

令和元年5月29日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21306

研究課題名(和文) 頸動脈小体感覚神経終末のグルタミン酸による化学受容調節機構の解明

研究課題名(英文) Chemoreceptor regulation mechanism of glutamate in carotid body sensory nerve endings

研究代表者

横山 拓矢 (Yokoyama, Takuya)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：70772094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：頸動脈小体におけるグルタミン酸の機能を明らかにするために、グルタミン酸受容体の遺伝子発現と局在を検索した。RT-PCR法によって、頸動脈小体においてNMDA型受容体GluN1, 2A, 2BのmRNA発現が認められた。免疫組織化学では、GluN2AおよびGluN2B陽性反応が一部の化学受容細胞に観察された。また、GluN2AおよびGluN2B陽性反応を示す化学受容細胞の周囲には、小胞性グルタミン酸輸送体2陽性反応が観察された。以上の結果から、頸動脈小体感覚神経終末から分泌されたグルタミン酸はGluN2AおよびGluN2B受容体を介して化学受容細胞の機能を遠心性に増強している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頸動脈小体は血中ガスの変動をモニターする器官であるが、これまでの頸動脈小体に関する研究では、そのほとんどが血中ガスを感じ取る化学受容細胞に焦点が当てられていた。本研究は、化学受容細胞が検出した情報を中枢へ伝えるのみと考えられてきた感覚神経終末がグルタミン酸を分泌し、GluN型グルタミン酸受容体を介して化学受容細胞の機能を遠心性に調節しているという新たな調節経路が存在する可能性を見出した。今後、感覚神経終末のグルタミン酸が頸動脈小体の興奮調節に関与している事実を捉えることができれば、生体内酸素循環の制御や呼吸器疾患の治療に対して新たな考えを与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previous study has revealed that vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2), the vesicle loading protein for exocytosis of glutamate, is localized in sensory nerve endings of the carotid body. To clarify the exact function of glutamate in the carotid body, the present study investigated mRNA expression and immunohistochemical localization of the glutamate receptors in the rat carotid body. RT-PCR analysis detected the expression of mRNA for GluN1, 2A, and 2B, in extracts of the carotid body. Immunohistochemistry detected the immunoreactivities for Glu2A and GluN2B in a part of chemoreceptor cells. Furthermore, chemoreceptor cells immunoreactive for GluN2A and GluN2B were surrounded by VGLUT2 immunoreactivity. These findings suggest that glutamate released from sensory nerve endings elevate the function of chemoreceptor cells via GluN2A and GluN2B receptors.

研究分野：組織学

キーワード：頸動脈小体 免疫組織化学 グルタミン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

頸動脈小体は動脈血酸素分圧の変動をモニターする器官であり、環境変化や呼吸器疾患により生体が低酸素状態に陥ると、化学受容細胞が酸素分圧の低下を感知する。その後、細胞は神経伝達物質であるアデノシン三リン酸（ATP）を分泌し、舌咽神経の分枝である感覚神経（頸動脈洞枝）を興奮させることにより延髄へ低酸素の情報を伝える。その結果、呼吸反射が引き起こされ、呼吸数が増加することによって体内への酸素供給は正常に保たれている。

近年の報告で、低酸素による呼吸反射は興奮性物質であるグルタミン酸の受容体を阻害することで抑制されることが示されており、頸動脈小体の活性が組織内のグルタミン酸によって調節されている可能性が推測された。そこで、申請者は頸動脈小体におけるグルタミン酸分泌関連分子（小胞性グルタミン酸輸送体；VGLUT）の組織局在を検索したところ、舌咽神経の感覚神経終末に VGLUT2 が発現していることが分かった。この結果から、グルタミン酸は感覚神経終末から小胞分泌され、化学受容細胞あるいは神経終末自身へ遠心性に作用することによって頸動脈小体の興奮を増強しているのではないかと推測した。しかしながら、頸動脈小体におけるグルタミン酸の動態・作用の詳細は未だ明らかになっていない。

