

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790196

研究課題名（和文） 循環調節中枢ニューロンによる化学受容性応答と高血圧疾患の関連性の解析

研究課題名（英文） Analysis of the relationship between chemosensitive responses of the cardiovascular neurons and hypoxia

研究代表者

小金澤 禎史 (KOGANEZAWA TADACHIKA)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80431691

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、循環調節中枢ニューロン自体が低酸素感受性を持っていることが明らかとなった。中枢性高血圧の原因を解明するために、ラットの人工脳脊髄液灌流標本を用いて、機能的に同定された循環調節中枢ニューロンからのパッチクランプ法による膜電位測定方法を確立した。また、循環調節中枢ニューロンに対するシナプス入力を高血圧モデル動物と正常動物において比較したところ、高血圧モデル動物では循環調節中枢ニューロンへの抑制性シナプス入力が減弱している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This project demonstrated that cardiovascular neurons have chemosensitivity into hypoxia. In order to investigate into the cause of hypertension, I also established the current clamp recording of the functionally identified cardiovascular neurons in the in situ arterially perfused preparation of rats. We also compared synaptic inputs into the cardiovascular neurons in normotensive and hypertensive rats. As a result, it is suggested that inhibitory inputs into the cardiovascular neurons are attenuated in the hypertensive rats compared to normotensive rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：自律神経生理

科研費の分科・細目：基礎医学、生理学一般

キーワード：循環調節・高血圧・交感神経・化学受容器・低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 高血圧

高血圧は、脳卒中、腎疾患、心疾患などの原因となる世界的にもきわめて重大な疾患である。現時点では、高血圧患者のほとんどが、原因が明確ではない本態性高血圧に分類されており、このような現状においては、血圧調節の基本的なメカニズムを再検討する必

要がある。

## (2) RVLMニューロン

in vivo 実験において、心臓・血管運動を支配する交感神経活動を記録すると、自発的な活動を観察できる。また、吻側延髄腹外側部（RVLM）に存在する交感神経のプレモーター・ニューロン（RVLMニューロン）からも自

発的な活動を同時に記録でき、RVLM を破壊すると交感神経の緊張性放電が消失する。これらのことから、末梢交感神経の自発的な活動は、RVLM ニューロンの自発性放電に起因するものであり、RVLM ニューロンは交感神経活動を興奮性に駆動しているものと考えられている。

### (3) 中枢性高血圧の原因

高血圧患者においては、交感神経活動の慢性的な亢進がみられることが知られている。また、近年、高血圧患者において、先天的要因による脳内の血流不足、すなわち、中枢性低酸素が高血圧疾患をもたらしている可能性を示唆する報告がなされた。しかしながら、交感神経活動の亢進に基づく中枢性高血圧の発生メカニズムについての詳細は不明なままである。

## 2. 研究の目的

(1) in situ 標本であるラットの人工脳脊髄液灌流標本を用いた RVLM ニューロンの低酸素に対する応答性の解析。

(2) 人工脳脊髄液灌流標本において、機能的に同定された RVLM ニューロンから効率的なパッチクランプ記録を行う方法の確立。

(3) RVLM ニューロンからのパッチクランプ記録の特性を確認するために、RVLM ニューロンからの細胞外記録とパッチクランプ記録による解析結果の基本的特徴を比較検討する。

(4) これまでに他の細胞において報告されている低酸素センサーを薬理的に修飾した際の低酸素性応答への影響を検討。

## 3. 研究の方法

### (1) 標本

実験には、ラットの人工脳脊髄液灌流標本を用いた。

### (2) 低酸素負荷

低酸素刺激は、灌流液を通気させる混合ガスの組成を変化させることによって行った（通常時：95%O<sub>2</sub>，5%CO<sub>2</sub>；低酸素時：5%O<sub>2</sub>，5%CO<sub>2</sub>，90%N<sub>2</sub>）

### (3) ニューロンおよび神経活動の記録

RVLM ニューロンからの記録は、細胞外誘導法またはブラインドパッチクランプによる膜電位測定により行った。ガラス吸引双極電極により、横隔神経活動および交感神経活動の記録を行った。

