

論文内容の要旨

Different effect of serotonin on intracellular calcium ion dynamics in the smooth muscle cells between rat posterior ciliary artery and vorticosse vein

(ラット後毛様動脈と渦静脈平滑筋細胞でのセロトニン刺激による細胞内カルシウムイオン濃度変動の相違)

(大久保 雅俊, 佐藤 洋一, 平川 正人, 佐々木 加奈, 枡 一毅, 池田 千花, 黒坂 大次郎, 齋野 朝幸)

(Biomedical Research 37 巻, 2 号, 平成 28 年 4 月掲載)

I. 研究目的

眼球に分布する動脈は主に内頸動脈の枝である眼動脈に由来する。眼動脈の主な枝として、網膜中心動脈と長・短毛様動脈が挙げられる。眼球の静脈系は眼静脈と渦静脈からなる。これらの血管が原因となる病気に、網膜中心動脈・静脈閉塞症や虚血性視神経症などの疾患が挙げられ、これらの病気を考える上でも眼球の動静脈の循環の解析が重要である。セロトニン (5-HT) は、主に中枢・末梢神経系、消化管において複数の受容体サブタイプを持つ神経伝達物質である。以前に、我々は精巣・脳血管と異なる血管区分での細動脈平滑筋細胞における 5-HT の反応および受容体の相違について報告した。が、これまでに静脈平滑筋細胞について詳しく検討された報告はほとんどない。このことに着目し、本研究はこれまで研究成果が乏しかった細静脈血管平滑筋の反応性を、昇圧物質、特に 5-HT による反応性を比較検討することで、動静脈の収縮機構の一端を明らかにすることを目的とした。

II. 研究対象ならび方法

Wistar ラット(♂ 7-12 週, 150-290g)を二酸化炭素で屠殺し、リンゲル液にて還流し血液を除去した。その後眼球を摘出し、そこから後毛様動脈および渦静脈をとり出し、純化コラゲナーゼ処理後結合組織を除去した。Ca²⁺感受性蛍光色素 (Indo-1/AM ; 10 μM) を 37°C で 2 時間かけて導入し、その後カバーガラスに付着させて標本を作製した。還流液に 5-HT や 5-HT アゴニスト等を加え、刺激による [Ca²⁺]_i をリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) を用いて観察した。また、光顕および共焦点レーザー顕微鏡での動静脈の形態についても検討した。

III. 研究結果

光顕による視神経乳頭周囲の観察において、後毛様動脈と渦静脈が観察された。後毛様動脈は血管平滑筋細胞によって輪状に取り巻かれていたが、これに比べ渦静脈は平滑筋が疎であった。共焦点レーザー顕微鏡での観察では、後毛様動脈は以前に報告した精巣および脳の細動脈と同様に平滑筋細胞が輪状に配置されていた。これに対し、渦静脈は敷石状の平滑筋細胞に囲まれていることが観察され、動静脈間で構造の差を認めた。

共焦点レーザー顕微鏡による観察では、後毛様動脈において 5-HT 刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇を認めた。細胞外 Ca^{2+} を除去しても $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認め、 $GdCl_3$ や diltiazem などの Ca^{2+} チャネルブロッカーによっても同様の結果であった。細胞内 Ca^{2+} ストアに關与する thapsigargin と U73122 では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は部分的に抑制された。血管収縮に最も關係すると考えられるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の阻害剤である ML-9 は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を完全に抑制した。渦静脈でも 5-HT 投与によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。細胞外 Ca^{2+} を除去しても $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認め、 $GdCl_3$ や diltiazem によっても同様の結果であった。thapsigargin によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はほぼ完全に抑制された。U73122 では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は部分的に抑制され、ML-9 は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を完全に抑制した。以上の結果ら、血管の 5-HT に対する反応は、眼の動脈系と静脈系によって異なっていた。動脈の反応は細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入双方が協調して働いているのに対し、静脈は細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が優位であることが確認された。