頸動脈小体の感覚神経終末が小胞分泌を引き起こす要因として、低酸素や ATP などが挙げられており、いずれも化学受容細胞の関与が予想される。しかしながら、これらの刺激によって感覚神経終末からグルタミン酸の分泌が惹起されるかについては不明である。また、グルタミン酸受容体の一種である NMDA 型受容体が化学受容細胞に発現していることを示した報告があるものの、その他の受容体（AMPA 型、カイニン酸型、代謝型）の発現や局在に関する報告はなく、頸動脈小体におけるグルタミン酸の作用部位は明らかでない。加えて、グルタミン酸に対する化学受容細胞や感覚神経終末の反応性は全く分かっていない。さらに、感覚神経である頸動脈洞枝は頸動脈小体の興奮を中枢へ伝える際に持続発火するという特徴がある。蝸牛の聴覚受容器や筋紡錘の伸展受容器においても受容器が刺激を検出している間、感覚神経が持続的に発火し、この持続発火の形成にグルタミン酸が関与していることが報告されている。しかしながら、グルタミン酸が誘起する頸動脈洞枝の神経活動変化に関する報告は全くなく、どのように呼吸反射調節に関与しているのかも明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、形態学的手法を用いて頸動脈小体におけるグルタミン酸受容体の局在を特定することを目的とした。また、イメージング解析により化学受容細胞と感覚神経終末のグルタミン酸に対する反応特性を明らかにすると共に、グルタミン酸に起因する呼吸反射調節の詳細を明らかにすることによって、低酸素時の呼吸反射に対する頸動脈小体感覚神経終末のグルタミン酸による化学受容調節機構を解明する予定であった。しかしながら、免疫組織化学法によるグルタミン酸受容体の局在解析が難航し、イメージング解析と呼吸反射に関する結果を得ることができず計画を変更した。一方で、研究途上で頸動脈小体および動脈圧受容器（頸動脈洞）に分布する頸動脈洞枝の感覚神経終末の重要性が明らかになってきたため、感覚神経終末の分布・形態についても検討することとした。以上を踏まえ、本研究は 3 つの実験から構成した。以下に、各項目における目的を示す。

（1）頸動脈小体におけるグルタミン酸受容体の局在解析

頸動脈小体および頸動脈洞枝の神経細胞体が集合する舌咽神経下神経節におけるグルタミン酸受容体の mRNA 発現を検索する。mRNA 発現が認められた受容体分子に関して、免疫組織化学的手法によりその局在を特定する。受容体分子の種類から、グルタミン酸による感覚神経

終末と化学受容細胞の興奮調節機構を考察する。

(2) 頸動脈小体に分布する感覚神経終末の形態学的解析

P2X 型 ATP 受容体を指標として、頸動脈小体に分布する感覚神経終末の分布・形態を解析する。また、P2X 陽性神経終末と化学受容細胞との関係性を多重蛍光抗体法により解析する。

(3) 頸動脈洞に分布する感覚神経終末の形態学的解析

頸動脈洞において動脈圧受容器として働く感覚神経終末の分布・形態を、P2X 型 ATP 受容体を指標として解析する。また、P2X 陽性神経終末における VGLUT の局在を検索し、動脈圧受容器においてもグルタミン酸の小胞分泌機構が存在するかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 頸動脈小体におけるグルタミン酸受容体の局在解析

材料として、Wistar ラット (8 週齢、雄) を用いた。ラットから頸動脈小体および舌咽神経下神経節を採取後、RT-PCR 法によって各組織に発現するグルタミン酸受容体分子を mRNA レベルで検索した。カニン酸型受容体 GluK1-5、NMDA 型受容体 GluN1-2、AMPA 型受容体 GluA1-4、代謝型受容体 mGluR1-7 のグルタミン酸受容体に対する遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR 法を実施した。次に、ラットを 4%パラホルムアルデヒド加 0.1M リン酸緩衝液で灌流固定後、頸動脈分岐部を採取し、頸動脈小体を含む凍結切片を作製した。mRNA の発現が確認されたグルタミン酸受容体に対する抗体と以下の免疫組織化学的マーカーを併用して、切片を多重蛍光抗体法により染色した。作製した標本は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、頸動脈小体におけるグルタミン酸受容体の局在を解析した。

化学受容細胞のマーカー：チロシン水酸化酵素 (TH)、ドパミンβ水酸化酵素 (DBH)

グルタミン酸分泌部位のマーカー：VGLUT2

(2) 頸動脈小体に分布する感覚神経終末の形態学的解析

ラットを灌流固定後、頸動脈分岐部を採取した。頸動脈小体を含む凍結切片を作製後、以下の抗体を用いて蛍光抗体法により染色した。作製した標本は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、感覚神経終末の免疫組織化学的特性、形態および化学受容細胞との関係性を解析した。