### (4) RVLM ニューロンの同定

RVLM ニューロンの機能的な同定には①存在

部位（記録電極内の色素により記録部位をマークし、記録後に組織切片より確認）②自発活動の確認③脊髄への投射（脊髄背外側索刺激に対する逆行性スパイクの有無を確認することによる）④動脈圧受容器刺激に対する動脈圧受容器反射を介した抑制性応答④末梢化学受容器刺激に対する興奮性応答⑤ RVLM ニューロン活動と交感神経活動の相関性解析、を用いた。

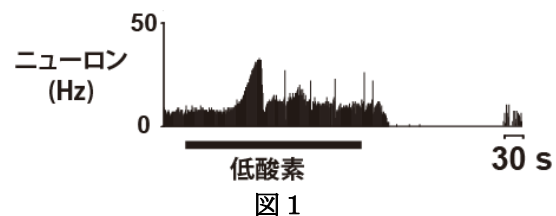
### (5) 薬理的処置

シナプス伝達の修飾、予想される低酸素センサーの阻害等、標本への薬理的な処置は人工脳脊髄液中へ薬物を投与することにより行った。

## 4. 研究成果

### (1) 低酸素負荷に対する RVLM ニューロンの応答

in situ 標本において、低酸素を負荷したところ、交感神経が興奮性応答を示した。この交感神経の興奮性応答の原因が、RVLM ニューロンの低酸素感受特性によるものかどうか明らかにするために、RVLM ニューロンから細胞外記録を行い、RVLM ニューロンの低酸素負荷に対する応答を検討したところ、RVLM ニューロンに対するシナプス伝達を薬理的に遮断した状況においても RVLM ニューロンは興奮性応答を示した（図1）。このことは、RVLM ニューロン自体が低酸素感受性を持ち、この特性により、低酸素負荷に対して交感神経が大きく亢進する可能性が示唆された。



### (2) RVLM ニューロンのパッチクランプ記録

これまでに、機能的に同定された RVLM ニューロンからのパッチクランプ記録の報告はないために、安定的に機能的に同定された RVLM ニューロンからのブラインドパッチクランプ記録を行う方法の確立を試みた。その結果、RVLM ニューロンに対して、延髄背側からアプローチするよりも、延髄腹側からアプローチする方が、シールの形成状況が格段に改善した。このことは、延髄背側からアプローチするよりも、延髄腹側からアプローチする方が、脳表面から RVLM ニューロンまでの距離が短くて済むために、ピペット先端の汚れが軽微で済むためと考えられる。

### (3) 細胞外誘導法およびパッチクランプ法

### によるRVLMニューロン活動の記録の比較

RVLMニューロンに対する他のニューロンからの活動調節状況の検出感度を呼吸性活動を基に細胞外記録とパッチクランプ記録による解析結果から比較した。その結果、呼吸活動に同期したRVLMニューロンへのシナプス入力、時に、活動電位を発生させる閾値下の脱分極や過分極のような細胞外記録によるスパイク解析では検出可能な膜電位変化を生じさせていることがパッチクランプ記録により明らかとなった。このことは、RVLMニューロンに対するシナプス入力を検出する上で、パッチクランプ記録が細胞外記録よりも有用であることを示唆している。

### (3) 正常ラットと高血圧モデルラットにおけるパッチクランプ記録

RVLMニューロンの呼吸性シナプス入力の特徴を正常ラットおよび高血圧モデルラットにおいて比較した。その結果、正常ラットと比較して、高血圧モデルラットでは、RVLMニューロンに対する吸息時の抑制性入力が減弱していることが明らかとなった。このことは、高血圧モデルラットにおいては、RVLMニューロンへの抑制性入力の減弱が、結果として、交感神経活動の亢進をもたらしている可能性を示唆している。

