

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19584

研究課題名（和文）平滑筋含有臓器にわたる興奮・収縮機構の特殊性普遍性の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the specificity and commonality of the excitation-contraction mechanism across smooth muscle-containing organs

研究代表者

中山 晋介（Nakayama, Shinsuke）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30192230

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：平滑筋は全身の様々な組織臓器に分布し機能に応じた多岐に亘る運動を発生する。例えば、気管支や血管では持続的な収縮により気流・血流を調整する。一方、消化管や子宮では相性収縮を発生する。しかしながら体内の様々な臓器の運動特性に関する平滑筋の収縮・弛緩とその制御メカニズムについて、現在の医学・生理学の教科書は画一的に説明する。そこで本研究では、多様性の根底にある張力発生メカニズムを、細いフィラメント・アクチン側での制御の可能性も含め探索した。組織臓器特異的な細胞内Ca濃度の維持・変動をレシオメトリックCa感受性蛍光タンパクで測定し、その自発性興奮や収縮の特徴と関連付ける研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の医学・生理学の教科書では、生体の臓器組織において機能に応じた多様な運動を担う平滑筋の興奮・運動特性を画一的なメカニズムで説明する。そこで「多様性の背後には極めて重要な知見が潜む可能性がある」との考えで本研究を行い、方向性を見出すことができた。レシオメトリックCa感受性蛍光タンパクでの計測において、平滑筋細胞内Ca濃度は骨格筋に比べ一般に低かったが、異なる組織臓器間、同じ臓器内の異なる部位で平滑筋Ca濃度に差が認められた。また、特徴的な複合運動を発生する結腸では、その根底には平滑筋自身のCa活動があった。多様な平滑筋サブグループの発現遺伝子と対比することで、新たな予防・治療点が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Smooth muscle is distributed throughout various tissues and organs in the body, generating a wide range of movements depending on its function. For instance, in the bronchi and blood vessels, it facilitates the regulation of airflow and blood flow through sustained contractions. In contrast, in the gastrointestinal tract and uterus, it produces rhythmic contractions. However, current medical and physiological textbooks tend to provide a uniform explanation on the excitation and mechanical control of smooth muscle across various organs. This study thus explored the underlying mechanisms of tension generation, including the potential control in the thin filament actin end. We measured tissue- and organ-specific intracellular Ca concentrations using ratiometric Ca-sensitive fluorescent proteins, and conducted research to correlate these with spontaneous excitations and contraction characteristics, along with genetic information.

研究分野：内科学一般、生理学、人間医工学

キーワード：平滑筋 興奮収縮連関 細胞内Ca 多様性 共通メカニズム

1. 研究開始当初の背景

平滑筋は全身の様々な組織臓器に分布し機能に応じた多岐に亘る運動を発生する。気管支や血管では持続的な収縮により気流・血流を調整する。また泌尿生殖器では、輸尿管、子宮は緩徐な律動を繰り返し、膀胱は強く収縮し一度に尿を排出する。さらに消化管においては、その部位の機能に応じた特徴的な運動を造り出す。胃から小腸においては摂食した内容物を酵素と混和して分解し栄養素を吸収し、結腸では食物残渣を塊状にして強く推進・排出する。

体内の様々な臓器の運動特性に関与する平滑筋の収縮・弛緩とその制御メカニズムについて、医学、生理学の教科書は、画一的に説明する。例えば、消化管における内容物推進運動は蠕動運動と総称され、「内容物刺激で活性化された口側興奮性運動神経と肛門側抑制性運動神経による協調的運動」と謂われる。また、消化管を含めた平滑筋含有臓器組織では、持続的及び律動的な多様な収縮が観察されるが、どれも「ミオシン軽鎖のリン酸化・脱リン酸化を介した酵素反応」として取り扱われる。多様な興奮・運動特性がこのように単純化されたメカニズムだけで、理解できるのだろうか？疑問に感じられる。