次に動静脈での 5-HT 受容体の検討を行った。後毛様動脈では、5-HT₂ のアンタゴニストの ketanserin によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はほぼ完全に阻害された。5-HT₂ のアゴニストの α -methylserotonin は非常に強い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を示し、5-HT₃ アゴニストの 2-methylserotonin、5-HT_{1b} アゴニストの CP93129 では弱い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。5-HT_{1a} アゴニストの 8-Hydroxy-DPAT はほとんど $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めず、protein kinase A に關係する阻害薬の H-89、PKI、および SQ22536 存在下では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制されなかった。以上から後毛様動脈では、5-HT 受容体のうち 5-HT_{1b,2,3} 受容体が主に働いていることが示唆され、特に 5-HT₂ 受容体が主であることがわかった。これは以前に我々が報告している脳血管の報告に一致するものであった。渦静脈では、ketanserin によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はほぼ完全に阻害された。 α -methylserotonin、2-methylserotonin では弱い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。8-Hydroxy-DPAT および CP93129 はほとんど $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めず、H-89、PKI、および SQ22536 存在下では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は完全に抑制された。以上から渦静脈では、5-HT の受容体のうち IP₃ 依存性の 5-HT₂ に加えて、cAMP 依存性の 5-HT_{4,7} 受容体が主に働いている可能性が示唆された。

IV. 結 語

本研究では、今まで報告されていない同一組織内における動静脈を比較検討し、構造的・機能的な差を認めることができた。双方に存在する 5-HT 受容体は異なっており、5-HT は後毛様動脈および渦静脈の血管機能調節において重要な役割を果たしていることが示唆された。後毛様動脈では細胞内 Ca^{2+} ストアからの動員が Ca^{2+} 濃度上昇に大きく關与しており、以前に脳の動脈で報告している我々の結果に一致した。渦静脈では、特に cAMP 依存性経路が動脈と違い大きく關与していた。今まで静脈で Ca^{2+} の反応性を見た報告はほとんどなく、重要な所見であると思われる。今後更なる動静脈血管平滑筋の調節機構を解明することは重要になるであろう。これら機能の解明は血管閉塞を含む血液循環障害の治療法に貢献できると思われる。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 人見 次郎(解剖学講座:人体発生学分野)

副査 教授 佐藤 洋一(医学教育学講座)

副査 講師 村井 憲一(眼科学講座)

眼球に分布する血管は、動脈系が内頸動脈に由来する眼動脈で、静脈系が眼静脈と渦静脈からなる。網膜中心動脈・静脈閉塞症や虚血性視神経症などの病態生理を理解する上で、これらの血管の循環機構の解明が必要であるが、未だに詳細は不明である。本研究は、神経伝達物質であり、血管収縮物質であるセロトニン(5-HT)が、眼球に分布する動静脈の血管平滑筋にどのような刺激効果をもたらすか、細胞内カルシウム(Ca^{2+})濃度変動を指標として調べたものである。

5-HTのアゴニスト、アンタゴニスト、 Ca^{2+} 流入機構や動員機構の阻害薬を組み合わせで調べたところ、動脈平滑筋では細胞内 Ca^{2+} ストアからの動員が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に大きく関与していたが、静脈平滑筋では特にcAMP依存性の Ca^{2+} 流入が主であることが明らかになった。これまで殆ど興味が示されてこなかった静脈の血管平滑筋の生理機能が、ここまで詳しく調べられた事は無く、同一器官内であっても動脈と静脈の血管平滑筋の反応機構が異なることは、様々な生理活性物質に対する反応性も異なることを予見させ、非常に興味深い。このような知見は、血管閉塞などの血液循環障害の治療法の開発に貢献できると思われ、今後の発展性も期待できる。学位に値する研究である。

試験・試問の結果の要旨

本文の要旨についての質問に加え、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機構および Ca^{2+} 排泄機構、さらに5-HT受容体の種類とその機能に関する諮問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有しているものと認める。

参考論文

- 1) α 1-Adrenoceptors relate Ca^{2+} modulation and protein secretions in rat lacrimal gland (大久保雅俊, 他6名と共著) Biomedical Research 36号357-369 2015年12月 掲載
- 2) 電動式眼内レンズ挿入において眼内レンズ度数が切開創へ及ぼす影響の比較検討 (大久保雅俊, 他5名と共著) 眼科 2016年4月 掲載予定