

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860521

研究課題名(和文) 胃の微小血管における神経性制御機構と自動能

研究課題名(英文) Neural regulation and spontaneous constrictions of microvessels in the stomach

研究代表者

三井 烈 (MITSUI, Retsu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90434092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：胃細静脈の mural cells (血管平滑筋や周皮細胞) はギャップ結合を介して同期的かつ周期的な細胞内 Ca²⁺ 上昇を示し、周期的な細静脈自発収縮を誘発した。自発収縮は、小胞体からの自発的 Ca²⁺ 放出と、L型 Ca²⁺ チャネルからの Ca²⁺ 流入に依存していた。内皮由来 NO (一酸化窒素) による収縮抑制作用と、cGMP 分解酵素 PDE5 の NO-cGMP 系抑制作用とが拮抗して自発収縮が保たれていた。食物による胃伸展で胃壁の血液循環は滞りがちだが、細静脈自動ポンプ機能がこれを緩和すると考えられた。一方、細静脈の持続的交感神経性収縮は、運動時や出血時に血液を胃腸から心臓や脳へ再配分する機構であると推察された。

研究成果の概要(英文)：The venular mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) connected each other via gap junctions in the stomach periodically exhibited synchronous, spontaneous rise in intracellular Ca²⁺ concentration followed by the rhythmic spontaneous constrictions of venules. These activities depended on both spontaneous Ca²⁺ release from intracellular Ca²⁺ store and L-type Ca²⁺ channel-mediated Ca²⁺ influx. Although endothelial nitric oxide (NO) potentially inhibited spontaneous constrictions, the cGMP degrading enzyme phosphodiesterase 5 (PDE5) continuously inhibited NO-cGMP signalling in mural cells to maintain spontaneous constrictions. The spontaneous constrictions may prevent blood stagnation during prolonged gastric wall distension by ingested food. On the other hand, a sympathetic nerve-mediated sustained venular constriction may be important for acutely draining blood from the gastrointestinal tract to other organs such as the heart and brain during exercise or haemorrhage.

研究分野：生理学、形態学

キーワード：血管平滑筋 平滑筋 微小血管 自発収縮 自律神経 細静脈 細動脈 内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

【胃微小血管制御機構を解明する意義】

食後膨満感、早期満腹感、心窩部痛、心窩部灼熱感などの症状を呈する機能性胃腸症の実質的な罹患率は、日本人では 20~30%とされており QOL や労働生産性の低下が知られている。また、これらの患者では胃の伸展に対する知覚過敏が認められる。一方、消化管壁の伸展を感知する求心性神経が粘膜下層微小血管の周囲に存在することが近年報告されている。このことから機能性胃腸症における上記の様々な知覚異常が、胃粘膜下微小循環の異常に起因している可能性も考えられる。このような病態を理解するうえで、胃粘膜下細動脈および細静脈の基本的な制御機構を明らかにすることは有用と考えられる。

【胃微小血管の神経性制御】

スポーツをしている時や出血の際には、交感神経の機能が優位となり消化管の微小血管が収縮して血液の消化管壁外への排出が促進される。また、胃の粘膜が障害されるとこれを治癒するために一次求心性神経を介して胃の微小血管が拡張し、胃粘膜血流量が増す。これらの先行研究で胃の微小循環が神経制御を受けていることが明らかにされたが、胃の粘膜下細動脈・細静脈それぞれの神経制御機構に関しては不明な点が多いため、本課題では詳細に検討した。

【中空性臓器における細静脈の自発収縮】

我々は最近、膀胱の上皮下や遠位結腸の粘膜下層の細静脈が周期的な自発収縮をすることについて報告した。膀胱や遠位結腸は、尿または糞塊で伸展されている時間が長い。この様な状況下でも細静脈が自発収縮することにより、微小循環の血流停滞を防いでいると考えられる。胃も摂取した食物により長時間伸展される器官であるため同様の機構があると仮定し、胃粘膜下細静脈の自発収縮について検討した。

