

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590259

研究課題名(和文) 細動脈での利尿剤スピロノラクトンの情報伝達機構の解明：受容体はどこに存在するか？

研究課題名(英文) Mechanism of spironolactone-induced Ca^{2+} increase in rat testicular arteriole smooth muscle cells revealed by real-time laser confocal scanning microscopy.

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は利尿剤のスピロノラクトン(SP)が血管平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇を示す事を報告している。本研究はその詳細な機構の解明を目的とした。IP3受容体は $[Ca^{2+}]_i$ の変動には関与しなかった。スラミンの実験から G蛋白受容体の関与が推測された。各種蛋白キナーゼの検討では、PKAのみ部分的に関与することが示唆された。また、細胞内ステロイド受容体の一部を阻害すると、この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は部分的に抑制された。以上からSPは細胞内受容体に結合する以外に、細胞膜G蛋白受容体に結合する可能性が示唆された。本研究はSPのようなステロイド類似物の情報伝達研究に新しい知見を与えうる。

研究成果の概要(英文)：We reported that spironolactone(SP) induced an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in rat testicular arterioles. In this study, we further investigated the mechanism of SP-induced $[Ca^{2+}]_i$ dynamics. The increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by SP was inhibited in extracellular Ca^{2+} -free conditions. In contrast, U73122 did not affect this $[Ca^{2+}]_i$ increase in similar to what was observed for 2-APB. H89 partially inhibited this increase, whereas GF109203X did not. Either suramin or NF449, partially blocked these $[Ca^{2+}]_i$ increases. Similarly, either mifepristone or flutamide partially blocked the SP-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$. We suggest that SP-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ is mediated both by Ca^{2+} influx from outside and by Ca^{2+} mobilization from Ca^{2+} stores, with the former being dominant. We propose that SP interacts with both extracellular and intracellular receptors in testicular arterioles, which is followed by $[Ca^{2+}]_i$ increases that causes smooth-muscle contraction.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細動脈 spironolactone Gタンパク 細胞内カルシウムイオン 共焦点レーザー顕微鏡

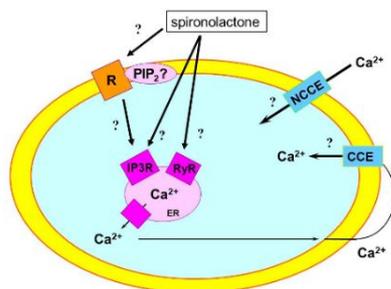
1. 研究開始当初の背景

我々の健康を左右する要因の1つに血行動態がある。各種組織の局所循環を制御しているのは細動脈である。この血管は、内径に比して平滑筋層が発達しており自律神経の分布も多く、臓器内の血流分配機構において重要な役割を演じている。しかしながら、その径が細すぎるため（直径100 μm 以下）、これまでは生理・薬理実験の対象から外されてきたのが現状である。利尿剤は利尿作用のみならず、高血圧治療薬のひとつとして用いられている。これまで降圧効果は、利尿による循環血漿流量の減少に伴う二次的効果と考えられてきたが、血管拡張による降圧を示唆する報告もあり、詳細はよくわかっていない。そこで我々は以前に組織学的形態を保ったままのラット精巣細動脈を用いて細胞内カルシウムイオン濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）の変動を指標として、各システムの利尿剤の作用特性の比較検討を報告した。ヒドロクロロチアジド、フロセミドでは精巣細動脈平滑筋細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇はほとんど認められなかった。これらに対し、スピロノラクトン（SP：300 μM ）では律動的反応を伴った二相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と収縮反応が観察された。研究結果からSP誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は細胞内ストアからの放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入によって起こることが示唆されたが、詳しいメカニズムについてはよくわかっていない。SPの基本骨格はステロイドと同じである。また、構造的にプロゲステロンと類似しているため性ステロイドの受容体と相互反応すると言われている。さらに、SPは鉱質コルチコイド受容体（mineralocorticoid receptor：MR）に結合し、アルドステロンの結合を阻害することにより降圧作用を示すと言われているが血管に対する詳細は不明である。

