

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 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：2016～2017

課題番号：16K19361

研究課題名(和文)直腸微小血管の制御機構と自動能

研究課題名(英文)Spontaneous activity and regulatory mechanisms of rectal microvessels

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：直腸細動脈 mural cells (血管平滑筋や周皮細胞) は周期的かつ同期的な自発細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇を示した。小胞体からの自発 Ca<sup>2+</sup> 放出に続く Ca<sup>2+</sup> 活性化 Cl<sup>-</sup> チャネルを介した Cl<sup>-</sup> 流出 (= 脱分極) は、ギャップ結合でつながる近隣の mural cells を脱分極させて電氣的に同期させると考えられた。続く T 型および L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルからの Ca<sup>2+</sup> 流入により細胞間で同期した自発 Ca<sup>2+</sup> 上昇が生じた。T 型と L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルは、それぞれ自発 Ca<sup>2+</sup> 上昇の頻度と持続時間も増加させた。自発 Ca<sup>2+</sup> 上昇に基づく細動脈自発収縮は、直腸壁が糞塊で伸展される際の虚血リスクを低下させると推察された。

研究成果の概要(英文)：The mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) of rectal arterioles periodically exhibited synchronous, spontaneous rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. These spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients depended on Ca<sup>2+</sup> release from endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store and subsequent Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel opening-mediated Cl<sup>-</sup> efflux which are expected to cause membrane depolarisation. The depolarisation appeared to be large enough to electrically couple the mural cells connected via gap junctions. Subsequent Ca<sup>2+</sup> influxes through T-type (TVDCs) and L-type (LVDCs) voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels underlay 'synchronous' spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients among the mural cells. The openings of TVDCs and LVDCs increased Ca<sup>2+</sup> transient frequency and duration, respectively. The synchronous spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients in the mural cells may underlie the spontaneous constrictions of arterioles to prevent the rectum from ischemic damage during the prolonged wall distension by faecal pellets.

研究分野：生理学・形態学

 キーワード：細動脈 平滑筋 周皮細胞 カルシウムイメージング 自発活動 Cl<sup>-</sup>チャネル 電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル  
 ギャップ結合

## 1. 研究開始当初の背景

### 【直腸微小血管の制御機構を明らかにする意義】

過敏性腸症候群 (IBS; irritable bowel syndrome) の患者では、慢性的な腹痛あるいは腹部不快感に下痢や便秘などの便通異常を伴い、便通によってこれらの症状が軽減する。日本では10%以上の人々が罹患していると推察されており、ストレスで悪化することなどからも現代の日本社会で罹患率のさらなる増加が懸念される疾患と考えられる。

IBS の患者では、直腸伸展刺激に対する閾値が低下しており、腹部に感じる痛みとの相関がある。消化管壁の伸展を感知する求心性神経は粘膜下層微小血管の周囲に存在するとの報告が近年なされたことから、腸壁内微小血管の血流低下やうっ滞により IBS における伸展知覚異常がひきおこされている可能性も考えられる。本研究において直腸微小血管の制御機構を明らかにすることは、将来的に IBS における知覚異常と血流停滞・うっ血との関連性を検討する上で有用と考えられる。

### 【伸展性臓器における微小血管の自発収縮】

我々は最近、膀胱の上皮下や遠位結腸および胃の粘膜下層の細静脈が周期的な自発収縮を発生することについて報告した。膀胱や遠位結腸や胃は、尿や糞塊や食物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。

本研究では、排便直前の糞塊がとどまる場所である直腸でも同様の細静脈における自発収縮がみられると予想している。また、これまで消化管の他の部位で検討していない粘膜下細動脈の自発細胞内  $Ca^{2+}$  変動についての検討も試みる。

## 2. 研究の目的

### 【直腸微小血管の自発活動】

予備検討により、ラット直腸の粘膜下細静脈にも、膀胱や胃と同様に自発収縮が認められ、さらには、粘膜下の毛細血管前細動脈 (precapillary arteriole) においても自発的かつ周期的な細胞内  $Ca^{2+}$  変動がみられた。このことから、直腸では、細動脈系も細静脈系も自発活動機構をもつと考えられた。