2. 研究の目的

これまで研究代表者たちは、消化管を含めたいろいろな平滑筋含有臓器の興奮・運動特性について一連の研究を行ってきた。消化管の自発性電気興奮には、c-Kit 陽性のカハール間質細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) がペースメーカーとして働き、その細胞膜電流には小胞体の 2 種類の Ca 放出チャネル (RyR, IP₃R) と細胞膜の Ca 流入チャネルによる細胞内 Ca オシレーションが駆動する細胞膜の Ca 活性化イオンチャネルが関与することを明らかにした。さらに、ICC は消化管壁にネットワーク状に分布し、興奮伝搬にも極めて重要な役割を果たすことを解明してきた。小腸のペースメーカー電位は、いろいろな方向に伝搬するが、胃のペースメーカー電位は口側から肛門側へ伝搬することがほとんどである。このような違いの背景となるメカニズムは、いったい何か？また結腸では、(結腸)運動複合体と呼称される、間欠的に発生する群発収縮が伝搬して内容物を推進するが、その収縮・弛緩や連動性はどのようにして制御されるのか？

一方、細胞内の収縮・弛緩制御に関連して、研究代表者達は偶然にも膀胱平滑筋において相当量の cTnT が存在することを見出した。ある研究論文において、ブタ膀胱平滑筋細胞に心臓型スルフォニル尿素受容体 (SUR2A) 発現と関連した興奮制御を報告したとき、レフリーから「使用した組織が心臓でないことを示すように」とコメントを受けたので、negative control として cTnT を PCR 検査したところ、驚いたことに、はっきりとその存在が確認できた。またその後の検査で、ヒトにおいても cTnT の発現が確認できた。さらに cTnT が減少する TNNT2^{+/-} マウスから採取した膀胱平滑筋のスキンド標本 (化学処理で低分子が細胞膜透過) では、筋収縮力が減弱していた。これらの事実は、平滑筋に内在する TnT は、何らかの TnC, TnI 類似タンパクと共同し、「横紋筋類似の速い収縮・弛緩を発生させるのではないか」との示唆を与えた。

そこで本研究では、「多様性に富む (消化管を含む) 興奮・運動特性が、どのように造り出されているのか？」「持続性から相性までの多様な平滑筋収縮が、ミオシン軽鎖のリン酸化・脱リン酸化の酵素制御だけで調節されるか？」と現状の理解に疑問を投げ、多様性の根底にある自発性興奮・収縮連関メカニズム (アクチン系関与の可能性) を、いろいろな平滑筋含有組織臓器での平滑筋細胞内 Ca 濃度の維持・変動の特徴抽出するとともに、連携する細胞グループの特徴も含め理解する。

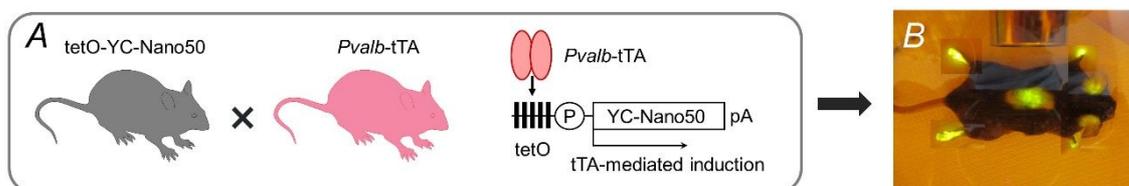


図 1 : (A) tetO-YCNano50 マウスと Pvalb-tTA マウスを交配して作製した (B) YC-Nano50 を全身の筋に発現する PVYC マウス (体表の骨格筋からの蛍光)

3. 研究の方法

(1) 細胞内 Ca ($[Ca^{2+}]_i$) 画像

テトラサイクリン転写活性化因子 (tTA) を利用して、蛍光 Ca センサタンパクをマウスに発現させた (図 1)。tetO-YC-Nano50 マウスと Parvalbumin 遺伝子 (Pvalb)-tTA マウスを交配させ、(消化管を含め) 全身の平滑筋組織に YC-Nano50 を発現するマウスを得た (図 2)。内臓器官を迅速に摘出し、管腔を切開して開口し、粘膜・内皮などを除去してシート状の試料を作製した。比較のために、腹部筋肉と横隔膜 (骨格筋) も摘出して同様の筋シート試料を作製した。

