT 陽性反応は、交感神経線維を標識するドパミンβ-水酸化酵素 (DBH) に対する陽性反応と共存していたことから、SERT 陽性神経は交感神経であると考えられ、頸動脈小体内に分布する交感神経線維はノルアドレナリン (NA) に加えて 5-HT による調節機構を有することが示された。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。以上の結果から、頸動脈小体においてグロムス細胞および交感神経線維が 5-HT を合成・放出していることが示唆された。

第 2 章では、グロムス細胞の低酸素応答に対する 5-HT の作用を、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を興奮の指標として解析した。また、RT-PCR 法によって頸動脈小体における 5-HT 受容体の遺伝子発現を検索した。細胞内カルシウムイメージングでは、定常酸素状態 (21% O_2) において 5-HT を適用してもグロムス細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に変化は認められなかったが、低酸素刺激液 (1% O_2) を灌流している間、同一の細胞において間歇的な $[Ca^{2+}]_i$

の上昇が認められた。低酸素刺激によって生じるグロムス細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の大きさや頻度は5-HT存在下で増加し、この作用は5-HT₂受容体拮抗薬ketanserin存在下で抑制された。また、RT-PCR法による解析では、頸動脈小体の抽出産物において5-HT_{2A}受容体mRNAおよび5-HT_{2B}受容体mRNAの発現が確認された。以上の結果から、5-HTは5-HT₂受容体を介してグロムス細胞の低酸素反応性を増強していることが示唆された。

第3章では、低酸素が交感神経活性に及ぼす影響を調べるために、頸部交感神経幹の神経活動記録を行った。また、交感神経の5-HTがNAと共に血管収縮に関与していることを明らかにするために、頸動脈小体から分離した血管組織標本を用いて血管平滑筋細胞および周皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に対する5-HTとNAの作用を解析した。電気生理学的検索では、生体ラットへ低酸素ガス(10% O₂)を吸入暴露している間、頸部交感神経幹の発火頻度は増加した。この結果から、低酸素環境下において頸動脈小体への交感神経系の入力が増加していることが示唆された。頸動脈小体からは細動脈および毛細血管が分離され、細動脈の組織標本ではNAによって血管平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察されたが、5-HTを適用しても変化は認められなかった。一方、毛細血管の組織標本では、NAを適用しても周皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に変化は認められなかったが、5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察され、この作用は5-HT₂受容体拮抗薬ketanserin存在下で抑制された。以上の結果から、NAは細動脈平滑筋細胞、5-HTは毛細血管周皮細胞に対して収縮性に作用することが示唆された。周皮細胞が収縮すると毛細血管内の血流が低下することから、低酸素環境下において頸動脈小体内に存在する毛細血管の血流が低下すると、グロムス細胞の領域で低酸素状態が持続することが推測される。すなわち、低酸素環境下において活性化した交感神経は、5-HTを介して毛細血管内の血流を低下させることで、頸動脈小体の化学受容活性を間接的に増強している可能性がある。

本研究の結果から、頸動脈小体において5-HTはグロムス細胞および交感神経線維で合成されていることが示された。また、5-HTは化学受容細胞の低酸素反応性の増強すること、周皮細胞の収縮を介して毛細血管の血流低下を引き起こすことが示唆された。これら2種類の異なる調節経路を介して、5-HTは頸動脈小体が担う呼吸反射の求心性活動を興奮性に調節している可能性がある。

学 位 論 文 要 約

氏 名 YOKOYAMA, Takuya

題 目 Excitatory Modulation of Serotonin on Chemosensory Activity in Rat Carotid Body
(ラット頸動脈小体におけるセロトニンによる興奮性調節)

The carotid body (CB) is a peripheral chemoreceptor that is responsible for monitoring the arterial blood levels of partial pressures of oxygen (pO_2) and carbon dioxide (pCO_2), and pH. A decrease in arterial pO_2 is detected by glomus cells within the CB, leading to an increase in firing rate of the carotid sinus nerve projecting to the nucleus of the solitary tract. As a result, an increase in ventilation is induced in order to improve oxygen delivery to the body under hypoxic condition. It has been reported that CB contains various transmitters/modulators including monoamines and neuropeptides, and physiological studies reported that carotid sinus nerve discharge and ventilatory responses were increased by serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT), one of the monoamines that exist in the CB. Thus, chemosensory activity in the CB may be enhanced by 5-HT. However, details of modulatory mechanism by 5-HT on the chemosensory activity in the CB are unknown.

