

# 学位論文要約

氏名 森永涼介

題目 Serotonergic Circuit for Respiratory Modulation under Hypoxic Exposure  
(低酸素暴露時の呼吸調節におけるセロトニン作動性神経回路)

延髄腹側呼吸群 (VRC) は延髄腹外側 (VLM) に存在し, Bötzing complex (BC), pre-Bötzing complex (PBC), rostral ventral respiratory group (rVRG), caudal ventral respiratory group (cVRG) の領域に分けられ, 相互連絡することで, 呼吸パターンを形成している。低酸素暴露下では, 血中酸素濃度の低下を受容した末梢化学受容器の興奮が, 孤束核 (NTS) を介して VRC に伝えられることで, 換気量の増加が生じる。この低酸素暴露に対する呼吸応答にセロトニン (5-HT) 作動性神経が関与することが知られている。5-HT 作動性神経の細胞体は, 吻側縫線核群と尾側縫線核群に区分可能な縫線核に存在し, 5-HT 作動性神経線維は NTS や VRC に存在する。また, 交感神経活動を支配するカテコラミン作動性神経の A1/C1 神経および A2/C2 神経や副交感神経活動を支配する疑核 (Amb) および迷走神経背側運動核 (DMX) は呼吸調節に関与しており, 5-HT 作動性神経線維はこれら神経が分布する領域にも存在している。しかし, 縫線核から VRC への 5-HT 作動性神経の投射様式は不明である。また, 低酸素暴露の際, どの神経核において 5-HT 作動性神経による神経活動調節が行われているのかは明らかになっていない。本研究では, 低酸素暴露下の呼吸調節における 5-HT 作動性神経回路を明らかにするために, 第 2 章では縫線核 5-HT 作動性神経の VRC への投射を神経標識法により解析し, 第 3 章では NTS や VRC を含めた延髄全体での低酸素暴露による 5-HT 陽性反応の変化を免疫組織化学的に解析した。

第 2 章では, VRC 全体の 5-HT 作動性神経の投射を明らかにすることを目的とし, Wistar ラット (雄, 8-9 週齢) の BC, PBC, rVRG 前部, rVRG 後部/cVRG の 4 領域に, 逆行性神経標識物質であるコレラトキシン B サブユニット (CTB) をそれぞれ注入し, 1 週間後に 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定し, CTB および 5-HT 合成の律速酵素であり 5-HT 作動性神経を標識するトリプトファン水酸化酵素 2 (TPH2) に対する抗体を用いた免疫組織化学により, 縫線核における CTB および TPH2 陽性反応を示す神経を検索した。どの注入例においても, CTB 陽性を示す神経細胞体は吻側縫線核群および尾側縫線核群に広く認められた。CTB 陽性神経の細胞体は円形や楕円形, 多角形であり, 複数の樹状突起を有していた。CTB 陽性神経細胞体のサイズは  $67-976 \mu\text{m}^2$  と多様であった。また, 縫線核に認められた CTB 陽性神経の一部は TPH2 陽性反応を示した。CTB/TPH2 共陽性神経の細胞体のサイズは  $84-620 \mu\text{m}^2$  であり, 大型のものは認められなかった。大部分の注入例において CTB/TPH2 共陽性神経は, 吻側縫線核群である背側縫線核および尾側縫線核である大縫線核, 巨細胞網様核  $\alpha$  部, 巨細胞網様核腹側部, 傍巨細胞網様核, 不確縫線核, 淡蒼縫線核に多く認められ, その他の縫線核には少数認められた。以上の結果から, 吻側縫線核群から尾側縫線核群の広い範囲に分布する 5-HT 作動性神経が, VRC 全体に投射していることが明らかになった。