2. 研究の目的

【胃粘膜下層の細動脈および細静脈に対する神経支配】

本研究では、交感神経と一次求心性神経から放出される神経伝達物質が胃粘膜下層の細動脈や細静脈に作用することにより微小循環を制御する機構を仮定し、これを検証する。様々な神経伝達物質を投与した際の反応や、神経刺激の反応を記録し、これらの反応に対する各種受容体アンタゴニストの効果を検討する。免疫染色により各種神経の細動脈・細静脈への投射や、血管平滑筋における神経伝達物質受容体の発現についても検討する。

【胃細静脈平滑筋における細胞内カルシウムの変動および胃細静脈の自発収縮】

ラット胃の粘膜下層細静脈における自発収縮について検討する。また、細胞内 Ca^{2+} イメージング法を用い、細静脈平滑筋内の自発的 Ca^{2+} 上昇についても調べる。細胞内外の Ca^{2+} の動きを抑制する試薬を投与し、細静脈平滑筋自動能の細胞内メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) **血管径変化の測定**: ラット胃の粘膜下層標本を作製し、経時的血管壁追跡ビデオシステム (Diamtrak) を用いて粘膜下細静脈の血管径変化を記録する。交感神経 (ノルアドレナリン、ATP) や一次求心性神経 (カルシトニン遺伝子関連ペプチド = CGRP、サブスタンス P) の神経伝達物の外因性投与および、神経刺激 (経壁神経刺激または、カプサイシン投与による一次求心性神経刺激) に伴う収縮や弛緩を観察し、血管径の変化として記録する。これらの収縮・弛緩反応に対する神経伝達物質受容体アンタゴニストの効果を検討し、微小血管に対する神経性の制御について調べる。また、胃細静脈で認められる周期的な自発収縮の機序についても以下の試薬を用いて検討する。筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の関与については、小胞体 Ca^{2+} ポンプ、 IP_3 受容体、 Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルなどの阻害剤を使用し、細胞外からの Ca^{2+} 流入に関する検討は、L 型 Ca^{2+} チャネル等の阻害剤を使用する。

(2) **免疫組織化学染色**: 胃の粘膜下層標本を免疫組織化学染色し、細動脈と細静脈の mural cells (血管平滑筋および周皮細胞) の形態や、これらの微小血管に対する各種神経の投射について検討する。具体的には、様々な直径の微小血管における mural cells の形態を α 平滑筋アクチン免疫染色にて描出する。交感神経はチロシン水酸化酵素に対する抗体を用いて染色する。細動脈と細静脈では mural cells の形態が異なるため、各種神経の細動脈・細静脈に対する投射を調べることができる。血管平滑筋収縮に関わる ATP 受容体である P2X1 受容体の発現についても検討する。

(3) **細胞内カルシウムイメージング**: 胃の粘膜下層標本を用いて細静脈平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 動態について検討する。カルシウム蛍光指示薬である Fluo 8-AM および Cal-520 を細静脈の平滑筋内にローディングする。カルシウム蛍光指示薬が Ca^{2+} と結合すると蛍光強度が増す性質を利用し、細胞内 Ca^{2+} の変動を調べる。多数の細静脈平滑筋の細胞内 Ca^{2+} が同期して上昇し、それに伴って細静脈の自発収縮が起こることを確認する。そのうえで、 Ca^{2+} の細胞内貯蔵庫である小胞体の機能を様々な

試薬を用いて阻害し、細静脈平滑筋細胞内で Ca^{2+} が周期的に上昇するメカニズムについて検討する。また多数の平滑筋で同期して細胞内 Ca^{2+} が上昇する機構については、L型 Ca^{2+} チャネル阻害剤やギャップ結合阻害剤などを用いて細胞外からの Ca^{2+} 流入経路や細静脈平滑筋間のギャップ結合によるカップリングに着目した検討を行う。細静脈の自発収縮機構を、平滑筋細胞レベルで明らかにする。

4. 研究成果

(1) 胃細動脈・細静脈の神経支配

胃粘膜下層標本に経壁神経刺激を与えるると、細動脈で一過性の収縮がみられたのに対し、細静脈では持続的な収縮がみられた(図1)。これらの反応は、すべて交感神経伝達物質枯渇剤 guanethidine (10 μ M) により消失したことから、交感神経性収縮である。受容体アンタゴニスト・アゴニストを用いた実験の結果、細動脈ではノルアドレナリンとプリン(ATPなど)が、細静脈ではノルアドレナリンのみが、交感神経性収縮に寄与していた。この生理学的所見と符合して、P2X1 プリン受容体の免疫陽性反応は、細静脈平滑筋にはみられず、細動脈平滑筋のみに認められた。