In the present study, I examined the presence of the rate-limiting enzyme in 5-HT biosynthesis, tryptophan hydroxylase (TPH), in the CB of the rat by immunohistochemical analysis. I also investigated the action sites of 5-HT in the CB by physiological analysis.

In Chapter 1, I aimed to determine the endogenous site of 5-HT biosynthesis in the CB. I examined mRNA expression of TPH1, TPH2, and 5-HT plasma membrane transporter (SERT), in the CB by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). I also investigated immunohistochemical localization of TPH1, TPH2, and SERT in the CB by immunohistochemistry. RT-PCR detected expression of TPH1 and SERT mRNAs, but not TPH2 mRNA in extracts of the CB. Using immunohistochemistry, TPH1 and SERT immunoreactivities were observed in almost all glomus cells. SERT immunoreactivity was observed on TPH1-immunoreactive nerve fibers. On the other hand, TPH2 immunoreactivity was not observed in either glomus cells or nerve fibers within the CB. SERT immunoreactivity was also observed in perivascular varicose nerve fibers immunoreactive for a marker of sympathetic nerve fibers, dopamine beta-hydroxylase, but not in nerve fibers immunoreactive for a marker for parasympathetic nerves fibers, vesicular acetylcholine transporters, or nerve terminals immunoreactive for a marker for sensory nerve terminals, P2X3 purinoreceptors. Furthermore, RT-PCR confirmed the expression of TPH1 and SERT mRNAs in extracts of the CB. These results suggest that 5-HT may be endogenously

synthesized and released from glomus cells and perivascular sympathetic nerve fibers in the CB.

In Chapter 2, I examined intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) changes as an index of hypoxic chemosensitivity in glomus cells isolated from the CB following the application of 5-HT and its antagonist. I also investigated the mRNA expression of 5-HT receptors in the CB by RT-PCR. Intracellular calcium imaging showed that 5-HT did not induce any $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in clustered glomus cells during the perfusion of normoxic solution (21% O_2), whereas the perfusion of hypoxic solution (1% O_2) induced repetitive increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the same specimens. The frequency and magnitude of hypoxia-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes observed in the glomus cells were enhanced in the presence of 5-HT, and this response was inhibited by the 5-HT₂ receptor antagonist, ketanserin. Moreover, RT-PCR confirmed the expression of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor mRNAs in extracts of the CB. These results suggest that 5-HT enhances hypoxia-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in glomus cells via 5-HT₂ receptor.

In Chapter 3, I aimed to examine the sympathetic regulatory mechanism underlying vascular tone via 5-HT and noradrenaline (NA) in the CB for chemosensory activation. In order to determine the effects of hypoxia on sympathetic nerve input to the CB, I recorded cervical sympathetic nerve activity in rats exposed to hypoxia. I also examined NA- and 5-HT-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in vascular smooth muscle cells and pericytes in isolated blood vessels from the CB. Multifiber electrical activity recorded from the cervical sympathetic trunk was increased during the inhalation of hypoxic gas (10% O_2). Thus, the sympathetic regulation of blood flow in the CB may be enhanced by hypoxia. Intracellular calcium imaging using arteriole specimens showed that NA induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases in arteriolar smooth muscle cells, whereas 5-HT did not cause any $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses. However, NA did not induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases in pericytes in capillaries, whereas 5-HT did and this response was inhibited by the 5-HT₂ receptor antagonist, ketanserin. Since pericyte-induced capillary constriction is known to result in decreases in blood flow through capillaries, 5-HT-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases in pericytes may reduce capillary blood flow in the CB during hypoxia. Due to decreases in capillary blood flow, the region of glomus cells may experience prolonged hypoxia. Therefore, 5-HT from sympathetic nerve fibers may be involved in chemoreceptor activation of the CB due to reductions in capillary blood flow during hypoxia.

In conclusion, 5-HT may be endogenously synthesized in glomus cells and perivascular sympathetic nerve fibers in the CB. 5-HT may enhance the chemosensory activity of the CB via two different modulatory pathways, elevation in hypoxic chemosensitivity of glomus cells, and reduction in capillary blood flow by pericyte contraction, respectively. The present study provides the possibility that 5-HT in the CB contributes to the elevation of respiratory reflex via an increase in carotid sinus nerve activity during hypoxia.