

令和 4 年 8 月 29 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16485

研究課題名(和文)毛様体筋における眼内圧由来メカノストレスと細胞内カルシウム動態との相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of interaction between intraocular pressure-derived mechano-stress and internal calcium kinetics in ciliary muscles

研究代表者

山口 陽平 (Yamaguchi, Yohei)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40831912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：眼圧や血圧といった静水圧に由来する物理刺激は、毛様体筋や心筋の収縮・弛緩を修飾している。しかし、静水圧負荷環境下に細胞動態を定量的に測定できる装置がなかったため、静水圧が筋細胞の機能をどのように修飾しているかは明らかではなかった。そこで、本研究ではまず静水圧負荷環境下に細胞動態を測定できる装置開発を行った。その結果、生体内で発生するレベルの静水圧負荷環境下に電気刺激や薬剤投与を行うと同時に細胞動態と細胞内カルシウム動態を観測できる装置の開発に成功した。さらに、その装置を用いて、毛様体筋細胞と心筋細胞で新たな圧誘発性現象を捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼や心臓では、常に大きく変化する静水圧由来の機械的負荷環境にそれらの組織がさらされている。そのため、生体内での静水圧の異常な変化は、高眼圧に伴う緑内障や高血圧に伴う心不全といった病態を生じさせる。しかし、生体内で生じる静水圧条件下で、その圧変動に伴う細胞動態の変化を定量的に測定できる装置がなかったため、眼内平滑筋や心筋における静水圧の生理的意義を理解することは困難であった。本研究では、静水圧負荷環境下に細胞動態を観測できる新たな装置を開発した。そのため、本研究成果は病的な静水圧の変動によって生じる緑内障や心不全といった病態の機序解明に結びつく新たな知見創出につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The mechanical stress, derived from high hydrostatic pressure such as intraocular and blood pressure, modifies a contraction and relaxation of the ciliary muscle and cardiac muscle. However, the effect of physiological hydrostatic pressure on these myocytes is still unclear due to the lack of a quantitative measurement system that works under hydrostatic pressure at the cellular level. Here, we have first challenged to develop a quantitative measurement system to observe the cellular dynamics under hydrostatic pressure. And then, we have succeeded in developing a novel system to monitor cellular and intracellular calcium dynamics with electrical stimulation and drug intervention under high hydrostatic pressure. Furthermore, we successfully found the pressure-induced phenomenon on mouse cardiomyocytes and bovine ciliary muscle cells using the developed system.

研究分野：生理学

キーワード：メカノバイオロジー 筋細胞 毛様体筋細胞 心筋細胞 静水圧刺激 カルシウムハンドリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

眼球は強靱な被膜である強膜に包まれ、房水量の変化による眼圧というメカニカルストレスが常に存在する器官である。眼圧は房水の産生と排出のバランスによって決まる。房水は主に線維柱帯とそれにつながるシュレム管から排出される。線維柱帯は構造的に眼内平滑筋のひとつである毛様体筋と結合しており、毛様体筋の収縮・弛緩は線維柱帯から排出される房水量に影響を与えている[文献 1]。そのため、毛様体筋の収縮・弛緩は眼圧というメカニカルストレスのコントロールにおいて重要な役割を担う。毛様体筋をはじめとする眼内平滑筋の収縮・弛緩は心筋などと同様に細胞内カルシウムのダイナミックな変化によって生じる。その収縮・弛緩に伴う房水排出量の変動は、眼圧というメカニカルストレスを変化させ、そのメカニカルストレスが毛様体筋細胞の電気生理学的環境に影響を及ぼし、カルシウムハンドリングを変化させる。このようなメカニカルストレスからカルシウムハンドリングへのフィードバックは眼内平滑筋バイオメカニクスの統合的理解という観点からは非常に重要である。しかし、圧刺激といったメカニカルストレスが毛様体筋細胞のカルシウムハンドリングを修飾するメカニズムは、圧負荷環境下に細胞動態を定量的に測定できる装置がなかったため、これまで全く研究がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、以下の三点を目的として研究を推進した。

(1) 本研究の当初の目的は、圧負荷環境が毛様体筋のカルシウムハンドリングにどのように影響を与えるかを明らかにすることであった。しかし、当初使用していたガス圧による圧負荷装置では溶液内のガス分圧が変動してしまうため、圧力変化に依存した現象なのか、溶液中のガス分圧や pH の変動による現象なのかを切り分けることが困難であった。そのため、ガス圧の代わりに静水圧負荷環境下に細胞動態をリアルタイムに測定できる細胞動態観測システムの新規開発を目指した。