2. 研究の目的

SPにおいてもその作用機序について鳥瞰的に整理された図を描くに至っていない(図の?マーク)。

また、降圧剤としての適用もあるSPには昇圧作



用や血圧上昇などの有害事象は報告されておらず、降圧効果の機序を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

以上から本研究では、組織形態を保ったままでリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡を用いて、SPでラット細動脈を刺激し、特に（1）SPの血管収縮作用にどのような細胞内カルシウム濃度変動機構が関与しているのか、（2）単純にアルドステロンを抑制する作用だけの機序なのか、（3）SPはステロイド骨格を持つ試薬であるが、細胞膜上に受容体は存在するのか、を明らかにするものである。

当該研究期間では、ラット細動脈におけるSPの細胞内情報伝達系の相関を明らかにするため、6段階の到達目標を定めた。

- 1) 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動をイメージングできる細動脈標本を作製する。
- 2) 精巣細動脈標本での Ca^{2+} シグナリングにおけるSPの役割を決定する。特に、細胞内に直接入り込むのか、細胞膜受容体に結合するのかをカルシウムイメージング法によって明らかにする。
- 3) 細胞内情報伝達系におけるセリン/トレオニンキナーゼについて関係性を明らかにする。
- 4) 上記で関係性が認められた場合、リン酸化の有無をウエスタンブロット法等を用いて生化学的に検討する。
- 5) イメージングに用いた生組織標本を化学固定し、電子顕微鏡で細動脈の微細構造の変化を検討する。
- 6) 受容体が膜上に存在することが示唆された場合、SPにタグ（側鎖）をつけたものを合成し、細胞内に取り込まれないような合成体を作成する。その作用が元の物質の場合とどのように異なるかを Ca^{2+} イメージング法等で検討する。

3. 研究の方法

1) 細動脈としてラット精巣細動脈を使用し、細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動のイメージングできる細動脈標本を作成し、各種伝達物質や薬剤が細動脈の各種細胞の Ca^{2+} 依存性細胞内情報伝達系に与える効果について観察、解析する。

2) 細動脈標本での Ca^{2+} シグナリングにおけるSPの役割を決定する。特に、細胞内に直接入り込むのか、細胞膜受容体に結合するのかをカルシウムイメージング法によって明らかにする。

3) SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変動に対し、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動に影響を与えているとされているプロテインキナーゼの反応を検討し、細胞内情報伝達系におけるセリン/トレオニンキナーゼとの関係性を明らかにする。

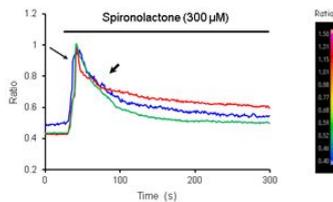
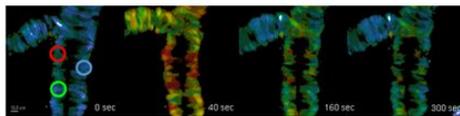
4) 上記 3) で関係性が認められた場合、リン酸化の有無をウエスタンブロット法等を用いて生化学的に検討する。

5) イメージングに用いた生組織標本を化学固定し、電子顕微鏡で細動脈の微細構造の変化を検討する。

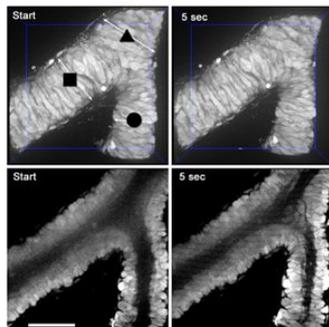
6) 受容体が膜上に存在することが示唆された場合、SP に側鎖をつけたものを合成し、細胞内に取り込まれないような合成体を作成する。その作用が元の物質の場合とどのように異なるかを Ca^{2+} イメージング法等で検討する。

4. 研究成果

1) ラット精巣細動脈において、SP (300 μ M) 刺激により律動的反応を伴った二相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と収縮反応が観察された。



