

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08157

研究課題名(和文) 静脈血管平滑筋は動脈血管平滑筋と異なる収縮機転を示すか

研究課題名(英文) Different characters between venule and arteriole smooth muscles

研究代表者

佐藤 洋一 (Satoh, Yoh-ichi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：40118253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：脈管平滑筋細胞は、多くの研究対象になっているにもかかわらず、静脈系の血管平滑筋に着目した知見は少ない。機能と形態の面から解析を加えたところ、動脈系は紡錘形をした平滑筋細胞が血管を取り巻くように配列してノルアドレナリンやアンギオテンシンのような昇圧物質に対して反応するだけでなく ATP やセロトニンに対しても反応した。静脈系では短楕円形の平滑筋細胞が長軸方向に配列しており、昇圧物質にしか反応しなかった、静脈系の平滑筋細胞の働きは動脈系とはかなり異なり、意義も見直す必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Very few data has been available on physiological characters of smooth muscle cell (SMC) of vein/venule. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) plays an essential role in stimulus-response coupling in a great variety of tissue/cells, including vascular SMC. We observed $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics of SMC of intact venules to clarify which transmitters can elicit any response of venules, and compared with those of SMC of arterioles. SMC of arterioles are fusiform in shape, while those of venules are polygonal. 5-Hydroxytryptamine (5-HT), ATP, NorAdr, and angiotensin II elicited an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in most SMC of arterioles. On the contrary, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in SMC of venules during 5-HT or ATP stimulation was faint, but NorAd and Angiotensin II can induce an evident increase in SMC. This may mean the reduction of vascular volume of venous system can play a pivotal role in increase of systemic blood pressure.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細静脈 細動脈 血管平滑筋 細胞内カルシウム変動 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまで、組織形態を保った生組織標本を用いて細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動の画像解析を行ってきたが、異種細胞間あるいは臓器・組織間に著しい機能的な差異があることを指摘してきた。とりわけ細動脈の血管平滑筋は、形態が似かよっていても、部位毎に収縮・拡張調節機能が違っていることが明らかになった(血管径や臓器に応じて、反応する伝達物質・修飾物質や受容体のサブタイプが異なっていた)。(Saino et al., 2002; Matsuura et al., 2004; Misaki et al., 2006, 2008; Saino et al., 2008; Masu et al., 2008; Tamagawa et al., 2009, in press)。

体内の血液のおよそ 64% は、静脈系に含まれており、血流動態を考える上で、静脈の収縮・拡張は重要な意味を持っていると思われる。カルシウムイメージング用に採取した標本のイメージからは、細静脈壁の血管平滑筋の形は通常の平滑筋のように紡錘形をしておらず、多角形をしており敷石状に配置している。形が違うのであれば自ずと生理的役割も異なるであろう。しかしながらこうした平滑筋が収縮した場合、動脈系のように血管内腔の径を狭める効果があるのか、判然としない。あるいは、血管壁をよじらせることで内皮細胞間の隙間をあけるような効果がでてくるとしたら、血管外漏出を生起させることも考えられ、ノルアドレナリンの静脈内投与で、皮下の浮腫が生じる例も報告されている(Kim et al., 2012)。

自験例と現在までなされた報告を渉猟した結果、細静脈系の血管平滑筋がいかなる生理活性物質によって、どのような反応を生じ、更には平滑筋細胞の収縮が、組織内血流と浮腫形成にどんな関与をしているか、殆どわかっていない、と判断するに至った。臨床現場に於いて、発赤、腫脹や鬱血は日常目にするものとはいえ、病変部で細静脈がどのような変化を生じているか詳細な病

態生理機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、各種生理活性物質が各部臓器の細静脈血管平滑筋に及ぼす効果を、細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動の解析と、電子顕微鏡 (STEM モード) による形態学的な手法を組み合わせ、機能と形態の面から検討する。

3. 研究の方法

● カルシウムイメージング

【標本】

標本採取法は、これまでの Ca^{2+} imaging 方に準じた。Rat (Wistar) から臓器を取り出し、できるだけ組織形態を保ったままの標本とするため、採取組織・細胞は保護的作用のある BSA を加えたリンゲル液内で処理し、純化コラゲナーゼで結合組織を除去して、細動脈あるいは細静脈標本(いずれも直径約 50 μm) を得た。標本にはカルシウム感受性色素の Indo-1 を負荷し、灌流液中に各種刺激物質(一般的に昇圧物質と見なされるカテコールアミン、アンギオテンシン類と、局所血流調節をおこなうと見なされる各種生理活性アミンやプリン誘導体)を加えて、カルシウム濃度の濃度変動を時系列的に観察した。細胞質カルシウムはチャネルを介した細胞外からの流入あるいはまた GPCR と IP_3 を介した細胞内カルシウム貯蔵場からの放出の二つの機構が考えられることから、細胞外カルシウムを除去あるいはサブシガルギンで細胞内カルシウム貯蔵場を枯渇させた場合に反応が生じるかどうかを観察した。