使用した抗体：P2X3 型 ATP 受容体 (P2X3)、P2X2 型 ATP 受容体 (P2X2)、TH、DBH

(3) 頸動脈洞に分布する感覚神経終末の形態学的解析

ラットを灌流固定後、頸動脈分岐部のホルマウント標本または凍結切片を作製し、以下の抗体を用いて蛍光抗体法により染色した。作製した標本は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、感覚神経終末の分布・形態および免疫組織化学的特性を解析した。

使用した抗体：P2X3、P2X2、S100、S100B、VGLUT1-3

4. 研究成果

(1) 頸動脈小体におけるグルタミン酸受容体の局在解析

RT-PCR 法によってグルタミン酸受容体 mRNA を検索した結果、頸動脈小体の抽出産物では、カニン酸型受容体 GluK2, 3, 5、NMDA 型受容体 GluN1, 2A, 2B、AMPA 型受容体 GluA1-4、代謝型受容体 mGluR1, 5, 7 の mRNA 発現が認められた (図 1 左)。一方で、舌咽神経下神経節の抽出産物では、GluK1-5、GluN1, 2A, 2B、GluA1-4、mGluR1-7 の mRNA 発現が認められた (図 1 右)。したがって、グルタミン酸受容体は頸動脈小体と感覚神経終末の双方に発現していることが示唆された。mRNA の発現が確認されたグルタミン酸受容体のうち、頸動脈小体における GluN2A および GluN2B の局在を免疫組織化学的に精査した。GluN2A

陽性反応および GluN2B 陽性反応は TH 陽性化学受容細胞の核周囲細胞質において観察された。一方で、DBH 陽性化学受容細胞には GluN 陽性反応は認められなかった。また、GluN2A 陽性および GluN2B 陽性反応を示す化学受容細胞の周囲には、点状の VGLUT2 陽性反応が観察された (図 2)。以上の結果から、頸動脈小体感覚神経終末から小胞分泌されたグルタミン酸は一部の化学受容細胞に発現する GluN2A 受容体および GluN2B 受容体に作用していることが示唆された。一般に、グルタミン酸は GluN 受容体に結合すると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することが知られている。化学受容細胞は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって神経伝達物質を分泌することが報告されているので、感覚神経終末から放出されたグルタミン酸は化学受容細胞の機能を遠心性に増強しているのかもしれない。今後の課題として、GluN 型以外のグルタミン酸受容体の局在解析、化学受容細胞および感覚神経に対するグルタミン酸の反応特性の解析、低酸素呼吸反射に対するグルタミン酸の作用の解析等が挙げられる。

図 1. 頸動脈小体および舌咽神経下神経節におけるグルタミン酸受容体の mRNA 発現

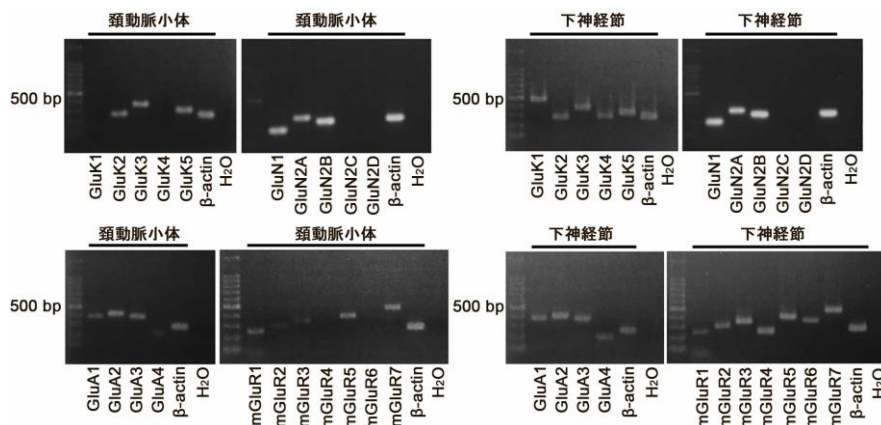
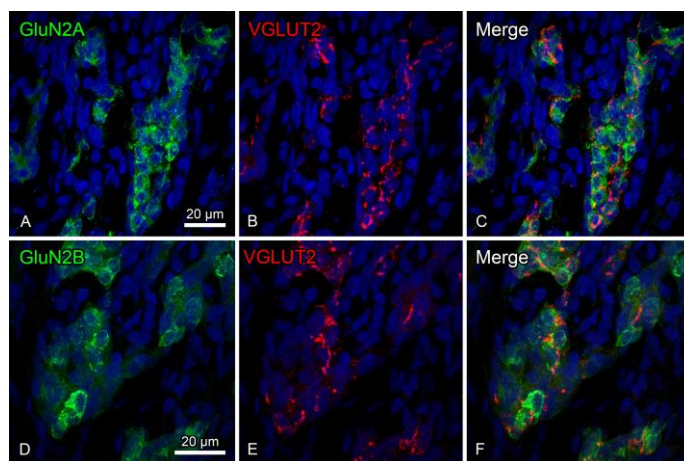


