

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08516

研究課題名(和文)微量アミン関連受容体は脳血管に影響を及ぼすのか？ - 脳細動脈を用いた形態機能解析

研究課題名(英文) Do trace amine associated receptors (TAARs) affect the contraction mechanism on cerebral vessels? - functional analysis using a real-time confocal microscope-

研究代表者

齋野 朝幸 (SAINO, TOMOYUKI)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：40305991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：微量アミン(trace amine：TA)は、脳神経疾患に関係していると注目されている。我々はTA受容体に着目し、細動脈平滑筋細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)変動を基に解析・検討した。RT-PCRにて全ての受容体発現を確認した。強発現のTA受容体1に着目した。Agonistによって[Ca²⁺]_i上昇反応がないものが存在した。反応する3-iodothyronamineの反応を確認したところ、細胞内ストアからのCa²⁺放出がメインの受容体であると思われた。実験結果からTAAR agonistによって細胞内情報伝達系での影響が異なり、自身に加え、他の受容体にも関連している可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微量アミンが脳血管特に細動脈に反応をもたらすことが示された。現在の所、成人病として高血圧の重要性は他者も認めるところではある。血管平滑筋細胞は、様々な疾患の原因・治療のターゲットとなっている。このため今まで膨大な研究費がその研究に費やされている。しかしながら、その多くが培養された血管平滑筋細胞を用いたものであり、本来の形態とは異なるものである。組織を用いた本研究結果が、細動脈の収縮・拡張機構を解明していく一助になれば幸いである。社会的な意義も大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Trace amines (TAs) have recently attracted attention as being related to various cerebral diseases. Until now, the details of TA are not well understood in cerebral arterioles. Therefore, we focused on the TA receptors. And we analyzed it based on the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) fluctuation. Expression of 9 types of the receptors was confirmed by RT-PCR. Of these, we focused on TA receptor 1, which has a strong expression. Some agonists showed the increase of [Ca²⁺]_i concentration of smooth muscle cells but some did not. 3-iodothyronamine-induced [Ca²⁺]_i increase in cerebral arterioles. These reactions were a partially inhibited in the absence of extracellular Ca²⁺. This receptor is likely that it is the major reaction for Ca²⁺ release from intracellular Ca²⁺ stores. The experimental results suggest that TAAR agonists affect different types of intracellular signal transduction system, and that these may be related to other receptors in addition to themselves.

研究分野：組織細胞生物学

キーワード：微量アミン 細動脈 細胞内カルシウムイオン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微量アミン類 (TA) は、生体アミンであるアドレナリン・ノルアドレナリン・ドーパミン・セロトニン等と比較すると極めて微量にしか存在しない内因性の化合物であり、哺乳類などの神経系において見いだされている。近年、TA と特異的に結合する受容体が報告され、TAAR (trace amine associated receptors) と呼ばれており、この受容体は G タンパク共役型受容体ファミリーの一つであることがわかっている。現在までに、TAAR は大きく 1~9 のサブファミリーが同定され、このうち特に TAAR1 については、鬱病、統合失調症、パーキンソン病などの神経疾患での研究がここ数十年行われている。血行動態の調節はその機能の維持において重要な役割を果たす。中枢神経系を含めた神経系においても同様である。しかしながら、我々が渉猟した限り、TAAR が血管系に及ぼす影響を、部位差や臓器特異性の違いから比較検討した研究はなく、血管系に対しては大動脈と腸間膜動脈に対する報告のみで、脳血管に対する報告はない。TA が神経系に含まれていて強い血管収縮因子であるなら、脳の細い細動脈が簡単に閉塞してしまい、容易に脳梗塞を引き起こすであろう。このことを考えても、脳血管、特に脳細動脈での TAAR 研究は重要な意味を持つと思われる。