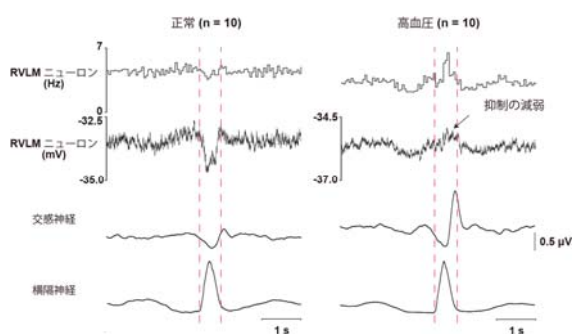


図2

また、呼吸性調節を受けるRVLMニューロンの割合を正常ラットおよび高血圧モデルラットにおいて比較した。その結果、正常ラットでは30%のニューロンが呼吸性シナプス入力を受けていなかった。一方、高血圧モデル動物においては、すべてのRVLMニューロンが呼吸性シナプス入力を受けていた。このことは、高血圧モデルラットでは、正常ラットと比較して、RVLMニューロンが受ける呼吸性シナプス入力の割合が増加しており、このことが交感神経活動の亢進をもたらし、結果として、高血圧を惹起している可能性を示唆している。

### (4) 交感神経活動に対する薬物の影響

これまでに、RVLMニューロン以外の細胞において、低酸素感受性センサーとしての役割が

示唆されている。Hemeoxygenase, Gap junction hemichannel, TRPA1 channel, TRPM2 channel とRVLMニューロンの低酸素感受性との関連性を検討するために、それぞれの阻害薬投与前後での、低酸素負荷に対する交感神経の応答性を比較したところ、いずれの薬物を投与した場合においても、薬物投与前後における低酸素負荷に対する交感神経の興奮性応答に変化は見られなかった。このことは、RVLMニューロンの低酸素感受性機構には、これまでに他の細胞で知られている低酸素センサーとは異なる、全く新しい低酸素センサーが用いられている可能性を示唆している。

また、 $\mu$ -オピオイド受容体作動薬を投与したところ、 $\mu$ -オピオイド受容体作動薬は呼吸リズムの形成機構を大きく変化させることが明らかになった。このことは、高血圧モデル動物における交感神経活動の亢進をもたらす原因の一つである可能性を示唆されたRVLMニューロンの呼吸性調節機構を解明する上で、重要なツールとなるものと考えられる。

以上のことより、本研究課題においては、ラットの人工脳脊髄液灌流標本を用いて、RVLMニューロン自体が低酸素感受性を持つこと、機能的に同定されたRVLMニューロンからのパッチクランプ法による膜電位測定方法を確立した。また、循環調節中枢ニューロンに対するシナプス入力を高血圧モデル動物と正常動物において比較したところ、高血圧モデル動物では循環調節中枢ニューロンへの抑制性シナプス入力が減弱している可能性が示唆された。これらの結果は、今後の中枢性高血圧研究を飛躍的に進展させるものと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Tadachika Koganezawa, Yasumasa Okada, Naohito Terui, Julian F.R. Paton, Yoshitaka Oku A  $\mu$ -opioid receptor agonist DAMGO induces rapid breathing in the arterially perfused in situ preparation of rat. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 査読有, 177(2), 207-211 (2011)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 小金澤禎史、岡田泰昌、照井直人、Julian F.R. Paton、越久仁敬 ラット人工脳脊髄液灌流標本において $\mu$ -オピオイド受容体作動薬 DAMGO は頻呼吸を誘発する 第89回日本生理学会大会、2012年3月31

- 日、松本
- ② 小金澤禎史、照井直人 交感神経活動亢進による高血圧の発生機構 第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 29 日、横浜
  - ③ 小金澤禎史、照井直人 循環調節中枢における化学受容性応答 第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 20 日、盛岡
  - ④ Tadachika Koganezawa, Naohito Terui, Anthony E. Pickering and Julian F. R. Paton Whole cell patch recording of sympathetic pre-motor neurons in the medulla oblongata in the in situ arterially perfused preparation of the neonatal rat. 6th Congress of The International Society for Autonomic Neuroscience, 2009 年 9 月 3, 4 日, Sydney
  - ⑤ Tadachika Koganezawa, Naohito Terui and Julian F. R. Paton Whole cell patch recording from sympathetic pre-motor neurons in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) of the neonatal rat in situ Society for Neuroscience 39th Annual Meeting, 2009 年 9 月 19 日, Chicago

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小金澤 禎史 (KOGANEZAWA TADACHIKA)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80432691