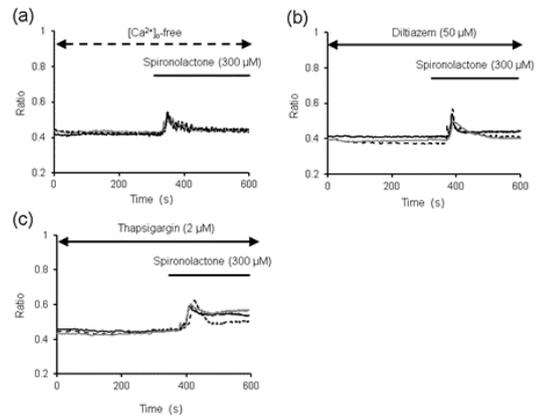
図中の矢印が二相性を示している。



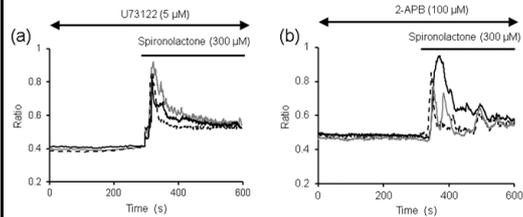
0 秒と 5 秒での血管外径の比が減少
血管収縮を表している。

2) 細胞内外の Ca^{2+} 流入について検討したと

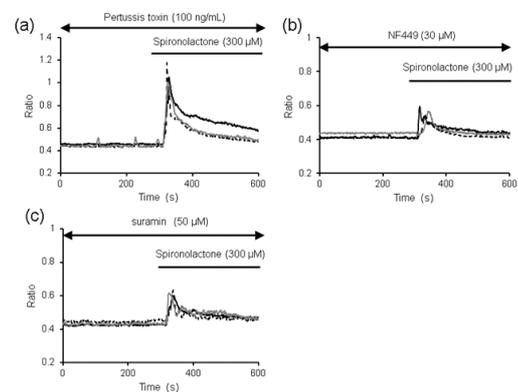
ころ、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動には細胞内外の Ca^{2+} が強調して働いていることが示唆された。



3) 細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が何によって起こるか検討した。PLC 抑制剤の U73122、および IP_3 受容体抑制剤の 2-APB 存在下において SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変動に変化は生じなかった。以上から細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出は IP_3 を介さないものである事が示唆された。

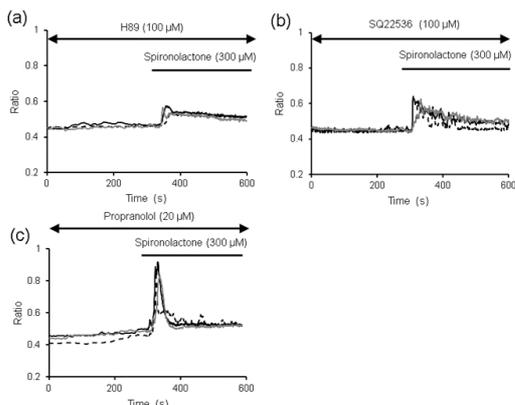


4) 次に細胞膜上に受容体が存在するかを検討した。膜受容体である G タンパクに関する実験を行った。Gi の抑制薬である百日咳毒素で SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は増強された。また、G タンパクの抑制薬である suramin、Gs の阻害薬である NF449 存在下で SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は軽度阻害された。以上から SP は部分的に G タンパク受容体に結合して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす可能性が高い。

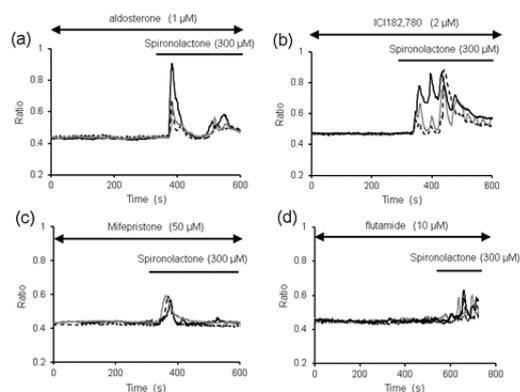


5) さらにプロテインキナーゼがこの反応に関与していないか検討した。プロテインキナ

ーゼ A (PKA) の抑制薬の H89、および adenylyl cyclase 抑制薬の SQ22536 存在下で SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は軽度阻害された。受容体の阻害剤の propranolol 存在下、およびプロテインキナーゼ C 抑制薬の GF109203X 存在下ではこの反応に変化はなかった。以上から、SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には、G タンパクが関与し、その下流には PKA が関与する可能性が高いことが示唆される。