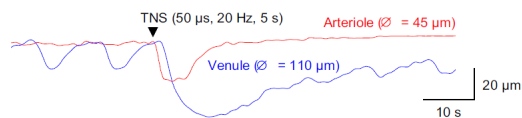


図1:ラット胃粘膜下層標本内の細動脈および細静脈に対する経壁神経刺激(TNS)の効果。並走する細動脈(赤)および細静脈(青)の直径変化を記録している。細静脈では、自発的な収縮がみられ、さらにTNSにより、長く持続する収縮(直径の減少)が認められた。

一方、カプサイシン(300 nM)により一次求心性神経を活性化させると細静脈の拡張がみられた。この拡張反応は、求心性神経の伝達物質であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の放出を介していた。

胃粘膜下層標本をもちいた免疫染色においてチロシン水酸化酵素陽性交感神経およびCGRP陽性一次求心性神経が、細動脈および細静脈に投射していたことも、生理学的所見と符合する。

(2) 胃細静脈 mural cells の形態学的特徴

アルファ平滑筋アクチン免疫染色により、胃粘膜下層細静脈 mural cells (血管平滑筋および周皮細胞)の形態学的特徴について検討した(図2)。直径15~20 μ mの毛細血管後細静脈(postcapillary venule)では、まるい細胞体から様々な方向へ突起をのぼす星形の mural cells がみられた(図2 a-c)。これに対し、太い細静脈では輪状の平滑筋が認められた

(図2 d)。

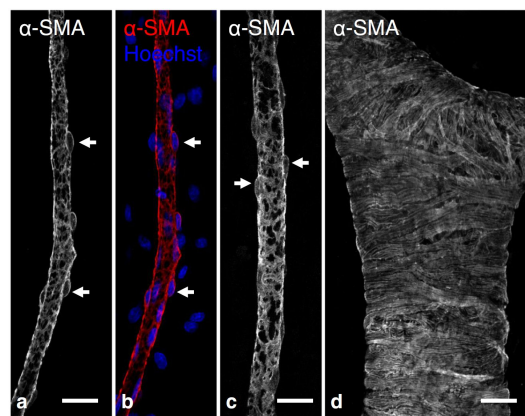
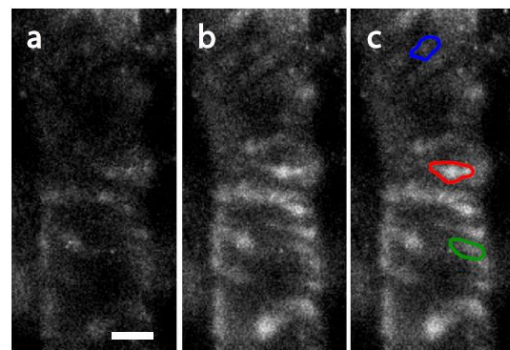


図2:ラット胃粘膜下層における細静脈 mural cell の形態。直径約15 μ m (a, b)、20 μ m (c) および70 μ m (d)の細静脈 mural cells をアルファ平滑筋アクチン免疫染色で描出した。青は核を、矢印は mural cells のまるい細胞体を示す。スケールバーは20 μ m を示す。

(3) 胃細静脈の自発 Ca^{2+} 上昇と自発収縮



d

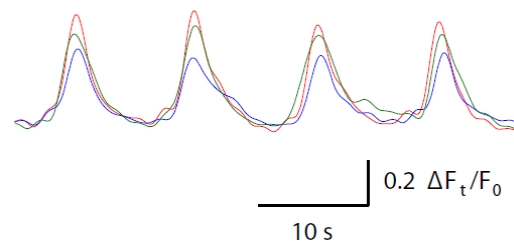


図3:ラット胃粘膜下層標本内の細静脈平滑筋における自発的細胞内 Ca^{2+} 上昇。カルシウム蛍光指示薬 Fluo-8 をローディングした細静脈平滑筋における、細胞内 Ca^{2+} 上昇前(a)と後(b)の像を示している。白く光って見える部分は、細胞内 Ca^{2+} が上昇していることを示す。青、赤、緑で示した3つの平滑筋(c)で記録された Ca^{2+} 変動のトレースを重ねると同期していることがわかる(d)。写真のスケールバーは20 μ m を示す。