【カルシウムイメージング用顕微鏡】

紫外線励起のできる高速共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Nikon RCM-8000 改良型) で、Indo-1 負荷標本を観察し、 $[Ca^{2+}]_i$ を表す擬似カラー画像を取得し、各細胞に ROI を定め

て時系列的な変化を解析した。

得られた画像データは RCM の画像解析プログラムでデータ処理するとともに、Image J とプラグインを使って TIFF あるいは JPEG 画像とし、動画作成をおこなった。

● 電子顕微鏡観察

【組織標本】

分離単離脈管標本と、通常の組織標本を用いた。化学固定は通常のカルノフスキー液同様にグルタルアルデハイドとパラフォルムアルデハイドの混合液による前固定、次いで四酸化オスミウムによる後固定からなる一般的な電子顕微鏡用の固定をおこなったが、単離標本は周りの結合組織が無いため通常のアルデヒド液の濃度では浸透圧が高すぎ、組織の変形がおきる可能性があることから、濃度を半減したものをを用いた。いずれもエポン樹脂に包埋し、固化後に順調薄片（厚さ $1\ \mu\text{m}$ ）を連続して得た。

標本を、スライドガラス（松波硝子工業株式会社、大阪）に載せ、トルイジンブルーで染色し、厚切り標本を得た。光学顕微鏡で顕鏡後、トリミングし、厚さ $100\ \text{nm}$ の薄い切片を連続で作製した。連続切片は導電性を保つ為、スズでコーティングされた SEM 用スライドガラス（日新 EM、東京）に載せた。連続切片はリボン状になっていたが、それをそのままスライドガラス上へ載せた。通常の透過型電子顕微鏡では 1~2 切片を観察グリッドに載せるのに対し、一度に約 100 切片を標本とすることが可能であった。

電子染色は 1% 酢酸ウラン水溶液を滴下し 30 分染色後、硝酸鉛水溶液にて 5 分間染色した。

【電子顕微鏡標本】

電界放出型走査電子顕微鏡（SU8010，HITACHI，東京）にスライドガラスをセットし、加速電圧を加えた（ 1.5kV ）。半導体反

射電子検出器を用いて、反射電子画像は $2560 \times 1920\ \text{pixels}$ で取得した。低倍率にて標本探索し、高倍率にてピント合わせた。このときに像が歪むようであれば高倍率で非点補正を行った。タイリング機能で任意の範囲の画像を自動で撮影した。画像処理はフリーウェアの画像処理プログラム（ImageFiji，<http://fiji.sc/Fiji>）を用いて、走査電子顕微鏡のタイリング機能で撮影した複数の画像を自動的に並べ、モンタージュ画像を作製した。走査電子顕微鏡で得られた画像は、透過型電子顕微鏡と明暗が反対である為、Photoshop®（Adobe INC，CA，USA）を用いて明暗を反転させ、通常の透過電子顕微鏡像と同じ画調にした。

4. 研究成果

【結果】

精巣の細静脈は、細動脈では著しい $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と明瞭な収縮を引き起こしたセロトニンや ATP に対しては、殆ど反応を示さなかった。但し眼の細静脈はセロトニンに対して、細静脈同様に反応を引き起こした。一方、いわゆる昇圧物質として知られるノルアドレナリンとアンギオテンシンに対しては細静脈の平滑筋細胞は明かな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と細胞の収縮を生じた。細胞外カルシウムを抜くことでカルシウム上昇は抑えられなかったにもかかわらず、サブシガルギンで細胞内カルシウム貯蔵場を枯渇させると、これらの反応は顕著に抑制されたことから、カテコールアミンやアンギオテンシンによる反応は IP_3 を介した細胞内カルシウム動員機構によるものと推察された。

走査型顕微鏡 STEM 像を用いて細静脈の横断面を観察したところ、細動脈の横断面では、平滑筋細胞は 2~3 層に重なっており、縦断面では平滑筋細胞がすき間なく輪走に血管を取り巻いている様子が確認できた。立体再構築してみると全体として細動脈平滑筋は

紡錘形をしており、橢円状の核の長軸は細動脈長軸と直行していた。これらは一般的に描かれてきた動脈の平滑筋細胞と変わるところは無い。一方、細静脈の横断面では、マイクロフィラメントを含む平滑筋細胞は同定できる数が少なく、まばらにしか存在していなかった。縦断面でも平滑筋細胞数は少なく、平滑筋細胞どうしは離れて存在していた。また、核の長軸方向は細静脈の直軸に沿っていた。これは静脈の平滑筋細胞がむしろ静脈の長軸方向に伸びていることを意味する。立体構築してみると細静脈平滑筋細胞は、紡錘形と言うよりは、多数の突起のある短い紡錘形あるいは敷石状を呈していた。この結果は、単離標本でも通常の組織でも、同じであったことから、細静脈平滑筋細胞の想定外の形状は、単離作業に伴う人工産物ではないと思われる。