YC-Nano50 を発現する内臓筋標本を生理的外細胞液中でインキュベートし、蛍光レシオによる (Ratio-metric) $[Ca^{2+}]_i$ 測定を実施した。シート状筋標本を透析膜 (分子量カットオフ 12000) とアンカーリグによりガラス底チャンパーに固定し、それを倒立顕微鏡ステージのヒータガラス

上に設置して約 35°C に保持した。シート状筋標本は、倒立顕微鏡のレンズ (20× 長焦点) を介して励起光 (438 nm) 照明され、その放出光 (>458 nm) はイメージ分割光学装置 (W-View Gemini A12801-01) に導入され、2 色性ミラー (FF509-FDi01-25×36) を介して、CFP [FF01-483/32-25 (nm)]; YFP [FF01-542/27-25 (nm)] 蛍光イメージとして分割され、その CFP と YFP 蛍光イメージペアは、同一の CCD カメラの左右の画像として再結像された。その蛍光画像を、イメージソフトウェア (HC Image) で連続計測し (111 ms 間隔) PC メモリに保存したのち蛍光レシオを解析した。

$[Ca^{2+}]_i$ は、本レシオ蛍光装置用に蛍光補正 ($F_N = 9.11$) し Grynkiewicz 型方程式で推定した:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D [(R_F \times F_N - R_{min,p}) / (R_{max,p} - R_F \times F_N)]^{(1/n)}$$

ここで、 R_F は本レシオ蛍光装置で得られた YFP/CFP 蛍光比であり、 K_D は YC-Nano50 と Ca^{2+} の見かけの解離定数 (52.5 nM)、 n はヒル係数 (2.5)、 $R_{max,p}$ と $R_{min,p}$ は抽出 YC-Nano50 で計測された最大および最小の蛍光レシオ (27 および 2) である。

結腸筋層標本において Ca 測定中に機械的活動を同時にモニタリングするため、Ca 蛍光画像ビデオをグレースケールに変換し、関心正方形領域の縦・横 (x, y) 方向のシフトを、モーショントラッキングソフトウェア (2D-PTV Digimo) を使用し解析した。筋運動の正確な追跡のために、トラッキングする関心領域に縦走筋・輪走筋束の交差を含むように設定した。

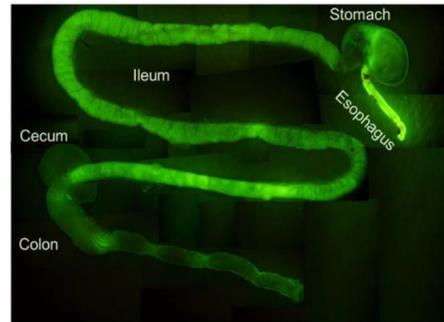


図 2. PVYC マウス抽出消化管での YC-Nano50 蛍光像の実体顕微鏡観察。

(2) 電気活動計測

低インピーダンスの 8×8 微小電極アレイ (MEA) を使用して、マウス消化管筋層 (主に結腸) の発生する細胞外電位 (フィールドポテンシャル) を微小領域 (~1mm² : 電極間距離 = 150μm) で計測した。これは関心領域の細胞が発生する膜電流 (I_M) が、MEA 感電極と参照電極の間のアクセス抵抗 (R_a) を流れることで発生する電位 ($I_M \times R_a$) である。

使用する電極 (白金黒粒子で表面積拡大) の低インピーダンス特性を利用し、50μm 四方の電極微小領域においても広帯域の電位変動が記録できた。さらに (蛍光測定と同様に) 透析膜下に固定することで、長時間電氣的に安定な計測 (R_a 安定) を実現した。