経時的血管壁追跡ビデオシステムにより、胃細静脈では、周期的な自発収縮が記録された(図1の青いトレースを参照)。この所見と合致して、細胞内カルシウムイメージング法により様々なサイズの細静脈(直径15~130 μm)において mural cells 内の自発的 Ca^{2+} 上昇が記録された。図3では、長細い細静脈平滑筋細胞内における Ca^{2+} 上昇の例を示しているが、図2 a-c で形態を示したような直径20 μm 前後の毛細血管後細静脈では、まるい細胞体において周期的 Ca^{2+} 上昇が認められた。

(4) 胃細静脈自発収縮の発生機構

細静脈 mural cells 内では、小胞体 IP_3 受容体からの自発的 Ca^{2+} 放出が Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルを活性化して、脱分極(細胞外への Cl^- 流出)がおり、それに続く L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入により細静脈が自発収縮すると考えられた。

ギャップ結合阻害剤 carbenoxolone (3 μM) により、毛細血管後細静脈 mural cell 間における自発的 Ca^{2+} 上昇の同期性が失われた(図4)。この試薬を洗い流すとすぐに細胞間の自発的 Ca^{2+} 上昇同期性が回復したことから、細静脈 mural cells はギャップ結合を介して機能的合胞体を形成していると考えられた。

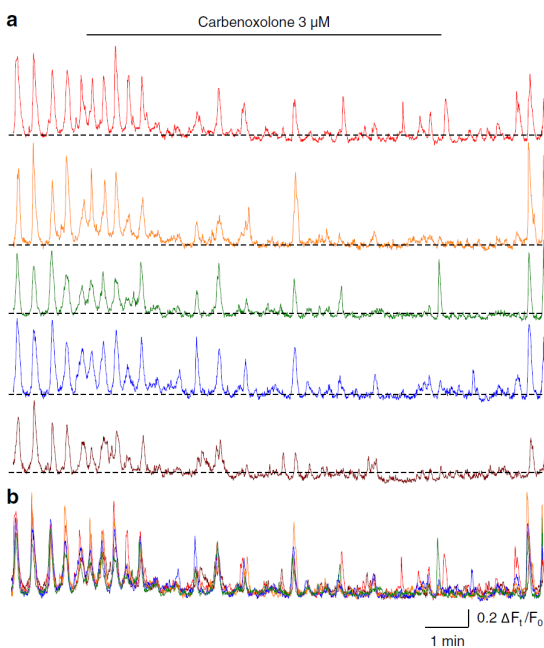


図4:胃粘膜下毛細血管後細静脈 mural cells の自発的細胞内 Ca^{2+} 上昇に対するギャップ結合阻害剤の効果。カルシウム蛍光指示薬 Cal-520 をローディングした5つの mural cells (5色のトレース)において同期した自発的 Ca^{2+} 上昇がみられた。その振幅は、carbenoxolone (3 μM) により減弱した(a)。5つのトレースを重ねると、細胞間の同期性も徐々に崩れていくことがわかる(b)。阻害剤を洗浄すると自発的 Ca^{2+} 上昇の振幅と同期性はもとに戻った。

(5) PDE5 による胃細静脈自発収縮の維持

一般的に、内皮細胞から放出される一酸化窒素(NO)は、mural cells 内で cGMP を介して血管の収縮性を減弱させる。cGMP 分解酵素 phosphodiesterase 5 (PDE5) は、この NO-cGMP 系に拮抗するはたらきをもつ。

胃毛細血管後細静脈において、PDE5 阻害剤 tadalafil (1 μM) を投与したところ、ただちに mural cells 間における自発的 Ca^{2+} 上昇の同期性が失われ(図5)、自発収縮が停止または抑制された。NO 合成阻害剤 L-NA (100 μM) 存在下で tadalafil を添加した場合は、自発的 Ca^{2+} 上昇の同期性は崩れなかった。これらの結果より、PDE5 による cGMP 分解は、NO/cGMP 系による自動能抑制作用に歯止めをかけ、周期的な自発収縮を保つうえで必須であることが明らかとなった。