第 3 章では, NTS や VRC を含む延髄全体における低酸素暴露による 5-HT 陽性反応の

変化を明らかにすることを目的として、Wistar ラットを低酸素ガス（10%O<sub>2</sub>）に 1, 2, 4, 6 時間暴露した後、4%PFA で灌流固定し、5-HT に対する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。また、5-HT 作動性神経と他の神経の関係を明らかにするために、5-HT に加え、PBC の神経に発現するニューロキニン 1 受容体（NK1R）や A1/C1 神経および A2/C2 神経を標識するドパミン β 水酸化酵素（DBH）に対する抗体を用いて多重蛍光免疫染色を行った。低酸素暴露 2 時間群において、吻側縫線核群および尾側縫線核群全体で 5-HT 陽性反応を示す神経細胞体数が非低酸素暴露群より増加した。5-HT 陽性神経線維は延髄の広い範囲に分布しており、低酸素暴露 2 時間群の 5-HT 陽性神経線維は非低酸素暴露群に比較し、多く認められた。それぞれの神経核において 5-HT 陽性神経線維の投影面積を非低酸素暴露群と比較したところ、すべての低酸素暴露群の吻側 VLM および低酸素暴露 2, 4, 6 時間群の尾側 VLM において、有意な増加が認められた。また、Amb 緻密部においても、すべての低酸素暴露群で増加傾向が認められた。低酸素暴露 1, 2 時間群の NTS 外側部や DMX においても、有意な増加が認められた。多重蛍光免疫染色においては、軸索瘤を有する 5-HT 陽性神経線維が、PBC の NK1R 陽性神経や A1/C1 神経や A2/C2 神経である DBH 陽性神経の樹状突起や細胞体にそれぞれ接している様子が認められた。以上の結果から、低酸素暴露下では、すべての縫線核の 5-HT 作動性神経で 5-HT 合成が亢進し、延髄の広い範囲で 5-HT 分泌を亢進していると考えられた。また、5-HT 作動性神経は VRC である PBC の神経を介して直接的に呼吸を調節しているだけでなく、A1/C1 神経などの呼吸に関係する神経を介して間接的に呼吸を調節していると考えられた。

本研究の結果から、吻側縫線核群と尾側縫線核群の両方の 5-HT 作動性神経は、低酸素暴露により 5-HT 合成を亢進し、VRC での 5-HT 分泌を亢進することにより VRC の活動を調節し、低酸素暴露に対する呼吸応答を生じさせると考えられた。また、5-HT 作動性神経は、NTS や交感神経活動を調節する A1/C1 神経、A2/C2 神経、副交感神経活動を調節する Amb や DMX の神経の活動を調節することで、間接的にも呼吸を調節していると考えられた。

## 学 位 論 文 要 約

氏 名 MORINAGA, Ryosuke

題 目 Serotonergic Circuit for Respiratory Modulation under Hypoxic Exposure  
(低酸素暴露時の呼吸調節におけるセロトニン作動性神経回路)

The ventral respiratory column (VRC) located in the ventrolateral medulla (VLM) is divided into four compartments: the Bötzing complex (BC), pre-Bötzing complex (PBC), rostral ventral respiratory group (rVRG), and caudal ventral respiratory group (cVRG). The respiratory neurons in these compartments constitute microcircuits that interact within and between these compartments to generate respiratory patterns. Under hypoxic exposure, the decrease of the PaO<sub>2</sub> activates the peripheral chemoreceptor. The activation of the peripheral chemoreceptor is transmitted to the NTS, and then, the afferent exciting projection from the NTS to the VRC induces the hyperventilation. In addition, serotonergic neurons are related to the respiratory response to hypoxic exposure. The serotonergic nerve cell bodies are distributed in the rostral and caudal raphe nuclei. The serotonergic nerve fibers are distributed in the NTS and VRC. Moreover, the respiration is modulated by the catecholamine A1/C1 and A2/C2 neurons that control the sympathetic nerve activity and the neurons in the ambiguous nucleus (Amb) and dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMX) that control the parasympathetic nerve activity. The serotonergic nerve fibers are also distributed in the region containing these neurons. However, little is known about the serotonergic projection pattern to the VRC and the detailed region modulated by serotonergic neurons under hypoxic exposure. The present study aimed to reveal the serotonergic circuit for respiratory modulation under hypoxic exposure. The present study examined the serotonergic projections to the VRC from each raphe nuclei by neuronal retrograde tracer injection to the each VRC compartment (chapter 2). Additionally, the present study investigated the detailed region modulated by serotonergic neurons under hypoxic exposure by the immunohistological analysis of hypoxic changes of serotonin (5-HT) immunoreactivity in the medulla oblongata (chapter 3).