血管平滑筋は高血圧症、動脈硬化症の発症およびその進展に中心的役割を果たすと考えられているが、今まで報告がなされているのは、ほとんどが培養血管平滑筋細胞における細胞内情報伝達機構における研究である。この方法は、全ての細胞に共通する普遍的な細胞内情報伝達系の研究手段として利用されてきたが、ただ 1 種類の単離細胞について観察しているにすぎない研究が多く、生体組織と同様の多種多様な細胞からなる標本で細胞内カルシウム動態を解析した報告はほとんどない。我々は、以前からできるだけ生体に近い状態で細動脈血管平滑筋の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。その中で、異種細胞間あるいは臓器・細胞の間に機能的な差異があることを見いだしてきた。とりわけ細動脈の平滑筋は、形態が似ていても存在部位によって収縮・拡張機能が異なることを報告してきた (Saino et al. 2002; Matsuura et al. 2004; Misaki et al. 2006; Saino et al. 2008; Masu et al. 2008; Tamagawa et al. 2009; Tamagawa et al. 2013; Okubo et al. 2016)

TA と同様に神経伝達物質として重要な生体アミンであるノルアドレナリン、セロトニン、及び ATP 受容体に関する細動脈での反応の報告はすでに行っている (上記報告)。今後の血管に対する臨床的な治療、特に服薬などの内科系治療を考慮すると、培養系の実験ではなく、血管という組織を用いた生理実験が今まで以上に重要な役割を果たすであろう。本研究で、神経系に微量に含まれるアミンが血管に及ぼす作用を検証することは重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、脳血管を含めた血管系で重要な役割を果たす可能性がある TAAR を、脳細動脈といった組織学的形態を保った状態において、その受容体の発現および TAAR 受容体刺激による血管収縮・拡張の反応機転を、主にバイオイメージング法を用いて解析・検討するものである。特に、 $[Ca^{2+}]_i$ の変動を指標として細胞内情報伝達系の調節に着目する。

3. 研究の方法

・ RT-PCR

標本の作成法は現在まで踏襲している方法に準じた。二酸化炭素で屠殺後、Wistar rat をリンゲル液で灌流後脳を取り出し、組織採取後保護作用のある BSA 含有 HEPES バッファーに浸した。その後、おおまかに余分な結合組織を除去し、純化コラゲナーゼを用いてさらに結合組織を除去し脳血管標本を得た。この標本から Qiagen RNeasy Micro Kit を用いて Total RNA を抽出し、その後 ReverTra Ace-[®] kit (TOYOBO) を用いて cDNA を回収した。TAAR は rat では 9 種類存在していることが確認されている。それぞれのプライマーは論文などで確認後、Primer 3 を用いて作成した。

・ カルシウムイメージング

上記と同様な方法で標本採取後、細動脈（直径 50 μm 程度）を得た。その後、標本にカルシウム感受性色素である Indo-1/AM を負荷し（10 μM ）カバーガラス上に固着した。灌流液中に各種 TAAR agonist を加えて、 Ca^{2+} 濃度変動を時系列的に観察した。細胞質内の Ca^{2+} は、細胞内貯蔵場からの Ca^{2+} 放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入によって制御されている。そのどちらが優位かを検討するため、細胞外 Ca^{2+} を除去、あるいはタプシガルジンなどにより小胞体カルシウムポンプを抑制した状況で反応を観察した。

・ カルシウムイメージング用顕微鏡

Indo-1/AM を用いているため、紫外線励起ができる高速共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM8000 改良型) を用いて Indo-1 負荷標本を観察した。反応時に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を表す擬似カラー画像 (Ratio 画像) を取得し、平滑筋の各細胞に ROI を定めて時系列的な Ca^{2+} 変動を画像解析した。得られた画像データは RCM の画像解析ソフトで処理後、Microsoft excel を用いて線画を作成。Image J とプラグインを使って TIFF や JPEG 画像とし動画の作成を行った。