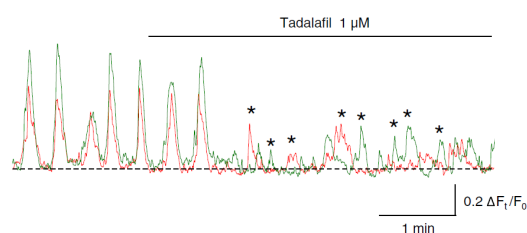


図5:胃毛細血管後細静脈 mural cells の自発的 Ca^{2+} 上昇に対する PDE5 抑制剤の効果。2つの mural cells (赤と緑のトレース)間で自発的 Ca^{2+} 上昇は同期していたが、tadalafil (1 μM) により同期性が失われた。アスタリスクは、同期性の失われた自発的 Ca^{2+} 上昇の例を示している。

(6) まとめ

本研究では、毛細血管後細静脈において、星形の mural cells における周期的かつ自発的な細胞内 Ca^{2+} 上昇および、それにつづく周期的な自発収縮をはじめて記録した。細静脈ポンプ機能により、胃伸展時にも途絶えることなく血液を臓器外へ排出し、毛細血管での物質交換(組織への酸素・栄養の供給および組織からの二酸化炭素・老廃物の回収)を維持するものと考えられた。この観点から、胃静脈系の自動能は、微小循環の停滞に起因する胃粘膜障害をふせぐはたらきがあると考えられた。

一方、交感神経性の持続的な細静脈収縮は、運動時や出血時に胃腸から血液を速やかに排出し、脳や心臓の血液量を増やすための機構であると考えられた。

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3件)

Mitsui R, Hashitani H. Properties of synchronous spontaneous Ca^{2+} transients in the mural cells of rat rectal arterioles.

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 2017 印刷中 査読有
DOI: 10.1007/s00424-017-1978-y

Mitsui R, Hashitani H. Mechanisms underlying spontaneous constrictions of postcapillary venules in the rat stomach.

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 2016 468:279-291. 査読有
DOI: 10.1007/s00424-015-1752-y

Mitsui R, Hashitani H. Functional properties of submucosal venules in the rat stomach.

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 2015 467:1327-1342. 査読有
DOI: 10.1007/s00424-014-1576-1

[学会発表](計8件)

三井烈、橋谷光 ラット直腸細動脈壁細胞の自発 Ca^{2+} 上昇機構 第94回 日本生理学会大会(2017年3月28日-30日)、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

三井烈、橋谷光 ラット直腸細動脈における自発的 Ca^{2+} 上昇発生機構 第58回 日本平滑筋学会総会(2016年8月18日-19日)、東北医科薬科大学(宮城県・仙台市)

三井烈、橋谷光 ラット胃毛細血管後細静脈の自動能 第93回 日本生理学会大会(2016年3月22日-24日)、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

三井烈、橋谷光 伸展性臓器における壁内微小血管の自発活動 第75回 日本解剖学会中部支部学術集会(2015年10月3日-4日)、福井大学医学部(福井県・吉田郡)

三井烈、橋谷光 胃粘膜下層における毛細血管後細静脈の自発収縮機構 第57回 日本平滑筋学会総会(2015年8月26日-27日)、山口大学医学部(山口県・宇部市)

三井烈、橋谷光 ラット胃粘膜下層の毛細血管後細静脈における自発活動の性質 第92回 日本生理学会大会 第120回 日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(2015年3月21日-23日)、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

三井烈、橋谷光 壁伸展を受ける平滑筋臓器における細静脈の自動性について 筋生理の集い(2014年12月6日)、東京慈恵会医科大学(東京都・港区)

三井烈、橋谷光 ラット胃粘膜下細静脈の自動能に関する検討 第56回 日本平滑筋学会総会(2014年8月7日-8日)、新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市)

(1)研究代表者

三井 烈 (MITSUI, Retsu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90434092