(2) COVID-19 パンデミックの影響によりウシ眼球の入手が困難になったため、入手が容易なマウス心筋細胞の細胞動態に静水圧負荷がどのように影響しているかを開発した装置を用いて明らかにすることを目的とした。

(3) 開発した装置を用いて、毛様体筋細胞のカルシウムハンドリングへの静水圧の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 静水圧負荷環境下での細胞動態計測システムの開発：35mm ガラスボトムディッシュに細胞を播種し、ゴム製 O リングとプラチナ電極が付いたアクリル製の透明ピストンでフタをして密閉した。圧負荷時にチャンバー内圧を一定に保つため、それをステンレスジャケットで補強した。倒立顕微鏡のステージに取り付け、長作動距離の対物レンズで観測窓からガラスボトム上の細胞を観測した。特注のシリンジポンプを耐圧チューブを介して、透明ピストンに接続した。それにより、ガラスボトムディッシュ内に任意の静水圧を負荷し、圧力下でのライブセルイメージングを可能とした。

(2) マウス心筋細胞への静水圧負荷：成体マウスと幼若マウスの各心臓から酵素処理により心筋細胞を単離した[文献 2, 3]。成体マウスの心筋細胞は、ポリ-L-リシンコーティングをしたガラスボトムディッシュに細胞を播種した。その細胞にカルシウム指示薬 (Fura-4F・Cal-520) を導入し、新規開発した細胞動態計測システムで静水圧を負荷し、その細胞動態と細胞内カルシウム動態を観測した。また、幼若マウスの心筋細胞は、コラーゲンコーティングをしたガラスボトムディッシュに細胞を播種した。その細胞を 1-2 日培養し、静水圧負荷環境でカルシウムイメージングと膜電位指示薬 (FluoVolt) を用いた膜電位イメージングを実施した。

(3) ウシ毛様体筋細胞への静水圧負荷：眼内平滑筋細胞を色素細胞や線維芽細胞など由来の夾雑物が混ざらないように分離するため、ウシ眼球の毛様体筋からコラーゲナーゼ酵素処理により細胞を単離した後、Percoll 密度勾配法により精製し、均一な毛様体筋細胞を得た[文献 4]。その細胞にカルシウム指示薬 (Cal-520) を導入し、静水圧負荷環境でカルシウム動態の変化を観測した。

4. 研究成果

(1) 新規開発した静水圧負荷環境下での細胞動態計測システム：市販の 35mm ガラスボトムディッシュにフタをするため、アクリル製の透明ピストンを作製した。細胞刺激用

のプラチナ電極と静水圧負荷のための耐圧チューブ接続用コネクタを作製し、透明ピストンに組み込んだ。この透明ピストンにゴム製 O リングを付け、ガラスボトムディッシュにフタし、ディッシュ内を密閉空間として圧を負荷した。圧負荷時にディッシュ内圧を一定に保つため、ステンレス製ジャケットを製作し、それで透明ピストンでフタをしたガラスボトムディッシュを被い、補強する構造とした。これにより、2 気圧程度まで安定して静水圧を加えることが可能となった。さらに、ステンレス製ジャケットを取り付けられる特製顕微鏡用ステージを作製し、温水を循環させ、細胞の温度環境を約 37 度に維持できる仕様とした。本システム開発は、近畿大学の西山雅祥博士と旭川医科大学の金子智之博士との共同研究として実施した。

(2) 成体と幼若マウス心筋細胞への静水圧負荷による影響：成体マウスから酵素単離した心筋細胞に Fura-4F を導入し、ガラスボトムディッシュに播種し、新規開発した細胞動態計測システムにセットした。1Hz の電気刺激を加え、収縮する心筋細胞のカルシウムトランジェントを Ionoptix 社製の単离心筋細胞収縮カルシウム測定装置により記録した。200 mmHg の静水圧刺激により、カルシウムトランジェントのピークは増大傾向を示した。この反応は、伸展によって認めるカルシウムトランジェントの変化に酷似しており、機械刺激に対する細胞の反応として心筋細胞に保存されている特性である可能性が高い[文献 2, 3]。さらに、幼若マウスから酵素単離した心筋細胞をガラスボトムディッシュに播種・培養後、その細胞に FlouVolt を導入し、共焦点顕微鏡を用いて膜電位を測定した。その結果、150 mmHg の静水圧負荷により、活動電位持続時間の延長と活動電位の低下傾向を認めた。今後は、静水圧負荷がカルシウムトランジェントや活動電位にどのような変化を生じさせるかを定量的に調べ、それと機械受容チャネルとの関連を明らかにし、そのメカニズムを解き明かす予定である。