【考察】

昇圧作用のある神経伝達物質は、通常は細動脈平滑筋細胞を収縮させて内腔を狭めることで血圧上昇を引き起こすとされている。しかしながら、我々の組織形態を保ったままの脈管標本を用いた先行研究では、セロトニンやATPが、更に強い反応を引き起こすことが証明されたが、一般的にはこれらは昇圧作用があると認められてはいない。セロトニンやATPは組織血管の損傷時に局所的に濃度が高くなり、血管を収縮させて止血作用に寄与すると思われるが、全身の血圧を上げるに至らない。一方、ノルアドレナリンやアンギオテンシンは、確かに細動脈平滑筋にも働くとは言え、これも細動脈だけの収縮で全身の血圧上昇を引き起こす、と結論はできない。むしろ、今回示したように、容量血管たる静脈の壁の緊張度を高めることで、心臓への静脈帰還量を減らさないことが肝要では無いかと考える。

この仮説を検証するためには、当初予定していた太い静脈の平滑筋細胞の反応性を観

る必要があったが、太い静脈は収縮に伴い焦点面から標本がずれてしまうことで、計測が思うように進まず、期間内に仕上げる事が出来なかった。

眼の脈管は、発生学的に眼球は脳の突出とみなされるだけに、眼の静脈の平滑筋細胞の反応性が他の体組織の平滑筋細胞と異なることは容易に推察できる。脈管平滑筋は、臓器ごとにその反応性が多様化していると思われることから、上記の「静脈血管壁の緊張が血圧上昇に寄与している」という仮説も、多くの臓器で検証する必要があるだろう。

尤、太い静脈と細静脈の平滑筋の意義も異なっていることが、形態学的観点からも推察できる。細静脈の平滑筋細胞は、一般的に思い描かれている紡錘形の形をしておらず、しかも細胞どうしが密に接合していない。脈管長軸方向に沿ってまばらに配列しているこの平滑筋細胞が収縮したとしても、脈管内腔を狭める効果は殆ど期待できないと思われる。むしろ、平滑筋の収縮は、細動脈内皮の形を変形させる意味が大きいのではなかろうか。細静脈は炎症性細胞の出入りでも有り、内皮細胞間に隙間をつくることはそうした細胞の出入りを容易にさせる機構になっているのかもしれない。この仮説は、内皮細胞と血管平滑筋の同時イメージングによって証明されると思われる。

【結論】

細静脈平滑筋細胞は、形態と機能が細動脈平滑筋細胞とは異なっている。

【展望】

現在、脈管平滑筋細胞は様々な疾患の治療ターゲットになっていることから、膨大な研究費が平滑筋細胞の研究に費やされている。しかしながら、その殆どが培養された大動脈由来の“元”平滑筋細胞によるものであり、本来の生体内にあって多様な役目を果たしている脈管平滑筋を要素還元的に取り扱うことは間違いであろう。現在の平滑筋細胞の研

究は本質をついたものになっていないのではないかと、危惧するものである。

期限内に終了しなかった計画ではあるが、研究を継続して、上記の疑問点を明らかにしたい。

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7件)

1. Ikeda-Kurosawa C, Higashio H, Nakano M, Okubo M, Satoh Y, Kurosaka D, Saino T: α 1-Adrenoceptors relate Ca^{2+} modulation and protein secretions in rat lacrimal gland. Biomed Res. 36(6):357-69 (2015). DOI: 10.2220/biomedres.36.357.
2. Ookubo M, Satoh Y, Hirakawa M, Sasaki K, Masu K, Ikeda-kurosawa T, Kurosaka D, Saino T: Different effect of serotonin on intracellular calcium ion dynamics in the smooth muscle cells between rat posterior ciliary artery and vorticosse vein. T. Biomedical Research 37(2): 101-115 (2016). DOI: 10.2220/biomedres.37.101
3. Moriguchi-Mori K, Higashio H, Isobe K, Kumagai M, Sasaki K, Satoh Y, Kuji A, Saino T: P2Y purinoceptors mediate ATP-induced changes in intracellular calcium and amylase release in acinar cells of mouse parotid glands. Biomed Res 37(1):37-49(2016). doi: 10.2220/biomedres.37.37.
4. Higashio H, Satoh Y, Saino T: Mast cell degranulation is negatively regulated by the Munc13-4-binding small-guanosine triphosphatase Rab37. Sci Rep. Mar 2;6:225392016 (2016) doi: 10.1038/srep22539.
5. Mchonde GJ, Satoh Y, Yasuhira S, Maesawa C, Saino T. Intracellular calcium dynamics and expression of P2Y and IP3 receptors in a cycling G1-phase cell. Bioimages 24:13-29 (2016).
6. Higashio H, Satoh Y, Saino T: Inhibitory role of Munc13-1 in antigen-induced mast cell degranulation. Biomed Res 38(6):321-329 (2017).
7. Isobe K, Yokoyama T, Moriguchi-Mori K, Kumagai M, Satoh YI, Kuji A, Saino T. Role of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in intracellular calcium dynamics of neurons and satellite cells in rat superior cervical ganglia. Biomed Res. 38(2):99-109 (2017).

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 洋一 (Satoh, Yoh-ichi)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40118253

(2)研究分担者

齋野 朝幸 (Saino, Tomoyuki)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40305991

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()