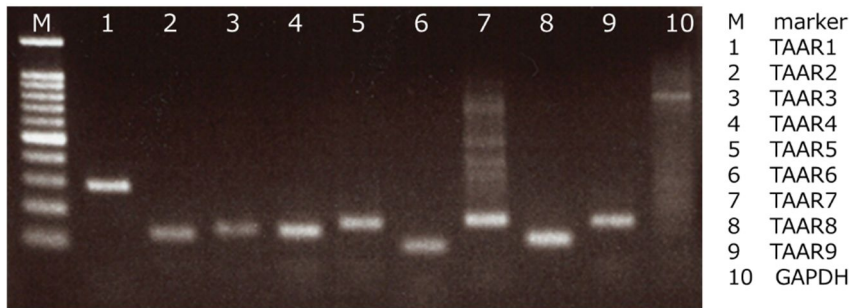
・ 電子顕微鏡観察

分離単離脈管標本を用いた。固定はグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合液による前固定、続く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行った。しかしながら、単離標本は周りの結合組織が除去されている為、通常の固定に用いるグルタルアルデヒドの濃度では浸透圧が高すぎて組織の変形が起こる可能性がある。このため検証した結果、濃度を半減したものをを用いることとした。いずれもエポキシ樹脂に包埋し、固化後に準超薄切片（厚さ 1 μm ）を連続して得た。標本をスライドガラスにのせ、トリジンブルーで染色し、厚切り標本を得た。光学顕微鏡で検鏡後、トリミングを行い、厚さ 100nm の薄切切片を作成した。電子染色は 1% 酢酸ウラン水溶液を滴下し、30 分染色後に酢酸鉛水溶液にて 5 分間染色した。

4 . 研究成果

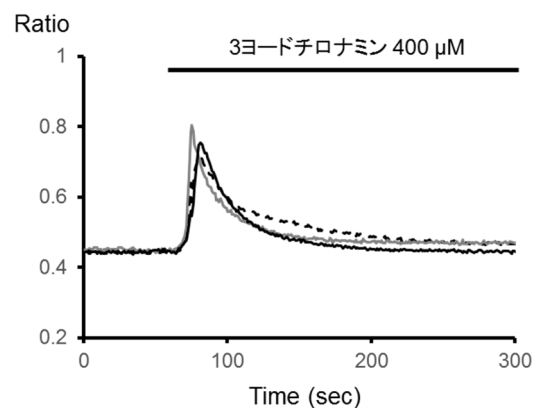
【結果】

RT-PCR の結果、ラットに存在すると考えられる 9 種類の TAAR 受容体が全て存在していることを確認した。発現の状態を観察すると、TAAR1 が最も強く発現していることが観察された。

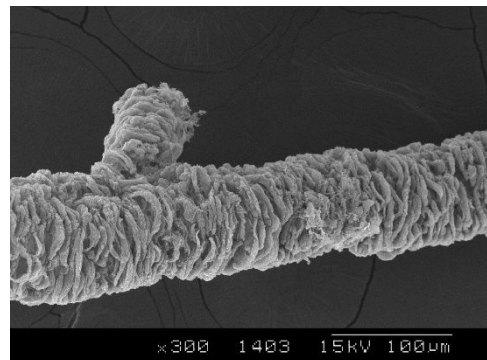


上記で確認された TAAR1 に特に着目して実験を行うことに決め、以後の実験を行った。脳の細動脈では、TAAR agonist である tyramine, phenylethylamine, octopamine それぞれの反応を確認したが、これらの試薬で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めなかった。濃度をかなり上昇させても $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応はなかった。これに対し、別の TAAR1 agonist である 3-iodothyronamine, tryptamine を添加すると血管平滑筋細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。

細胞外の Ca^{2+} 除去でも $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が認められた。TAAR1 agonist による反応は、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出がメインの受容体であると示唆された。詳しい細胞内情報伝達系における作用を検証したが、まだ完全には終了できず、詳しい結果については継続した実験を今後も行い、明らかにしたいと考えている。



透過型電子顕微鏡及び走査電子顕微鏡を用いて形態観察を行った。細胞内カルシウムイメージング研究に用いられた標本が脳細動脈の典型的な構造を保持していることが確認された。細動脈平滑筋は紡錘形をしており、核の長軸は細動脈長軸に直行していた。環状に血管平滑筋細胞に包まれ、縦断面では平滑筋細胞が隙間なく輪層に取り巻いていることを確認した。有意な超微細構造の損傷（例えばミトコンドリアの膨化、小胞体の空胞化など）は検出されなかった。今まで我々が観察してきた細動脈と形態学的に異なる所見は見当たらなかった。一般に描かれてきた動脈の平滑筋細胞（紡錘形に血管周囲を輪状に取り巻く）と変わったところは確認されなかった。