(3) 遺伝子解析

いろいろな平滑筋含有臓器組織において、YC-Nano50 遺伝子の発現量を Real-time PCR 法を用いて定量した。粘膜や内皮を除去した筋層試料において、ゲノム DNA 消化して tRNA を抽出し、逆転写して cDNA テンプレートを生成した。次に PCR Master Mix を混合し、その試料のサーマルサイクル (CT) 増幅曲線を得た。各平滑筋サンプルでの YC-Nano50 の発現は、内因性 (ハウスキーピング) 遺伝子 GAPDH で標準化され比較された。YC-Nano50 と GAPDH 生成物の増幅効率 (E) を、線形回帰によって得られた標準曲線の傾きから計算し、YC-Nano50 と GAPDH 発現量を補正した。特定テストサンプルの YC-Nano50 の発現量 [$\Delta\Delta CT(YC-Nano50)(テスト)$] は、抽出したキャリブレータ cDNA からの差分として評価した:

$$\Delta\Delta CT(YC-Nano50)(テスト) = \Delta CT(テスト) - \Delta CT(キャリブレータ)$$

$$\Delta CT = CT(YC-Nano50) \times E_{YC-Nano50} - CT(GAPDH) \times E_{GAPDH}$$

さらに、結腸における複雑な自発性活動理解のために、発表されたシングルセル (核) RNA シーケンスを NGS 解析用ダウンロードして検討した。Cell Ranger を使用して各遺伝子シーケンスを細胞 (barcode) に assign したデータを、R 上で Seurat パッケージを用いてフィルタリングし細胞クラスタ分析を行った。得られた Seurat データを使用して Windows 上で取り扱うための Loupe ファイルを作成し、関心遺伝子の発現状況を確認した。

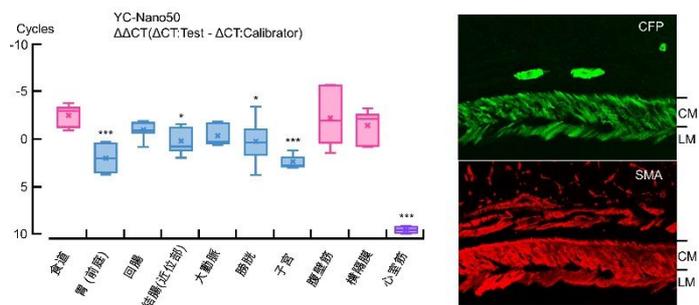


図 3. マウスでの YC-Nano50 の発現: (左) いろいろな筋肉での Real-time PCR による YC-Nano50 定量; (右) 免疫染色 (上: YC-Nano50 CFP, 下: 平滑筋アクチン) による結腸筋層における平滑筋への発現の確認。

4. 研究成果

蛍光レシオ Ca 感受性センサ YC-Nano50 を *Pvalb-tTA* を用いて筋に発現させたマウスにおいて、いろいろな部位で $[Ca^{2+}]_i$ を比較した。Real-time PCR により YC-Nano50 の発現を定量化したところ、骨格筋にはよく発現しているが、心筋では殆ど発現していなかった。一方、全身のいろいろな臓器・組織、血管、消化管、泌尿生殖器などで、YC-Nano50 は発現していたが、部位による発現量の差が認められた (図 3)。