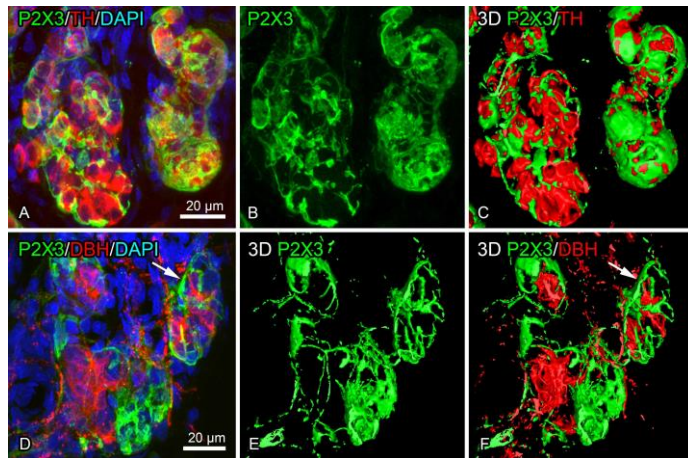
図 2. 頸動脈小体化学受容細胞における GluN2A 受容体および GluN2B 受容体の局在



(2) 頸動脈小体に分布する感覚神経終末の形態学的解析

P2X2 陽性反応および P2X3 陽性反応を示す神経終末は頸動脈小体において広範に分布しており、終末上に認められる P2X2 陽性反応は P2X3 陽性反応と一致していた。P2X3 と化学受容細胞のマーカーである TH と二重染色では、TH 陽性反応を示す化学受容細胞の集団が広範に認められ、その周囲や細胞間に P2X3 陽性神経終末が観察された (図 3A, B)。立体再構築法によって、P2X3 陽性神経終末は細胞集団に接する直前で平板状の末端部を形成して周囲を緊密に包み込んでいることが分かった (図 3C)。一方で、DBH との二重染色では、一部の化学受容細胞において DBH 陽性反応が認められ、その周囲に P2X3 陽性神経終末は密に分布していなかった (図 3D-F)。したがって、化学受容細胞に発現する分子によって感覚神経終末の分布の違いがあることが示唆された。

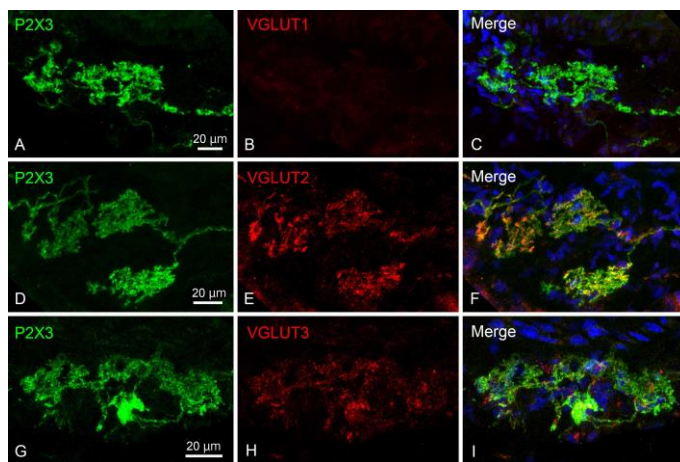
図 3. 頸動脈小体に分布する P2X3 陽性神経終末と化学受容細胞との形態学的関係



(3) 頸動脈洞に分布する感覚神経終末の形態学的解析

ホールマウント標本では、P2X3 陽性神経終末は頸動脈分岐部から約 1mm 離れた内頸動脈壁に分布していた。神経終末は、分岐を繰り返す神経線維と葉状・平板状の軸索終末部で構成されていた。内頸動脈の横断切片では、P2X3 陽性神経終末は血管外膜に分布していた。軸索末端部は S100 陽性反応および S100B 陽性反応を示す終末シュワン細胞によって緊密に取り囲まれていた。また、P2X3 陽性神経終末には P2X2 陽性反応、VGLUT2 陽性反応 (図 4D-F) および VGLUT3 陽性反応 (図 4G-I) が認められたことから、頸動脈洞に分布する感覚神経終末においてもグルタミン酸が小胞分泌されていることが推測された。