神経伝達物質に混在している trace amine の受容体を脳血管が保持していることが確認された。その中でも特に TAAR1 の発現を強く認めた。この受容体は収縮・拡張のどちらに働くか今回の研究では決定的な結論には至らなかった。が、 Ca^{2+} 上昇を考えると収縮に働く可能性が高い。同じアミンであるカテコールアミンは 受容体を持ち、血管平滑筋に対しては 受容体が収縮作用を示すが、 受容体は同じ平滑筋である気管支平滑筋に対しては拡張の作用を示す。今回の研究結果でも同じ TAAR1 agonist でも $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が異なることがわかった。血管に対し収縮と拡張のどちらに TAAR が働くかは今後のさらなる研究が必要であり、本研究の助成期間は終了したが引き続き本研究を遂行する予定である。以前に我々が行った研究で、脳細動脈に対し ATP やセロトニンは全周性に強い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を示すのに対し、ノルアドレナリンは全周性ではなく分節性に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を示すことを報告している。この結果から考えると、TAAR はノルアドレナリンほど強く反応することはなく（そもそも微量に存在）反応したとしても同

様に分節的に反応する可能性がある。このため、観察している濃度では反応を認めにくかった可能性も否定できない。今後の検討課題としたい。受容体の性質の大まかな点(細胞内貯蔵場からの放出)は理解できたが、その後に引き起こる Ca^{2+} 流入 (CCE か NCCE か) がどのようなメカニズムによるかを検証することはできなかった。今現在、この流入には capacitative Ca^{2+} entry (CCE) と non-capacitative Ca^{2+} entry (NCCE) の 2 つがあることがわかっている。この点についてもさらに検証して行きたいと考えている。

現在の所、成人病として高血圧の重要性は他者も認めるところではある。血管平滑筋細胞は、様々な疾患の原因・治療のターゲットとなっている。このため今まで膨大な研究費がその研究に費やされている。しかしながら、その多くが培養された血管平滑筋細胞を用いたものであり、本体の形態とは異なるものである。この研究結果から全てを推察することは間違いであると考えられる。現在の血管平滑筋細胞の研究は本質を突いたものではないのではないかと危惧する。