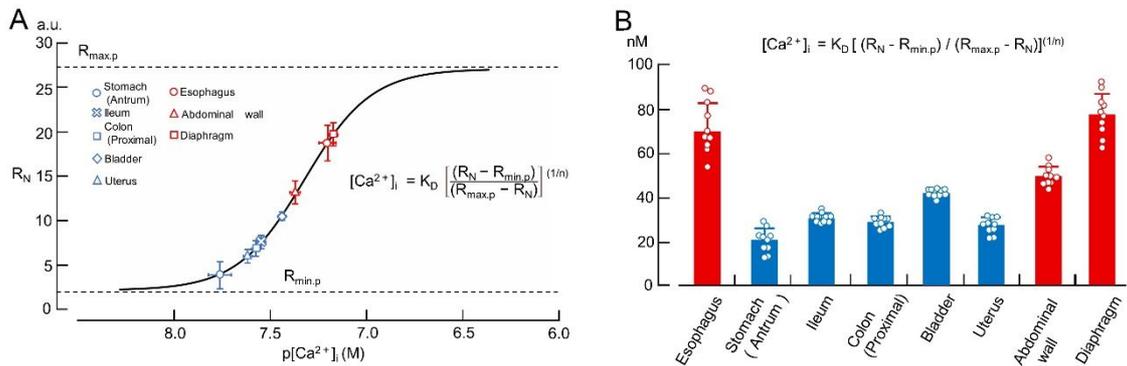


図 4 : (A) 細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を推定するための Grynkiewicz 型方程式上にプロットした PVYC マウスのいろいろな筋における標準化した YFP/CFP 蛍光比 (R_N) (B) いろいろな骨格筋 (赤) および平滑筋 (青) の $[Ca^{2+}]_i$ 。(注: マウス消化管食道は全て骨格筋)

平滑筋では骨格筋に比べ、 $[Ca^{2+}]_i$ が有意に低かった (対応して、YFP/CFP 蛍光比が有意に低かった)。比較計測した平滑筋標本では、膀胱平滑筋で $[Ca^{2+}]_i$ が高く、子宮平滑筋で最も低い値が得られた (図 4)。血管では標本間で蛍光レシオの差異が大きかった。その原因として内皮などの内因性物質関与の可能性が考えられたので、今後の検討課題とした。

消化管においては部位により $[Ca^{2+}]_i$ の差異が観察された。さらに最終年度には、胃の各部筋層を詳しく比較計測したところ、幽門部に比べ胃体部・胃底部での YFP/CFP 蛍光比 (図 4 A の式で $[Ca^{2+}]_i$ に換算) が高値を示した。平滑筋はペースメーカー細胞とギャップ結合を介し連結するので低分子イオンは細胞間を拡散する。則ち、胃底部・胃体部から幽門部にかけて臓器内でペースメーカー細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 勾配が形成される可能性がある。ペースメーカー細胞 ICC には RyR, IP₃R 小胞体 Ca 放出チャネルが発現するので、 $[Ca^{2+}]_i$ 勾配に従い Ca 活動がトリガーされ、ペースメーカー電位が口側から肛門側へと伝搬方向が制御されるのではないかと考えられた。一方、小腸のペースメーカー電位は、口側または肛門側への伝搬方向に頻度差が小さく、これは平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に大きな差異が観察されない事実と一致した。

蛍光レシオ測定において、チューブ状結腸標本から緩徐な Ca オシレーションにオーバーラップする間欠的 Ca 上昇が観察された。詳しい解析のために、結腸の近位部と中部・遠位部の筋層標本 (粘膜除去) を作製して比較した。これらの部位において基底状態の YFP/CFP 蛍光比 ($[Ca^{2+}]_i$) に差異は認められなかったが、それぞれの部位で特徴的な自発性興奮が観察された。近位部では約 4 秒周期の緩徐な Ca オシレーションが繰り返し発生した。一方、中部から遠位部では、緩やかなベースラインの上昇が閾値に達すると約 1 - 2 秒間隔で Ca スパイクが連続的に惹起される Ca ウェーブ複合体が観察された。 Ca ウェーブ複合体は、数十秒間隔で間欠的に発生した。MEA による電気活動の時空間計測においても、対応する電気現象が観察された。中部・遠位部では Ca スパイクに連動して、筋層標本は不完全強縮様の速い運動を発生した。この部位での比較的速い収縮について Ca 感受性タンパク発現との比較解析は、今後の研究での興味深い課題となった。また近位部から遠位部までの部位でも、電位依存性 Na チャネル阻害剤 (TTX) は基底 Ca 濃度を低下させた。この結果は、従来の細胞機能の分類では内在神経による神経伝達物質の持続的作用を示唆した。しかし以下の平滑筋遺伝子解析の結果と対比し、今後の研究において作用点を慎重に判定する必要があると考えられた。

