

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462827

研究課題名(和文)単離肝血管の収縮メカニズムから見たアナフィラキシーショック時の肝臓の役割の解明

研究課題名(英文)contraction mechanisms of blood vessels in the liver to cause anaphylactic shock

研究代表者

高野 博充(Takano, Hiromichi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70410313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：モルモット肝静脈の単離標本では、経壁神経刺激(TNS)により、アドレナリン作動性神経一過性の張力増大反応を起こした。これらの反応はニフェジピンによって抑制されなかったが、cyclopiazonic acid (CPA)またはY-27632の存在下では抑制された。TNSはまた、アドレナリン作動性の細胞内Ca²⁺増大反応を起こした。これらの細胞内Ca²⁺濃度の変化はCPAの存在下で抑制された。以上の結果からモルモット肝静脈では、受容体を介して、細胞内貯蔵部位からのCa²⁺の放出とROKを介する経路を経て収縮を起こしていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The hepatic vein was isolated from the liver in guinea pig and was measured the vasoconstriction and the intracellular Ca²⁺ concentration. By the transmural nerve stimulation (TNS) transiently increased the tension of the vein. Phenylephrine increased the tension. These responses were not inhibited by nifedipine. Cyclopiazonic acid (CPA) and Y-27632 inhibited the responses. TNS also elicited a transient increase of the cytosolic Ca²⁺ concentration. The response was inhibited in presence of tetrodotoxin or phentolamin. Phenylephrine also increased the cytosolic Ca²⁺. These cytosolic Ca²⁺ responses were inhibited in presence of CPA. These results suggest that, in the guinea pig hepatic vein, adrenergic nerves stimulate α receptor, which induce the increase of the cytosolic Ca²⁺ mainly through the intracellular Ca²⁺ stores or ROK signal, and evoked vasoconstriction to increase the vascular resistance.

研究分野：循環

キーワード：アナフィラキシー 肝臓 循環

1. 研究開始当初の背景

アナフィラキシーでは全身抵抗血管の弛緩により急激に血液循環に異常をきたす。摘出肝灌流実験法では、アナフィラキシーショックの際にマクロファージなどから放出される物質の投与や感作した標本によるアレルギー反応惹起によって、肝臓内の血管抵抗の上や肝重量の増加が認められたうえ、実際にアナフィラキシーショックが起きたとき、肝臓をバイパスしておく、と、血圧低下が緩和されることが報告されている。このことから、アナフィラキシーショック時には肝臓内血管抵抗が上昇することで腹腔循環系に血液を滞留させ、静脈還流量の減少を起こしてアナフィラキシーショックを悪化させていると考えられる。しかし、肝臓実質内に埋まっているという特徴から肝臓内の血管の平滑筋細胞としての生理機能の研究には技術的障害があり、その収縮機構は明らかになっていない。

一般的に血管は平滑筋と内皮細胞との間の液性、電気性のシグナルのやり取りにより、平滑筋細胞の収縮機構を制御している。その収縮と弛緩の機構はそれぞれの細胞内での Ca^{2+} の増減によって惹起されている。平滑筋細胞では細胞質の Ca^{2+} 濃度の増加によって張力発生機構が惹起され、内皮細胞ではその増加によって血管弛緩機構が惹起される。この Ca^{2+} の増加は細胞内貯蔵部位からの細胞質への放出や細胞膜の Ca^{2+} チャネルによる細胞外液からの流入によって起こっている。

以前、我々はモルモットの肝臓内の実質に埋まっている血管組織を、生理的機能を保ったまま実質からとりはずし、収縮反応を測定する方法を確立し、それにより、肝内の血管は一酸化窒素による弛緩反応が弱いなど、他の組織の血管とは異なる性質を見出した。本研究計画ではこの興味深い肝臓静脈系細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法を確立し、アナフィラキシーショック時の細胞レベルでの特徴

を明らかにすることで同ショックの治療法開発の一助となることを目指す。

2. 研究の目的

肝内静脈のカルシウム濃度測定:血管張力は一般に平滑筋細胞内のカルシウム濃度の上昇により増加し、平滑筋細胞を弛緩させる内皮細胞内の機構は内皮細胞のカルシウム濃度の上昇により惹起される。肝臓の血管におけるこれら細胞内カルシウム濃度が当該血管を収縮もしくは弛緩させるアゴニスト刺激によりどのように変化するかを検討し、収縮弛緩制御に至る細胞内機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 標本作成

モルモット(2週齢、雄)の肝臓右葉をナイフで切り開き、肝静脈の内面を露出させた。切断面の緑の血管と実質の間にピンセットを挿入し、そのまま血管を実質から剥離した。血管標本には枝分かれた血管に繋がる多くの穴が開いており、そのうちのひとつが含まれるように5 mm x 3 mmのストリップ標本作製した。

(2) 血管張力測定

標本を、内皮側を上にしてシリコンを張ったチャンバーにピン止めし、37度のクレブス液灌流液中に置いた。標本に含まれる穴に、水平方向の小さな張力を測定できるように特別に作成した張力トランスデューサーを引っ掛けて、その部分の張力の変化を測定した。チャンバーには二枚の白金板を、標本を挟むように配置し、この板の間に電流を流すことで、経壁的電気刺激を行えるようにした。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

0.01%cremophor 入り nominally Ca free

Krebs に CAL-520 AM (5 μ M) と Ca^{2+} (0.5 mM) を加えたロード溶液をサンプルチューブに入れ、その中に標本を入れる。これを、斜光下で、室温 15 分間、37 度で 15 分間インキュベートする。その後、標本を実験槽に固定し、通常の Krebs 溶液を 30 分間灌流させたのちに実験を行う。波長 495nm で励起して得られる 514 nm の蛍光画像を取得し、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を観察する。