本研究は、期間内に全て終了しなかったが、今後研究を継続し、疑問点を明らかにして国際雑誌に報告する予定である。

参考文献

1. Saino T, Matsuura M, Satoh Y: Histochem Cell Biol 117, 295-305 (2002).
2. Saino T, Matsuura M, Satoh Y: Cell Calcium 32, 155-165 (2002).
3. Saino T, Satoh Y: J Electron Microsc 53:49-56 (2004).
4. Matsuura M, Saino T, Satoh Y: Arch Histol Cytol 67:95-105 (2004).
5. Misaki T, Satoh Y, Saino T, Ogawa A: Arch Histol Cytol. 69:49-60 (2006).
6. Misaki T, Satoh Y, Saino T, Ogawa A: Arch Histol Cytol. 71:179-184 (2008).
7. Saino T, Misaki T, Matsuura M, Shikanai T, Satoh Y: Arch Histol Cytol. 71:235-247 (2008).
8. Masu K, Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Russa AD, Ishikita N, Satoh Y: Arch Histol Cytol. 71:291-302 (2008).
9. Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y: Acta Histochem Cytochem 42:121-128 (2009).
10. Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Oikawa M, Satoh Y: Arch Histol Cytol. 74:19-29 (2013).
11. Okubo M, Satoh Y, Hirakawa M, Sasaki K, Masu K, J McHonde G, Ikeda-Kurosawa C, Kurosaka D, Saino T: Biomed Res 37:101-115 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokoyama T, Takemoto M, Hirakawa M, Saino T.	4. 巻 121
2. 論文標題 Different immunohistochemical localization for TMEM16A and CFTR in acinar and ductal cells of rat major salivary glands and exocrine pancreas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Histochem.	6. 最初と最後の頁 50-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.acthis.2018.10.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama T, Settai K, Nakamuta N, Yamamoto Y	4. 巻 151
2. 論文標題 Distribution and morphology of baroreceptors in the rat carotid sinus as revealed by immunohistochemistry for P2X3 purinoceptors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 161-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-018-1734-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higashio H, Satoh YI, Saino T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibitory role of Munc13-1 in antigen-induced mast cell degranulation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 321-329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.38.321.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inomata Y, Nagasaka S, Miyate K, Goto Y, Hino C, Toukairin C, Higashio R, Ishida K, Saino T, Hirose M, Tsumura H, Sanbe A.	4. 巻 496
2. 論文標題 Bcl-2-associated athanogene 3 (BAG3) is an enhancer of small heat shock protein turnover via activation of autophagy in the heart.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1141-1147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.158.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mchonde GJ, Saino T	4. 巻 5
2. 論文標題 Variant position and course of the superior cervical cardiac branch of vagus nerve.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Anatomy and Research	6. 最初と最後の頁 3731-3734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.16965/ijar.2017.159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama T, Settai K, Nakamuta N, Yamamoto Y	4. 巻 122
2. 論文標題 Vesicular Glutamate Transporter 2-immunoreactive Afferent Nerve Terminals in Rat Carotid Sinus Baroreceptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochem.	6. 最初と最後の頁 151469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.acthis.2019.151469.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Ozawa Y, Yokoyama T, Nakamuta N	4. 巻 49
2. 論文標題 Immunohistochemical characterization of brush cells in the rat larynx.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Mol Histol.	6. 最初と最後の頁 63-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10735-017-9747-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 横山拓矢、平川正人、齋野朝幸
2. 発表標題 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。
3. 学会等名 日本解剖学会第64回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikeda C, Yokoyama T, Kurosaka D, Saino T.
2. 発表標題 The investigation of the distribution of autonomic nerves on superior tarsal plate.
3. 学会等名 International council of ophthalmology, World ophthalmology congress. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川正人、横山拓矢、齋野朝幸
2. 発表標題 ラットの胃におけるP2X3型ATP受容体陽性神経終末の形態。
3. 学会等名 日本解剖学会第64回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川正人、横山拓矢、齋野朝幸
2. 発表標題 ラットの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。
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山拓矢、山本欣郎、加藤弘毅、平川正人、齋野朝幸
2. 発表標題 ラット頰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
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山拓矢、齋野朝幸
2. 発表標題 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。
3. 学会等名 日本解剖学会第63回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 守口霞、東尾弘典、横山拓矢、久慈昭慶、佐藤洋一、齋野朝幸
2. 発表標題 シェーグレン症候群での耳下腺分泌障害には交感神経系が関与している可能性がある。
3. 学会等名 日本解剖学会第63回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹本正人、横山拓矢、内田旬、中村巨佑、齋野朝幸
2. 発表標題 ラット唾液腺と涙腺における塩素チャネルTMEM16とCFTRの分布。
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山拓矢、齋野朝幸
2. 発表標題 胎児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
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪俣結衣, 永坂祥太, 宮手一樹, 後藤雄大, 東尾里英子, 石田欣二, 齋野朝幸, 弘瀬雅教, 三部篤
2. 発表標題 Bcl-2 associated athanogene (BAG)3による心筋タンパク質の分解調節
3. 学会等名 日本薬学会第138回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大越魁, 横山拓矢, 齋野朝幸, 中牟田信明, 山本欣郎
2. 発表標題 ラット気管における刷子細胞の形態
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤弘毅, 森永涼介, 横山拓矢, 富宿誠吾, 中牟田信明, 山本欣郎
2. 発表標題 持続的低酸素に対する呼吸循環応答への二酸化炭素の影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山拓矢, 平川正人, 齋野朝幸
2. 発表標題 ラット副腎髄質細胞内在性のセロトニンによる細胞内Ca ²⁺ 濃度上昇の抑制的調節
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川正人、横山拓矢、齋野朝幸
2. 発表標題 ラット胃幽門前庭に局在するP2X3陽性神経終末の起始神経節の同定
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松浦 誠 (Matsuura Makoto) (00405846)	岩手医科大学・薬学部・准教授 (31201)	
研究分担者	佐藤 洋一 (Satoh Yoichi) (40118253)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	
研究分担者	横山 拓矢 (Yokoyama Takuya) (70772094)	岩手医科大学・医学部・助教 (31201)	