消化管平滑筋組織のシングルセル RNA シーケンスデータを NGS サーバを用いて解析した。発表されたマウス結腸のシングルセル (核) RNA シーケンス (fastq ファイル) をもとに、各細胞にシーケンスを割り付けたデータを作成し、フィルタ処理してクラスタ分析を行った。平滑筋、壁内神経、c-Kit/PDGFR α 陽性間質細胞 (線維芽細胞) などの細胞クラスタデータを得た。さらに MYH11 を平滑筋マーカーとして細胞データを抽出し再クラスタ分析 (Resolution = 0.5) したところ、神経細胞や線維芽細胞の遺伝子で特徴付けられる少なくとも 3-5 以上のサブグループに分類された。それらの平滑筋サブグループでは、Myk (MLCK) だけでなく、アクチン側への収縮調節の関与が示唆されるタンパク群遺伝子を発現する平滑筋細胞群も検出された。今後の研究では、 Ca 関連タンパク群遺伝子の発現を平滑筋サブグループ間で比較し、興奮・収縮性について機能を考察したい。平滑筋サブクラス分析を行った RNA シーケンスデータでは結腸部位が特定できないので、今後の発展的研究において、自発性興奮や収縮特性の異なる近位部と中部・遠位部の別にシングルセル RNA シーケンスデータ解析や、シングルセルレベル超高空間分解能トランスクリプトーム技術等を導入することで、本研究課題である「さまざまな平滑筋含有臓器組織にわたる興奮・収縮機構の特殊性普遍性の解明」に大きく役立つと考えられた。この遺伝子データを微小領域での高度な機能計測と結びつけたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwata, N., Takai, C., Mochizuki, N., Yamauchi, M., Kaji, N., Kasahara, Y., Nakayama, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Classification of Pacemaker Dynamics in the Mouse Intestine by Field Potential Microimaging.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics: X	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biosx.2022.100111	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 Takai, C., Iwata, N., Kanemaru, K., Tanaka, K., Yu, Y., Iino, S., Nakayama, S.	4. 巻 364
2. 論文標題 Ratio-metric Measurement of Intracellular Calcium in Visceral Muscles via Selective Expression of a Yellow Cameleon Calcium Sensor.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.snb.2022.131756	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 Yoshimaru, K., Yamaza, Y., Kajioka, S., Sonoda, S., Yanagi, Y., Matsuura, T., Yoshizumi, J., Oda, Y., Iwata, N., Takai, C., Nakayama, S., Taguchi, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Dental pulp stem cells as a therapy for congenital entero-neuropathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10077-3	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 于 堯、中山 晋介、高井 千穂、岩田 尚子
2. 発表標題 NO作動性神経伝達作用を調べるための筋層の輪走・縦走方向収縮の計測
3. 学会等名 日本生理学会（第99回、仙台）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山晋介、岩田尚子、Md Sajjad Hossen
2. 発表標題 電位画像パターン分類により明らかとなった細胞内Ca放出チャネル阻害に特徴的なペースメーカー電気活動時空間連携への効果と深層学習による検証
3. 学会等名 日本平滑筋学会（第64回、名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田尚子、高井千穂、Md Sajjad Hossen Md、木原直大、中山晋介
2. 発表標題 電位画像パターン分類により明らかとなった小腸ペースメーカー時空間連携への細胞内Ca放出チャネルが関連する5-HTの効果とその深層学習による検証
3. 学会等名 中部日本生理学会（第69回、豊明）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 晋介、岩田 尚子、高井 千穂、梶岡 俊一
2. 発表標題 Multipotent dental pulp stem cells of deciduous teeth improve gastrointestinal function in a murine model of enteroneuropathy
3. 学会等名 日本生理学会（第100回、京都）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

歯髄幹細胞による先天性腸神経症の治療 ~多能性幹細胞による腸運動の再生~
<https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2022/05/post-252.html>

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	梶岡 俊一 (Kajioka Shun-ichi) (90274472)	国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授 (32206)	

	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	高井 千穂 (Takai Chiho)		
研究協力者	岩田 尚子 (Iwata Naoko)	名古屋大学・大学院医学系研究科・技術員 (13901)	

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