6) 次に細胞内受容体について検討した。鉱質コルチコイド受容体刺激薬の aldosterone、エストロゲン受容体の阻害薬の ICI182780、および G15 存在下で SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に変化はなかった。これに対し、アンドロゲン受容体抑制薬の flutamide、グルココルチコイド受容体阻害剤の mifepristone 存在下で SP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は部分的に阻害された。



7) 実験方法の 6) に記載されているように受容体が膜上に存在することが示唆された場合、SP にタグ (側鎖) をつけたものを合成し、細胞内に取り込まれないような合成体を作成し、その作用が元の物質の場合とどのように異なるかを Ca^{2+} イメージング法等で検討するという研究を企画していた。薬学部創制学ならびに有機合成化学講座で合成を依頼していたが、研究期間終了時まで合成できず、目的とする実験が途中で終了してしまっ

た。今後合成完了後、引き続き受容体が膜上に存在するかどうか検証を予定している。

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 5 件)

Oikawa M, Saino T, Kimura K, Kamada Y, Tamagawa Y, Kurosaka D, Satoh Y: Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. *Histochem Cell Biol* 2013;140:463-476.

Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y: Mechanism of spironolactone-induced Ca^{2+} increase in rat testicular arteriole smooth muscle cells revealed by real-time laser confocal scanning microscopy. *Arch Histol Cytol* (in press)

Sawai T, Uzuki M, Miura Y, Kamataki A, Matsumura T, Saito K, Kurose A, Osamura YR, Yoshimi N, Kanno H, Moriya T, Ishida Y, Satoh Y, Nakao M, Ogawa E, Matsuo S, Kasai H, Kumagai K, Motoda T, Hopson N. World's first telepathology experiments employing WINDS ultra-high-speed internet satellite, nicknamed "KIZUNA". *J Pathol Inform.* 2013;4:24.

佐藤洋一 : 右の腸 左の腸の発生学的・解剖学的差異. *胃と腸* 47:1920-1926(2012)

松村 翼, 佐藤洋一, 澤井高志, 宇月美和: タブレット端末を利用したバーチャルスライドによる病理症例検討の試み. *病理と臨床*. 32(4): 451-54(2014)

[学会発表](計 23 件)

【国際学会】

Satoh Y, Saino T, Akutsu-Yamauchi H: New era of dynamic morphology by the realtime confocal microscopy: with special reference to Ca^{2+} dynamics in living tissues. The 41st International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012, Aug, Kyoto

Saino T, Watson EL, Satoh Y:
Protease-activated receptor 2 performs
the protein secretion through the
phosphorylation of CAMK II in rat parotid
gland acinar cells. The 41st International
Congress of Histochemistry and
Cytochemistry, 2012, Aug, Kyoto

Satoh Y-I, Saino T, Miura H: Effect of PARs
on $[Ca^{2+}]_i$ dynamics of sympathetic ganglia
of rats. The 52nd American Society for Cell
Biology Annual Meeting, 2012, Dec, San
Francisco

Oikawa M, Saino T, Kimura K, Kamada Y,
Kurosaka D, Satoh Y: Effects of
protease-activated receptors (PARs) on
intracellular calcium dynamics of acinar
cells in rat lacrimal glands. The 52nd
American Society for Cell Biology Annual
Meeting, 2012, Dec, San Francisco

Saino T, Watson EL, Satoh Y :
Protease-activated receptor 2 performs
the protein secretion through the
phosphorylation of CAMK II in rat parotid
gland acinar cells. The 52nd American
Society for Cell Biology Annual Meeting,
2012, Dec, San Francisco

Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y:
The mechanism study of
spironolactone-induced Ca^{2+} increase in
rat testicular arteriole smooth muscle
cells The 52nd American Society for Cell
Biology Annual Meeting, 2012, Dec, San
Francisco

Saino T, Watson EL, Satoh Y :
Protease-activated receptor 2 affects
protein secretion through a
multifunctional
 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase
(CAMK II) pathway in rat parotid gland
acinar cells. FAOBMB Mini-Symposium -
Molecular Bases for Medical and
Pharmaceutical Sciences -, 2013, Apr,
Morioka