図 4. 頸動脈洞に分布する P2X3 陽性神経終末における VGLUT の局在



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Yokoyama T, Settai K, Nakamuta N, Yamamoto Y (2019) Distribution and morphology of baroreceptors in the rat carotid sinus as revealed by immunohistochemistry for P2X3 purinoceptors. *Histochem Cell Biol* 151, 161-173. doi: 10.1007/s00418-018-1734-1. (査読あり)
2. Yokoyama T, Takemoto M, Hirakawa M, Saino T (2019) Different immunohistochemical localization for TMEM16A and CFTR in acinar and ductal cells of rat major salivary glands and exocrine pancreas. *Acta Histochem* 121, 50-55. doi: 10.1016/j.acthis.2018.10.013. (査読あり)
3. Yamamoto Y, Ozawa Y, Yokoyama T, Nakamuta N (2018) Immunohistochemical characterization of brush cells in the rat larynx. *J Mol Histol* 49, 63-73. doi:

10.1007/s10735-017-9747-y. (査読あり)

4. Yokoyama T, Yamamoto Y, Saino T (2017) Serotonin-mediated modulation of acetylcholine-induced intracellular calcium responses in chromaffin cells isolated from the rat adrenal medulla. *Neurosci Lett* 644, 114-120. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.048. (査読あり)
5. Yokoyama T, Saino T, Nakamuta N, Kusakabe T, Yamamoto Y (2016) Three-dimensional architectures of P2X2-/P2X3-immunoreactive afferent nerve terminals in the rat carotid body as revealed by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol* 146, 479-488. doi: 10.1007/s00418-016-1458-z. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. 日下部辰三, 加藤弘毅, 横山拓矢, 羽田克彦, 中牟田信明, 山本欣郎 (2019) ラット頸動脈小体における VMAT1 および VMAT2 の局在. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (新潟) 3 月.
2. 横山拓矢, 山本欣郎, 加藤弘毅, 平川正人, 齋野朝幸 (2019) ラット頸動脈小体における小胞型ヌクレオチド輸送体 VNUT の免疫組織化学的分布. 第 24 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (新潟) 3 月.
3. 平川正人, 横山拓矢, 齋野朝幸 (2019) ラット胃幽門前庭に分布する P2X3 陽性神経終末の免疫組織化学的特徴. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (新潟) 3 月.
4. 横山拓矢, 平川正人, 齋野朝幸 (2018) ラット副腎におけるインクレチン受容体の免疫組織化学的分布. 日本解剖学会第 64 回東北・北海道連合支部学術集会 (十和田) 9 月.
5. 平川正人, 横山拓矢, 齋野朝幸 (2018) ラットの胃における P2X3 型 ATP 受容体陽性神経終末の形態. 日本解剖学会第 64 回東北・北海道連合支部学術集会 (十和田) 9 月.
6. 横山拓矢, 齋野朝幸 (2018) 胎生期および生後ラット頸動脈小体における P2X 型 ATP 受容体免疫反応性の分布. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (武蔵野) 3 月.
7. 竹本正人, 横山拓矢, 内田旬, 中村亘佑, 齋野朝幸 (2018) ラットの唾液腺と涙腺における塩素チャネル TMEM16A と CFTR の分布. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (武蔵野) 3 月.
8. 横山拓矢, 齋野朝幸 (2017) 雌雄ラットの尿道に存在するセロトニン陽性内分泌細胞の組織分布および神経支配. 日本解剖学会第 63 回東北・北海道連合支部学術集会 (弘前) 9 月.
9. 横山拓矢, 山本欣郎, 齋野朝幸 (2017) ラット頸動脈小体における小胞性グルタミン酸輸送体 VGLUT2 陽性反応を示す感覚神経終末. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (長崎) 3 月.
10. 横山拓矢, 山本欣郎, 齋野朝幸 (2016) ラット副腎髄質細胞におけるセロトニンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制的調節. 日本解剖学会第 62 回東北・北海道連合支部学術集会 (帯広) 9 月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 拓矢 (Yokoyama, Takuya)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70772094