直腸は、消化管の中でも特に内容物による強く持続的な圧迫を受ける部位であるため、これらの自発活動が血流停滞・うっ血を防止すると推察される。これらの自発活動における細胞内メカニズムおよびギャップ結合による細胞間のつながりについて薬理学的に検討する。

### 【直腸微小血管の制御】

直腸細動脈系の自発活動に対する内皮細胞の制御について検討する。血管研究のモデル

である腸間膜動脈では、内皮細胞が一酸化窒素 (NO) を放出したり、内皮細胞の  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャンネル開口による過分極が血管平滑筋へ伝わったりすることで血管拡張がおこる。本研究では、NO や  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャンネルと直腸細動脈自発活動との関連を調べる。

また、経壁神経刺激を用いた生理学的実験により直腸粘膜下の微小血管に対する神経性制御に関しても検討する。IBS 患者では直腸や結腸の粘膜にプロテアーゼの発現が増加し、直接、求心性神経の protease-activated receptor 2 (PAR<sub>2</sub>) に作用して知覚過敏をひきおこす。直腸微小血管の神経刺激誘発性収縮に対する PAR<sub>2</sub> アゴニストの効果については不明であるため、検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内カルシウムイメージング

摘出した直腸から粘膜と平滑筋層を取り除き、粘膜下層のみのシート状標本 (粘膜下層標本) を作製する。カルシウム蛍光指示薬 Cal-520 を微小血管 mural cells (血管平滑筋や周皮細胞の総称) 内にローディングする。Cal-520 が  $Ca^{2+}$  と結合すると蛍光強度が増す性質を利用し、mural cell 内  $Ca^{2+}$  の変動を調べる。多数の mural cells の細胞内  $Ca^{2+}$  変動を同時に記録できるため、細胞間同期性についても検討できる。ギャップ結合や  $Ca^{2+}$  活性化  $Cl^-$  チャンネルや各種  $Ca^{2+}$  チャンネルの阻害剤などを用い、細胞間同期メカニズムを解明する。

内皮が mural cell 内の自発  $Ca^{2+}$  変動に及ぼす影響についても、NO 合成酵素阻害剤や cGMP 分解酵素の阻害剤や  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャンネル阻害剤などを用いて調べる。

### (2) 免疫組織化学染色

直腸の粘膜下層標本を免疫染色し、そのままスライドグラスに貼り付けて共焦点レーザー顕微鏡で観察するため、微小血管網をそのまま観察することができる。

微小血管を  $\alpha$  平滑筋アクチン抗体で染色して mural cells の形の特徴を検討し、また他のマーカーとの二重染色により細静脈と細動脈との識別を試みる。内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体を用いて直腸細動脈の内皮細胞における NO 産生の有無についても検討する。

### (3) 血管径変化および血管張力の測定

ラット直腸の粘膜下層標本を作製し、Diamtrak (経時的血管壁追跡ビデオシステム) を用いて粘膜下層の細動脈・細静脈の血管径変化を記録する。経壁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。また、直径 100  $\mu m$  以上の血管にステンレスワイヤーを2本通して血管張力変化を測定するシステムである wire myograph を用い、ラット腸間膜動脈において  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャンネル阻害剤の効果を確認する対照実験を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 直腸粘膜下における細動脈系の構造

直腸粘膜下層標本の免疫組織化学染色により細動脈系の構造と細動脈 mural cells (血管平滑筋や周皮細胞) の特徴を明らかにした。

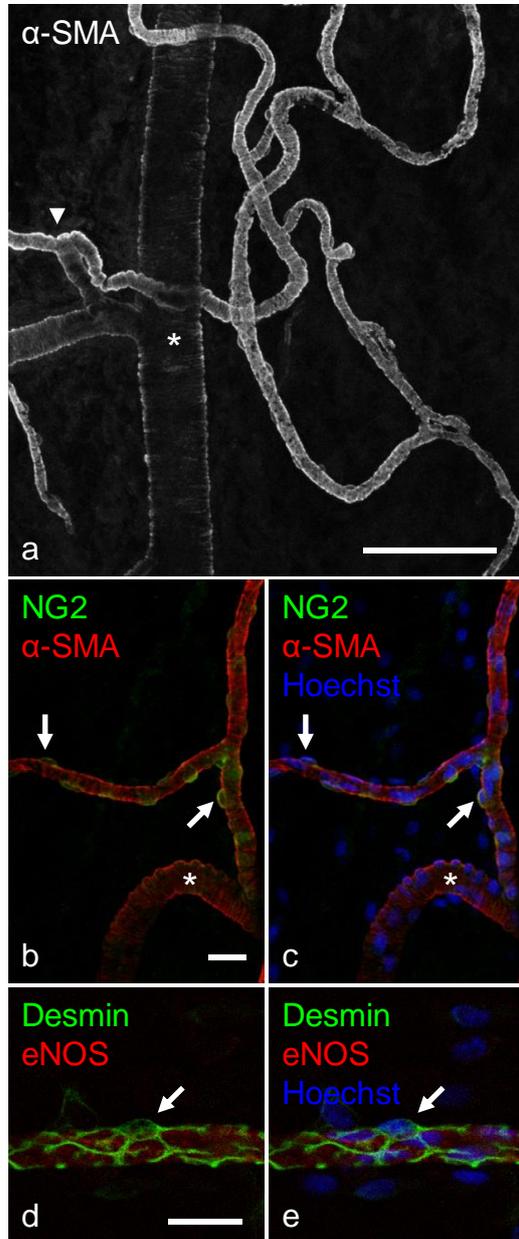


図1：免疫組織化学染色により明らかにしたラット直腸粘膜下層細動脈の特徴。アルファ平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) 免疫染色で細動脈網を描出した (a)。直径約  $50 \mu\text{m}$  の細動脈 (星印) が矢頭の位置で分枝し、直径約  $20 \mu\text{m}$  の曲がりくねった枝となっている。細動脈 mural cells は、NG2 陽性の丸い細胞体を有していた (b, c 矢印)。青色は核を示す。細動脈 mural cells はデスミン陽性で丸い細胞体から数本の突起を出していた (d, e 矢印)。eNOS 陽性の内皮が赤色で示されている。スケールバーは  $100 \mu\text{m}$  (a) と  $20 \mu\text{m}$  (b, d) を示す。

ラット直腸粘膜下層には、複雑にまがりくねった直径  $20 \mu\text{m}$  ほどの毛細血管前細動脈が豊富に認められた (図 1 a)。この細動脈のアルファ平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) 免疫陽性 mural cells は、通常の紡錘形をした血管平滑筋とは異なり、丸い細胞体を有してそこから突起を数本のばしていた (図 1 b-e)。

##### (2) 直腸細動脈における自発活動

直腸粘膜下層の毛細血管前細動脈 mural cells の丸い細胞体では、周期的でかつ細胞間で同期した自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇がみられた (図 2)。

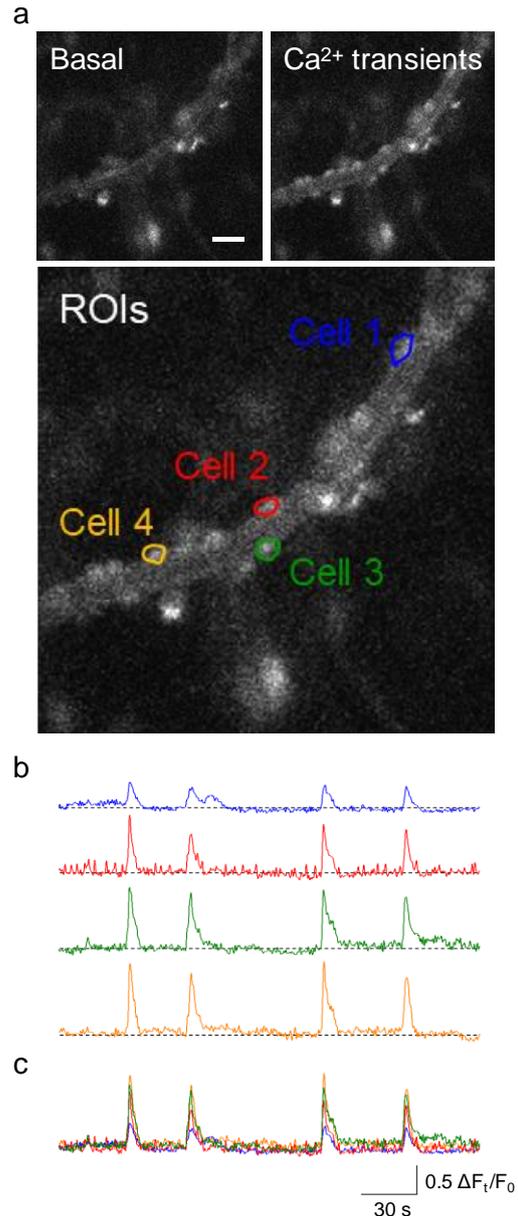


図2：細胞内カルシウムイメージングによる直腸粘膜下細動脈自発活動の記録。細動脈 mural cells の自発細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇前後の比較 (a)。この細動脈から選んだ4つの mural cells の自発活動のトレース (b) を重ねると同期性が確認できた (c)。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

### (3) 直腸細動脈自発活動のメカニズム

直腸粘膜下層の毛細血管前細動脈 mural cells で観察された自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇のメカニズムについて各種阻害剤などを用いて検討した (図 3)。

CPA (10  $\mu\text{M}$ ) により、小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  再取り込みを担う  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を阻害すると周期的な自発活動は停止した (図 3 a、図 4)。小胞体  $\text{IP}_3$  受容体の阻害剤とされる 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) や caffeine (1 mM) は、自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を減弱させて細胞間の同期性を乱した。これらの所見から、 $\text{IP}_3$  受容体を介した小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が mural cell 自発活動の基盤となっていると考えられた (図 4)。

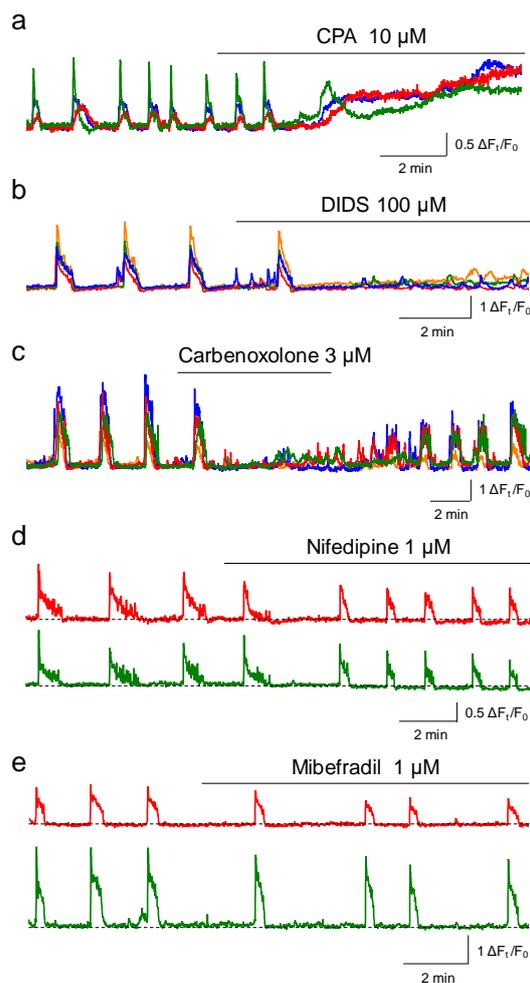


図 3 : 直腸粘膜下細動脈 mural cells における自発活動の機序。小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  再取り込みを阻害する CPA は、細動脈 mural cells の自発細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を消失させ、細胞質の basal  $\text{Ca}^{2+}$  level を増加させた (a)。3 つの mural cells から記録した 3 色のトレースが重ねて示してある。 $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  チャンネル阻害剤 DIDS やギャップ結合阻害剤 carbenoxolone は、自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を減弱させ細胞間同期性を乱した (b, c)。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤 nifedipine と T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤 mibefradil は、細胞間同期性を乱さず、それぞれ自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の持続時間と頻度を減少させた (d, e)。

$\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  チャンネル阻害剤 DIDS (100  $\mu\text{M}$ 、図 3 b) や低  $\text{Cl}^-$  溶液 (134.4 mM から 12.4 mM へ減らした) の灌流により、mural cells の自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は減弱し、細胞間の同期性が失われた。これらの所見から、mural cells は常に  $\text{Cl}^-$  を盛んに細胞内へとりこみ、小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出の際に  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  チャンネルが開くと  $\text{Cl}^-$  を細胞外へ放出して脱分極すると考えられた (図 4)。

ギャップ結合阻害剤である carbenoxolone (3  $\mu\text{M}$ 、図 3 c) や 18 $\beta$ -GA (10  $\mu\text{M}$ ) は、mural cells の自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を減弱させ、細胞間の同期性を消失させた。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤 nifedipine (1  $\mu\text{M}$ 、図 3 d) は、個々の自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の持続時間を減少させ、T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤 mibefradil (1  $\mu\text{M}$ 、図 3 e) や ML218 (1  $\mu\text{M}$ ) は、自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の頻度を減少させた。以上の所見から、 $\text{Cl}^-$  流出による脱分極は、ギャップ結合を介して近隣の mural cells を脱分極させ、T 型および L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを開くさせると考えられた (図 4)。T 型および L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、それぞれ自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の頻度上昇と持続時間延長に寄与していた。

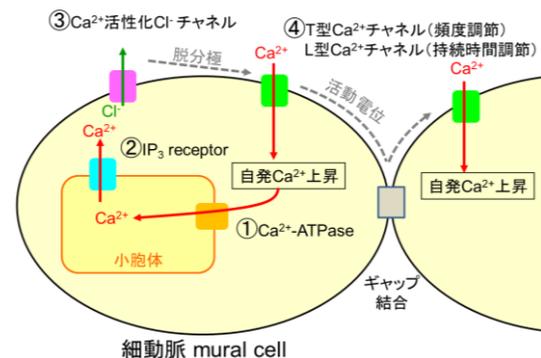


図 4 : 想定される直腸細動脈 mural cells における自発活動の機序。詳細は本文参照。

細動脈と細静脈の相違については以下の所見を得た。これまでに報告してきた胃や膀胱の細静脈に加えて、直腸の粘膜下細静脈でも周期的な血管平滑筋内の自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇や、それともなう自発収縮がみられた。これらの細静脈平滑筋における自発  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤 nifedipine (1  $\mu\text{M}$ ) で大幅に減弱し、細胞間同期性も失われた。これに対して、直腸細動脈では nifedipine 存在下でも細胞間の同期性が保たれた (図 3 d)。細静脈平滑筋どうしが電氣的に同期するためには、 $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  チャンネル開口による脱分極につづく電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの開口で脱分極がさらに増強される必要があると考えられる。これに対して細動脈では、 $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  チャンネル開口による脱分極が比較的大きく、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの開口が無くても電氣的同期が起こるものと推察された。

(4) 内皮による直腸細動脈自発活動の制御  
上述した(1)～(3)の研究結果をまとめて論文として報告した(Mitsui & Hashitani, 2017, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*)。これを土台とし、次に直腸粘膜下細動脈 mural cells の自発  $Ca^{2+}$  上昇に対する内皮細胞の制御についても検討を開始した。

NO 合成酵素阻害剤 L-NA が、自発  $Ca^{2+}$  上昇頻度を上げ、逆に cGMP 分解酵素 phosphodiesterase 5 (PDE5) の阻害剤 tadalafil は頻度を減少させることを示唆する結果が得られつつある。また、免疫染色により直腸細動脈の内皮細胞における内皮 NO 合成酵素 (eNOS) の発現も確認した(図 1 d, e)。このことから、内皮から NO が常に放出され、細動脈自発活動を抑制するものと考えられた。NO 放出量は血液と内皮との間のずり応力で増加する。血流不足の際には、NO 放出量が減り細動脈の周期的自発収縮機能(ポンプ機能)が一層増して血流を回復させる可能性が考えられた。

一方、小コンダクタンス  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル阻害剤 apamin や中コンダクタンス  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル阻害剤 TRAM-34 は、直腸細動脈 mural cells の自発  $Ca^{2+}$  上昇に影響をおよぼさないことが示唆された。先行研究どおりこれらの試薬は、 $\alpha$  アドレナリン受容体アゴニストであらかじめ収縮させておいたラット腸間膜動脈の NO 非依存性アセチルコリン誘発性弛緩を抑制した(wire myograph を用いた実験)。したがって、 $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネルは、毛細血管前細動脈の内皮細胞では重要な働きをしていない可能性が示唆された。

#### (5) その他の直腸細動脈制御機構

経時的血管壁追跡ビデオシステムを用い、粘膜下層の細動脈および細静脈の血管径変化を記録することで血管収縮性を評価した。直腸粘膜下細動脈に経壁神経刺激を行ったところ、ノルアドレナリンおよびプリンを介した交感神経性の血管収縮が認められた。PAR<sub>2</sub> (protease-activated receptor 2) アゴニスト SLIGRL-NH<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) は、この交感神経性収縮反応を抑制した。SLIGRL-NH<sub>2</sub> を洗い流すと、すぐに神経性収縮の振幅は元の大きさに戻った。一方、SLIGRL-NH<sub>2</sub> は細静脈の自発収縮に顕著な影響をおよぼさなかった。

#### (6) まとめ

直腸毛細血管前細動脈 (precapillary arteriole) において典型的な紡錘形血管平滑筋とは異なり、丸い細胞体から数本の突起をのばす mural cells が観察された。これらの mural cells 間で同期した周期的な自発細胞内  $Ca^{2+}$  上昇がみとめられ、その機序について明らかにした(図 4)。直腸壁は糞塊により持続的に伸展されると血液が滞りがちであるが、mural cells の自発  $Ca^{2+}$  上昇が細動脈系の周期的自発収縮をひきおこし、ポンプ作用により直腸粘膜への酸素・栄養の供給を維持すると推察さ

れた。直腸細動脈系の自発活動は、虚血やそれに伴い得る粘膜障害を未然に防止する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 1 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 469:1189-1202. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 三井烈、橋谷光 直腸細動脈壁細胞の自発  $Ca^{2+}$  上昇と内皮によるその制御 第 95 回 日本生理学会大会 (2018 年 3 月 28 日-30 日)、サンポートホール高松
- ② 橋谷光、ラング リチャード、三井烈 カルシウムイメージングと形態学の融合による平滑筋ペースメーカー細胞の同定 第 95 回 日本生理学会大会 (2018 年 3 月 28 日-30 日)、サンポートホール高松
- ③ 三井烈、橋谷光 ラット直腸細動脈における自発細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇の細胞間伝播 第 59 回 日本平滑筋学会総会 (2017 年 8 月 23 日-25 日)、福岡大学
- ④ 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
- ⑤ 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

[図書] (計 1 件)

Hashitani H, Mitsui R. Role of pericytes in the initiation and propagation of spontaneous activity in the microvasculature. In: Smooth muscle spontaneous activity - Physiological and pathological modulation. Springer

[その他]

2018 年 日本平滑筋学会第 4 回白鳥常男賞 (受賞対象論文: 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 469:1189-1202.)

#### 6. 研究組織

(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