In the chapter 2, to reveal the serotonergic projection throughout the VRC, the retrograde tracer, cholera toxin B subunit (CTB), was injected into the each site of the VRC of male Wistar rats (8-9 weeks), i.e. BC, PBC, anterior rVRG, and posterior rVRG/cVRG. One week after the tracer injection, the rats were fixed by transcardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PFA), and then, the cryosections of the brainstem were immunostained for CTB and tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), a rate-limiting enzyme in the synthesis of 5-HT and a marker of serotonergic neurons, for labeling the CTB- or/and TPH-immunoreactive nerve cell bodies in the raphe nuclei. In the all cases, the CTB-immunoreactive nerve cell bodies were widely distributed in the rostral and caudal raphe nuclei. Most

CTB-immunoreactive nerve cell bodies distributed in the raphe nuclei were round, oval, or polygonal with several dendrites. The areas of the CTB-immunoreactive nerve cell bodies were various and ranged between 67 and 976  $\mu\text{m}^2$ . The part of CTB-immunoreactive neurons were also immunostained for TPH2. The areas of the nerve cell bodies double-immunoreactive for CTB and TPH2 ranged between 84 and 620  $\mu\text{m}^2$  and the large size of double-immunoreactive neurons were not observed. In the most cases, a large number of the double-immunoreactive neurons were observed in the dorsal raphe nucleus of the rostral raphe nuclei and the raphe magnus nucleus, gigantocellular reticular nucleus, alpha and ventral parts, lateral paragigantocellular nucleus, raphe obscurus nucleus, and raphe pallidus nucleus of the caudal raphe nuclei. In addition, a small number of the double-immunoreactive neurons were observed in the other raphe nuclei. These results revealed that the serotonergic neurons distributed in both the rostral and caudal raphe nuclei projected throughout the VRC.

In the chapter 3, to reveal the change of 5-HT immunoreactivity by hypoxic exposure in the medulla oblongata, male Wistar rat (8-10 weeks) were exposed to hypoxic gas (10%O<sub>2</sub>) for 1, 2, 4, and 6 hours. Then, the rats were fixed by transcardiac perfusion of 4%PFA and the cryosections of the brainstem were immunostained for 5-HT. In addition, the multiple immunofluorescence was performed with the antibodies for 5-HT, neurokinin 1 receptor (NK1R), a marker of the PBC neurons, and dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH), a marker of the catecholamine A1/C1 and A2/C2 neurons to reveal the relationship between the serotonergic neurons and the other neurons. In the rats exposed to hypoxia for 2 hours, the number of the 5-HT-immunoreactive nerve cell bodies in both the rostral and caudal raphe nuclei was larger than that of rats non-exposed to hypoxia (control). The 5-HT-immunoreactive nerve fibers were distributed in the wide region of the medulla oblongata and increased by the hypoxic exposure for 2 hours. The projection areas of the 5-HT-immunoreactive nerve fibers in the rostral VLM of all experimental groups and the caudal VLM of the rats exposed to hypoxia for 2, 4, and 6 hours were significantly higher than those in the controls. The projection areas of 5-HT-immunoreactive nerve fibers in the Amb, compact part, of all experimental groups tended to increase than that in the control. The projection areas of 5-HT-immunoreactive nerve fibers in the NTS, lateral part, and DMX of the rats exposed to hypoxia for 1 and 2 hours were significantly higher than those in the controls. In the multiple immunofluorescence, the 5-HT-immunoreactive nerve fibers with varicosities made contact with the dendrites and nerve cell bodies of NK1R-immunoreactive neurons in the PBC and DBH-immunoreactive neurons, i.e. A1/C1 and A2/C2 neurons, respectively. These results suggested that the hypoxic exposure enhances the 5-HT synthesis of the serotonergic neurons in both the rostral and caudal raphe nuclei and increases the 5-HT secretion in the wide region of the medulla oblongata. In addition, the serotonergic neurons may directly modulate the activity of the VRC containing the PBC neurons to change the respiration. Moreover, the serotonergic neurons may indirectly modulate the respiration by modulate the activity of NTS, A1/C1 and A2/C2 neurons, Amb, and DMX.

In conclusion, the serotonergic neurons in the all raphe nuclei may increase the secretion of 5-HT and directly modulate the activities of respiratory neurons

throughout the VRC under hypoxic exposure. Thus, this serotonergic modulation of the VRC may play an important role in respiratory response to hypoxic exposure. In addition, the serotonergic neurons may modulate the activities of not only the VRC but also the NTS and the sympathetic and parasympathetic neurons under hypoxic exposure. These serotonergic modulations of these respiratory-related nuclei may indirectly affect the respiratory response to hypoxic exposure.