

氏名(本(国)籍)	横山拓矢(茨城県)
主指導教員氏名	岐阜大学 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443号
学位授与年月日	平成27年9月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第2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	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)
審査委員	主査 岩手大学 教授 木崎景一郎 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

学位論文の内容の要旨

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。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、低下した酸素分圧を正常に戻すための呼吸数増加が生じる。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。本研究は、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免疫組織化学的・生理学的手法を用いて検索した。

頸動脈小体における5-HTの合成・分泌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。また、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。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・分泌していることが示唆された。

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Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_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。定常酸素状態 (21% O₂) において 5-HT を適用してもグロムス細胞の[Ca²⁺]_iに変化は認められなかったが、低酸素刺激液 (1% O₂) を灌流している間、同一の細胞において間歇的な[Ca²⁺]_iの上昇が認められた。低酸素刺激によって生じる[Ca²⁺]_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 受容体阻害により抑制された。RT-PCR 法による解析では、頸動脈小体の抽出産物において 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。

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、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[Ca²⁺]_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とから、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[Ca²⁺]_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[Ca²⁺]_iに変化は認められなかったが、5-HT による[Ca²⁺]_i上昇が観察され、この作用は 5-HT₂ 受容体阻害により抑制された。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の毛細血管血流が低下すると、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、低酸素環境下で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提示された。

本研究から、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。5-HT がこれら 2 種類の調節経路を介して、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を提示した。

審査結果の要旨

低酸素環境下では、頸動脈小体が検出した血中酸素分圧の低下の情報は頸動脈洞枝を介して延髄へ伝えられ、酸素分圧を正常に戻すための呼吸数増加が生じる。頸動脈小体に存在する生理活性物質のうち、セロトニン (5-HT) は頸動脈洞枝の活動亢進および呼吸数の増加を引き起こすことが知られている。この報告から、5-HT は頸動脈小体の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。そこで、申請者はラット頸動脈小体の 5-HT による化学受容活性調節機構を免疫組織学的・生理学的解析により検索した。

申請者は、免疫組織化学を中心とした解析によって、頸動脈小体で化学受容を行うグロムス細胞ならびに血管周囲に分布する交感神経線維が 5-HT の合成・分泌母地であることを明らかにした。また、カルシウムイメージング法によって、5-HT がグロムス細胞の低酸素に対する興奮を増強することを明らかにした。この結果から、グロムス細胞に由来する 5-HT の意義は、自己分泌・傍分泌的に低酸素反応性を増強することにあると申請者は考察した。一方で、低酸素環境下で頸動脈小体への交感神経系の入力が増加していることを電気生理学的解析により示すとともに、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をカルシウムイメージング法により明らかにした。これらの結果から、交感神

経に由来する 5-HT の意義は、低酸素環境下においてグロムス細胞付近の局所血流を調節して頸動脈小体の低酸素感受性を間接的に増強することにあると申請者は考察した。

申請者は、免疫組織化学的手法によって頸動脈小体のグロムス細胞と交感神経線維において 5-HT が合成・分泌されることを明らかにした。さらに、カルシウムイメージング法を中心とした解析によって、頸動脈小体の 5-HT による化学受容活性調節にはグロムス細胞の興奮増強と毛細血管内の血流調節という 2 種類の経路が存在することを提示した。これらの新しい知見は、低酸素環境下における呼吸調節に頸動脈小体の 5-HT が貢献している可能性を示しており、生体の低酸素環境に対する生理学的反応を解明する上で重要な基礎所見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 : Immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter in the carotid body of the rat
著 者 名 : Yokoyama, T., Misuzu, Y.Y. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Histochemistry and Cell Biology
巻・号・頁・発行年 : 140・2・147-155・2013
- 2) 題 目 : Sympathetic regulation of vascular tone via noradrenaline and serotonin in the rat carotid body as revealed by intracellular calcium imaging
著 者 名 : Yokoyama, T., Nakamuta, N., Kusakabe, T. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Brain Research
巻・号・頁・発行年 : 1596・ 126-135・2015
- 3) 題 目 : Serotonin-mediated modulation of hypoxia-induced intracellular calcium responses in glomus cells isolated from rat carotid body
著 者 名 : Yokoyama, T., Nakamuta, N., Kusakabe, T. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Neuroscience Letters
巻・号・頁・発行年 : 597・ 149-153・2015

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Short-term hypoxia transiently increases dopamine β -hydroxylase immunoreactivity in glomus cells of rat carotid body
著 者 名 : Kato, K., Yokoyama, T., Yamaguchi-Yamada, M. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Journal of Histochemistry and Cytochemistry
巻・号・頁・発行年 : 61・1・55-62・2013
- 2) 題 目 : Vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive afferent nerve terminals in the rat carotid body of the rat
著 者 名 : Yokoyama, T., Nakamuta, N., Kusakabe, T. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Cell and Tissue Research
巻・号・頁・発行年 : 358・1・271-275・2014
- 3) 題 目 : GABA-mediated modulation of ATP-induced intracellular calcium responses in nodose ganglion neurons of the rat
著 者 名 : Yokoyama, T., Fukuzumi, S., Hayashi, H., Nakamuta, N. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Neuroscience Letters

卷・号・頁・発行年：584・　・168-172・2015