(3) ウシ眼内平滑筋細胞への静水圧負荷による影響：ウシ眼球の毛様体筋から酵素処理により単一の毛様体筋細胞を単離した。その細胞をガラスボトムディッシュに播種・培養後、カルシウム指示薬 (Cal-520) を導入し、新規開発した細胞動態計測システムにセットした。その細胞にカルバコールで持続的カルシウム流入を生じさせると 200 mmHg の静水圧負荷した細胞では、カルシウムオシレーションが高頻度に認められた。しかし、低頻度であるが大気圧下でもカルシウムオシレーションを認めるため、この現象が静水圧依存性のものであるかどうかを現段階で結論づけることは難しい。そのため、今後はカルシウムオシレーションの頻度やその波形を定量的に調べ、これが静水圧依存性現象であるかを明らかにしていく。

<引用文献>

- ① Braunger, B.M., R. Fuchshofer, and E.R. Tamm. 2015. The aqueous humor outflow pathways in glaucoma: A unifying concept of disease mechanisms and causative treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95:173–181.
- ② Yamaguchi, Y., G. Iribe, T. Kaneko, K. Takahashi, T. Numaga-Tomita, M. Nishida, L. Birnbaumer, and K. Naruse. 2018. TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular Ca^{2+} concentration in mouse cardiomyocytes. *J. Physiol. Sci.* 68:153–164.
- ③ Yamaguchi, Y., G. Iribe, M. Nishida, and K. Naruse. 2017. Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 130:264–272.
- ④ Sugawara, R., Y. Takai, M. Miyazu, H. Ohinata, A. Yoshida, and A. Takai. 2006. Agonist and antagonist sensitivity of non-selective cation channel currents evoked by muscarinic receptor stimulation in bovine ciliary muscle cells. *Auton. Autacoid Pharmacol.* 26:285–292.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 YAMAGUCHI Yohei, ALLEGRIINI Benoit, RAPETTI-MAUSS Raphael, PICARD Veronique, GARCON Loic, KOHL Peter, SORIANI Olivier, PEYRONNET Remi, GUIZOUARN Helene	4. 巻 12
2. 論文標題 Hereditary Xerocytosis: Differential Behavior of PIEZO1 Mutations in the N-Terminal Extracellular Domain Between Red Blood Cells and HEK Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2021.736585	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山口陽平、西山雅祥、甲斐廣彬、金子智之、入部玄太郎、成瀬恵治、森松賢順
2. 発表標題 高静水圧で誘発される心筋細胞の緩徐な収縮現象
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口陽平、西山雅祥、金子智之、入部玄太郎、成瀬恵治、森松賢順
2. 発表標題 高圧力下で誘起される心筋細胞の収縮運動
3. 学会等名 第62回高圧討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口陽平、西山雅祥、入部玄太郎、森松賢順
2. 発表標題 細胞内カルシウム濃度変化非依存的に生じるマウス心筋細胞の圧誘発性収縮
3. 学会等名 第5回日本メカノバイオロジー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Yamaguchi, Masayoshi Nishiyama, Gentaro Iribe, Keiji Naruse, Masatoshi Morimatsu
2. 発表標題 Intracellular Calcium Concentration-independent Cardiomyocyte Contraction Triggered by High Hydrostatic Pressure
3. 学会等名 65th Annual Meeting Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口陽平、西山雅祥、入部玄太郎、森松賢順
2. 発表標題 細胞内カルシウム濃度変化非依存的に生じる心筋細胞の圧誘発性収縮
3. 学会等名 第100回北海道医学大会生理系分科会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yohei Yamaguchi, Masayoshi Nishiyama, Hiroaki Kai, Gentaro Iribe, Keiji Naruse, Masatoshi Morimatsu
2. 発表標題 High Hydrostatic Pressure induces Cardiomyocyte Contraction
3. 学会等名 第59回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>旭川医科大学生理学講座自律機能分野ホームページ http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/phys1/staff.html 旭川医科大学ホームページ(受賞・表彰の公表) http://www.asahikawa-med.ac.jp/index.php?f=show_info&topic_cd=2062 令和元年度「わくわくサイエンスinサイバル~アサヒカワ ノ カガク~」(アウトリーチ活動) http://www.awbc.jp/8572/ 平成30年度「わくわくサイエンスinサイバル」(アウトリーチ活動) http://www.awbc.jp/7626/</p>
--

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
研究協力者	金子 智之 (Kaneko Toshiyuki) (80638643)	旭川医科大学・生理学講座自律機能分野・助教 (10107)	
研究協力者	西山 雅祥 (Nishiyama Masayoshi) (10346075)	近畿大学・理工学部・准教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	フライブルク大学			
フランス	コート・ダジュール大学	パリ南大学	ピカルディ・ジュール・ヴェルヌ大学	