Satoh Y, Saino T, Masu K, Matsuura M,
Misaki T, Tamagawa Y, Sasaki K: Functional

heterogeneity of blood vessels: with
special reference to Ca^{2+} dynamics of
smooth muscles. International Symposium
Anatomical Science for advance in health
and clinical therapy 2013, Aug, Sendai

Saino T, Oikawa M, Kimura K, Kamada Y,
Tamagawa Y, Kurosaka D, Satoh Y: Effects
of protease-activated receptors (PARs) on
intracellular calcium dynamics of acinar
cells in rat lacrimal glands.
International Symposium Anatomical
Science for advance in health and clinical
therapy 2013, Aug, Sendai

Sasaki K, Hirakawa M, Saino T, Sato Y:
Smooth muscle cells of testicular venules
show different responses to various
transmitters, when compared with smooth
muscle cells of arterioles; with special
reference to intracellular calcium
dynamics. 18th international microscopy
congress 2014, Sep, Prague, Czech Republic

Kurosawa C, Saino T, Kurosaka D, Satoh Y:
1-Adrenergic receptors regulate Ca^{2+}
modulation of acinar cells in rat lacrimal
grand. 18th international microscopy
congress 2014, Sep, Prague, Czech Republic

(2) 国内学会

【招待講演】

佐藤洋一：バイオイメージングの実際。第 28
回医学学生物学電子顕微鏡技術学会講演会
2012 年 5 月、盛岡

佐藤洋一：血管平滑筋のカルシウム動態イメ
ージング。第 58 回東北・北海道連合支部学
術集会 特別講演 2012 年 9 月、山形

齋野 朝幸：血管細動脈の多様性：カルシウ
ムイメージング法による検証 第 35 回道北
小児科懇話会 2014 年 12 月、旭川

【国内シンポジウム】

佐藤洋一：各種臓器由来の血管平滑筋の細胞
内カルシウム動態。日本顕微鏡学会第 5 6 回
シンポジウム 2012 年 11 月、札幌

【口演】

齋野 朝幸、玉川 靖則、松浦 誠、佐藤 洋一：

利尿剤である spironolactone の受容体はどこに存在するか：ラット精巣細動脈における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇機構での検討
第 21 回日本バイオイメーキング学会学術集会、2012 年 8 月、京都

及川 誠、齋野朝幸、黒坂大次郎、佐藤洋一：
涙腺腺房細胞におけるプロテアーゼ活性化型受容体の発現とその機能解析 日本解剖学会 第 58 回 東北・北海道連合支部学術集会、2012 年 9 月、山形

及川 誠、齋野朝幸、木村 桂、黒坂大次郎、佐藤洋一：涙腺腺房細胞におけるプロテアーゼ活性化型受容体の発現とその機能解析．第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会；2013 年 3 月、高松

玉川 靖則、齋野 朝幸、松浦 誠、佐藤 洋一：
利尿剤である spironolactone の受容体はどこに存在するか：ラット精巣細動脈における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇機構での検討．第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会；2013 年 3 月、高松

佐々木香奈、平川正人、齋野朝幸、佐藤洋一：
血管平滑筋の細胞内カルシウム動態に及ぼす神経伝達物質の効果-細動脈と細静脈の比較-．第 59 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会；2013 年 9 月、札幌

黒澤 千花、齋野 朝幸、東尾 浩典、佐藤洋一、黒坂 大次郎：ノルアドレナリンは 1 受容体を介して涙腺腺房細胞からムチン分泌を促す。第 60 回東北・北海道連合支部学術集会 2014 年 9 月、福島

中野真人、栗原康一郎、齋野 朝幸：アマガエル接着性パッドの内部構造 日本動物学会 第 85 回仙台大会 2014 年 9 月、仙台

廣瀬 仁樹、中野 真人、齋野 朝幸：両生類表皮におけるメルケル細胞・神経複合体の免疫標識 日本動物学会 第 85 回仙台大会 2014 年 9 月、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

松浦 誠 (MATSUURA MAKOTO)
岩手医科大学・薬学部・講師
研究者番号：00405846

佐藤 洋一 (SATO YOH-ICHI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：40118253

(3) 連携研究者