4. 研究成果

(1) 肝静脈収縮に対する細胞内 Ca^{2+} の役割

標本に経壁神経刺激(持続時間 50 μ s、頻度 3 - 100Hz、1sec)をすると、刺激頻度依存的に一過性の収縮を観察した。この反応は Tetrodotoxin (3 μ M)、または Phentolamine (3 μ M) によって抑制された (Figure 1)。

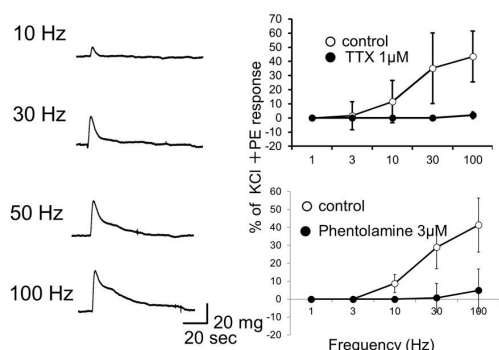


Figure 1. 経壁神経刺激による張力増大反応

Phenylephrine (1 - 30 μ M) も収縮を引き起こした。これらの収縮反応はニフェジピン (1 μ M) では変化せず、cyclopiazonic acid (CPA, 10 μ M) や Y-27632 (10 μ M) によって抑制された (Figure 2, Figure 3)。以上の結果より、モルモット肝静脈は興奮性の神経支配を受けており、それは主にアドレナリン作動性であることが分かった。その収縮メカニズムに電位依存性 L タイプ Ca^{2+} チャンネルの関与は小さく、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出機構と ROK 経路を介する信号伝達経路が主であると考えられた。

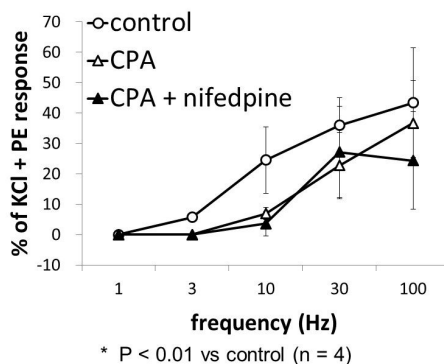


Figure 2. 神経刺激による張力増大反応に対する CPA と nifedipine の効果

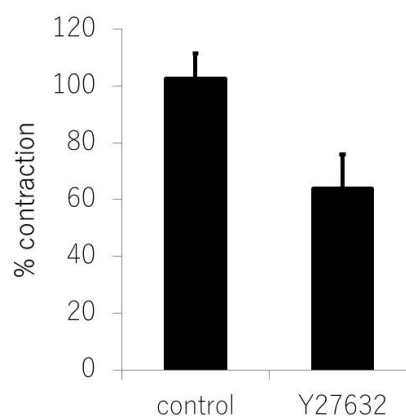


Figure 3. 10 μ M phenylephrine 収縮に対する ROK 抑制剤の効果

(2) 収縮刺激に対する肝静脈細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化機構

経壁神経刺激をすると、細胞内 Ca^{2+} 指示薬 Cal-520 の蛍光強度が一過性に増大した。この反応は Tetrodotoxin (3 μ M)、または Phentolamine (3 μ M) によって抑制された (Figure 4)。Phenylephrine (30 μ M) も

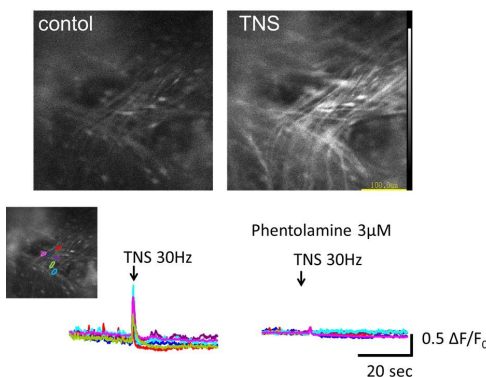


Figure 4. 神経刺激による細胞質 Ca^{2+} の変化

Cal-520 蛍光強度増大反応を起こした。CPA (10 μ M) を投与すると、Cal-520 蛍光強度が

増大した。この状態で phenylephrine を投与しても、Ca1520 蛍光強度の増大反応はほとんどみられなかった(Figure 5)。以上の結果より、モルモット肝静脈では、アドレナリン作動性神経による刺激は、受容体を介して、平滑筋細胞の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出を刺激し、細胞質 Ca^{2+} 濃度を増大させることが示唆された。

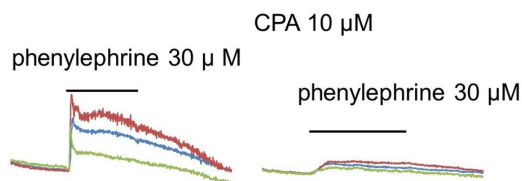


Figure 5. phenylephrineによる細胞質 Ca^{2+} の変化

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1 高野博充, 橋谷光. The intracellular mechanisms of the constriction of the guinea pig hepatic veins 第 92 回日本生理学会大会(2015 年 3 月 21 日, 神戸コンベンションセンター, 兵庫県・神戸)

高野博充, 橋谷光 モルモット肝静脈の神経性収縮にかかわる細胞内 Ca^{2+} 制御機構 第 57 回日本平滑筋学会総会(2015 年 8 月 26 日, 山口大学小串キャンパス, 山口県・宇部)

高野博充, 橋谷光 The role of intracellular Ca^{2+} on the contraction of the guinea pig hepatic vein 第 93 回日本生理学会大会(2016 年 3 月 22 日, 札幌コンベンションセンター, 北海道・札幌)

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 博充 (TAKANO HIROMICHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 70410313

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし