

令和元年6月24日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15553

研究課題名(和文) 眼内平滑筋収縮の持続相におけるカルシウムイオン流入メカニズムの解明

研究課題名(英文) Influence on light reflex of TRPC knockout on mouse intraocular smooth muscle

研究代表者

金子 智之(Toshiyuki, Kaneko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80638643

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)：眼内平滑筋の自律神経刺激に伴う収縮の持続相は、他の多くの平滑筋の場合と同様、細胞外からのCa²⁺流入を必要とするが、その分子実体の詳細はいまだわかっていない。本研究では細胞外からのCa²⁺流入を担う候補分子としてTRPC3とTRPC6に着目し、野生型、TRPC3およびTRPC6のノックアウト、さらにダブルノックアウトを加えた4系統のマウスにおいて対光反射測定を行った。その結果、TRPC3のノックアウトマウスの縮瞳径は野生型を含めた他の系統との比較において有意に小さくなる傾向がみられた。このことは瞳孔散大筋の収縮調節にTRPC3が関与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほとんどの平滑筋はその性質上、非侵襲的に収縮を観察することは不可能である。そのため、力学的な特性はともかく、実験によって観察された収縮がどのような生理学的意義を持つのかという点に関しては慎重な考察をしなければならない。唯一、瞳孔括約筋などの眼内平滑筋だけが構造的に非侵襲的な観察を可能とするが、その扱いの難しさから他の平滑筋と比べると知見が極端に少なく、十分な研究が行われているとは言い難い。本研究は他の平滑筋では不可能な完全に非侵襲状態での収縮を測定したものであり、今回の結果はいずれの意味でも貴重な知見となり得るものである。

研究成果の概要(英文)：The sustained phase of contraction associated with autonomic nerve stimulation of intraocular smooth muscle, like many other smooth muscles, requires extracellular Ca²⁺ influx, but the details of its molecular entity are still unknown. In this study, we focused on TRPC3 and TRPC6 as candidate molecules responsible for Ca²⁺ influx from extracellular, and measured light reflectance in four strains of mice with wild type, TRPC3 and TRPC6 knockouts, and double knockouts added. As a result, the pupil diameter and contraction time constant showed almost no difference between the strains, but the pupil diameter of TRPC3 knockout mice tended to be significantly smaller in comparison with other strains including wild type. This results suggest that TRPC3 may be involved in the regulation of contraction of pupillary dilator.

研究分野：生理学

キーワード：生体膜 チャンネル トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

視覚は哺乳類にとって重要な感覚器であるため、視覚情報を適切に取り込む為の機構は非常によく発達している。虹彩は瞳孔の大きさを調節して網膜に入る光の量を調節する役割を持ち、その中に含まれる瞳孔括約筋は縮瞳のみに関与し、副交感神経によって単一支配されている特殊な平滑筋である。光の量を適切に保つために虹彩は素早く瞳孔径を変化(急速相)させ、その瞳孔径を長時間維持(持続相)し続けなくてはならず、特に明るい環境下では縮瞳は数時間以上続かなくてはならない。平滑筋の収縮は主に細胞内のカルシウム濃度によってコントロールされており、急速相では、細胞膜上のCa²⁺チャンネルが開く事により、細胞外から濃度勾配によって取り込みが行われ、持続相においては細胞内小器官の一つである小胞体からリアノジン受容体やイノシトール3リン(IP3)酸受容体からの放出によって制御されていると考えられている。持続した収縮がさらに長時間に及ぶ場合、小胞体のCa²⁺ストアもやがて枯渇し、この枯渇をシグナルとして細胞膜上のCa²⁺チャンネルが開くと考えられるが、このCa²⁺チャンネルについて、その実体や作用機序は未だわかっていない。

近年、TRP チャンネル群が細胞におけるセンサータンパク質として働き、また様々なタンパク質と相互作用することから注目を集めてきており、そのサブファミリーであるTRPC 群はCa²⁺透過型非選択性カチオンチャンネルであり、受容体刺激を介さない細胞内Ca²⁺ストア枯渇や小胞体のIP3 受容体との構造上直接的なカップリングにより活性化される可能性を示唆する報告がある。平滑筋におけるTRPC チャンネルの実験は腸管や血管等で行われているが、瞳孔括約筋での報告はない。

2. 研究の目的

細胞外からのCa²⁺流入を担う候補分子としてTRPC3 とTRPC6 に着目し、これらをノックアウトしたマウスを用いて、ビデオ解析と張力測定により、マウスの瞳孔括約筋という微小な平滑筋の持続相にTRPC3 およびTRPC6 の遺伝子欠損が与える影響を詳細に調べることで、その分子実体を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

対光反射による縮瞳解析: 対光反射実験の利点は、貴重なノックアウトマウスを屠殺することのない完全に非侵襲的な測定である。これは角膜が透明であるために可能になる、瞳孔括約筋ならではの観察手法である。我々はマウスに特化した測定装置を自作することにより、30 fps での連続的な記録を実現した。また取得した画像はプログラムでの自動解析によって効率的かつ正確なデータ取得を可能にした。操作としてはまずマウスの頭部および四肢を固定し、暗闇で30分暗順応させた後、LEDの光刺激を用いて対光反射を誘発させた。記録は赤外線から可視光まで記録可能なCMOSカメラに顕微鏡用の対物レンズを直結したものをを用いてLED照射前から記録し、その画像データから暗順応中の瞳孔径、縮瞳後の瞳孔径、収縮の時定数を求め、野生型と遺伝子改変マウスとで比較を行った。

4. 研究成果

マウスは野生型、TRPC3 と TRPC6 のノックアウト、さらに両者のダブルノックアウトを加えた 4 系統を用いての対光反射測定を行い、経時的に瞳孔径を測定した (図 1)。より長時間の測定も行ったが、持続相においてノックアウトによる差は見られなかった。これらの結果を解析し縮瞳開始前の開口径 (散瞳径)、縮瞳径、および収縮の時定数をそれぞれ求め、比較を行った (図 2)。その結果、散瞳径と時定数においてはいずれの系統による比較でも有意な差は得られなかったものの、縮瞳径において TRPC3 のノックアウトが他のすべての系統との比較において有意に小さくなる傾向がみられた ($P < 0.05$)。当初は TRPC ノックアウトによる影響は瞳孔括約筋に及ぶものであると予想していたが、そうであるならば TRPC3 と TRPC6 のダブルノックアウトで野生型と差異がないことの説明がつかない。通常、瞳孔径は瞳孔括約筋と瞳孔散大筋によって調節されているが、このことはおそらく、TRPC3 は瞳孔括約筋というよりはむしろ瞳孔散大筋の方により強く影響しており、ノックアウトの結果、縮瞳の際に拮抗して働く瞳孔散大筋の作用が弱くなることによって縮瞳径が小さくなっているのではないかと考えられる。

ほとんどの平滑筋はその性質上、観察や測定を行うためには手術もしくは摘出する必要があり、非侵襲的に収縮を観察することは不可能である。そのため、力学的な特性はともかくとして、実験によって観察された収縮がどのような生理学的意義を持つのかという点に関しては慎重な考察をしなければならない。唯一、瞳孔括約筋などの眼内平滑筋だけが構造的に非侵襲的な観察を可能とするが、マウスであれば大きさなどを理由とする扱いの難しさから他の平滑筋と比べると知見が極端に少なく、十分な研究が行われているとは言い難い状況である。本研究は他の平滑筋では不可能な完全に非侵襲状態での収縮を測定したものであり、今回の結果はいずれの意味でも貴重な知見となり得るものである。

また、マウスの眼球を摘出し、そこから得られた瞳孔の筋肉を用いてリアルタイム PCR を行ったが、現時点までに有益な結果を得ることはできなかった。この実験は対光反射測定と並行して行ったが、先の結果を考えると瞳孔括約筋と瞳孔散大筋を明確に区別する必要があるかもしれない。しかしながらマウスの瞳孔括約筋や瞳孔散大筋は非常に微小かつ境界が不明瞭な組織であるため、これらを厳密に区別して単離することは難しく、特別な工夫が必要になると考えられる。

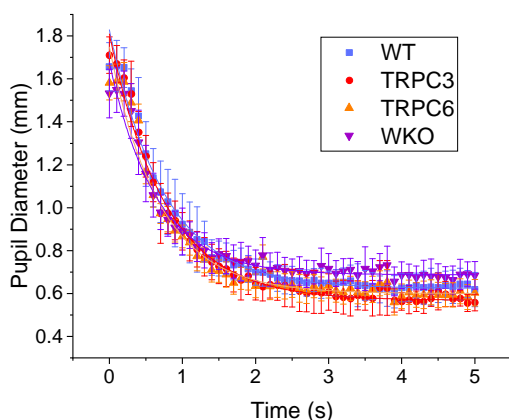


図 1 瞳孔径の経時変化

野生型 (WT)、TRPC3 ノックアウト (TRPC3)、TRPC6 ノックアウト (TRPC6)、ダブルノックアウト (WKO) の 4 系統において縮瞳の経時変化を記録した。いずれの測定も 12 ~ 16 週齢の雄を用いて行った ($n = 11$)。

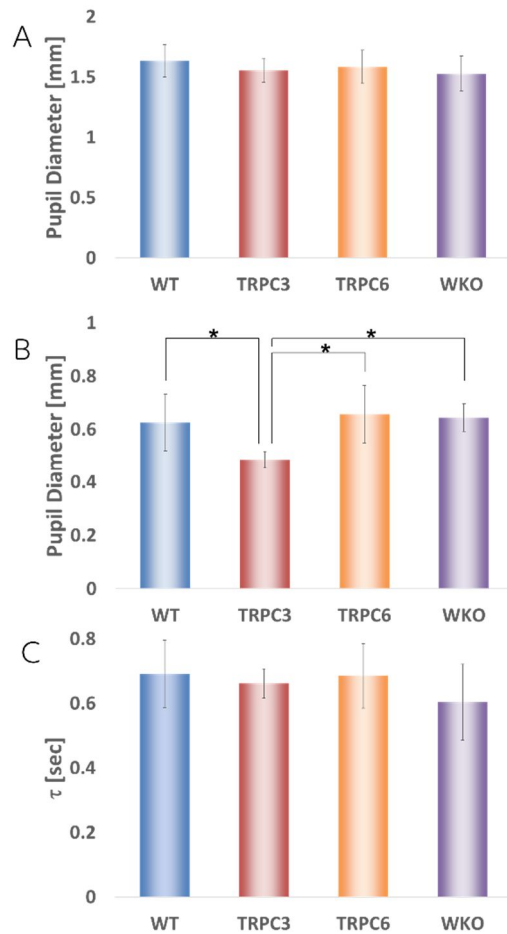


図2 瞳孔径および時定数の比較

A: 暗順応後の最大瞳孔径、B: 光刺激後の縮瞳径、C: 瞳孔収縮の時定数をそれぞれ求め、系統ごとに比較した。いずれの測定も12~16週齢の雄を用いて行った (n = 11、* P < 0.05)。

< 引用文献 >

Takai Y, Sugawara R, Ohinata H & Takai A (2004). Two types of non-selective cation channel opened by muscarinic stimulation with carbachol in bovine ciliary muscle cells. *J Physiol* 559, 899-922.

Sugawara R, Takai Y, Miyazu M, Ohinata H, Yoshida A & Takai A (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

Yasui F, Miyazu M, Yoshida A, Naruse K & Takai A (2008). Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the G(q/11) protein. *Br J Pharmacol* 154, 890-900

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

Toshiyukji Kaneko; Influence of TRPC knockout on mouse pupillary sphincter, 9th FAOPS congress (2019)

金子智之、Influence on light reflex of TRPC knockout on mouse intraocular smooth muscle、第 95 回日本生理学会大会 (2018)

金子智之、マウス眼内平滑筋の TRPC ノックアウトの影響、第 59 回日本平滑筋学会総会 (2017)

[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

なし