

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659682

研究課題名(和文)骨粗鬆症を微小循環から考える

研究課題名(英文) Properties of microcirculation in the periosteum; a novel perspectives on osteoporosis

研究代表者

福田 裕康 (FUKUTA, HIROYASU)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90444984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症に関わる骨代謝異常の背景には、骨組織を流れる血流の不均衡が存在すると推測されるが、骨組織の微小血管の収縮制御機構は明らかでない。

本研究課題では、骨組織の微小循環のモデルとして、モルモット脛骨骨膜の生理機能について検討した。脛骨骨膜細動脈には律動的自発収縮が認められ、ノルアドレナリン作動性の血管収縮神経支配とサブスタンスP陽性神経によるNOを介した抑制神経の支配を受けていた。また、加齢により交感神経性収縮の減弱、内皮細胞依存性のNO放出の増強が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In the background of bone metabolism disorders which caused osteoporosis, it is assumed that disproportions of the blood flow are present in the bone tissue. The objective of this project is to elucidate the physiological properties of the guinea-pig periosteum arterioles entering tibia as a model of the microvasculature supplying bone tissue. Spontaneous rhythmic vasoconstriction was observed in the periosteum arterioles which is rely on Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum and subsequent influx of Ca²⁺ through L-type Ca²⁺ channels. Arteriole contractility is modulated by sympathetic exciting nerves as well as SP-containing primary afferent inhibiting nerves through the NO released from endothelial cells.

In the aged animal, compare with young, it is suggested that the sympathetic contraction is weaker and the release of the endothelium-dependent NO is increased.

研究分野：平滑筋

キーワード：血管平滑筋 微小血管 自発収縮 骨粗鬆症 骨膜

1. 研究開始当初の背景

現在、骨粗鬆症の患者は 1100 万人にも及ぶと推定され、高齢化が進むにつれて患者数はさらに増えると見込まれる。一方、虚血性心疾患などの発症リスクとの関係で注目される代謝性異常症候群(メタボリックシンドローム)も高齢化に伴う患者数の増加が懸念される事象である。近年、骨粗鬆症も、骨代謝異常に起因する疾患であるという視点から、メタボリックシンドロームとの関係も指摘されつつある。

各臓器に分布する動脈、静脈は、臓器に栄養を供給し、代謝産物を運び出しており、その機能が正常であることは臓器の生理的活動の維持に必須である。この臓器循環動態の異常は、細胞の代謝障害を引き起こし、臓器の機能不全を来す。従って、骨代謝異常の背景にも骨組織に分布する血管機能の異常が存在すると考えられる。しかし、骨組織に分布する微小血管についてはそのアプローチの難しさからこれまで生理学的な研究が行われてない。

2. 研究の目的

(1)臓器の代謝需要に応じた血流分配は正常な臓器機能を保つのに必須であり、その機能障害は臓器における虚血性代謝障害を来すと考えられるが、これまで骨組織をめぐる循環動態は十分に理解されておらず、その解明は新たな予防や治療方法開発につながる可能性を有する。

様々な臓器の抵抗血管、微小血管の機能的検討の中で、モルモット脛骨の骨膜に存在する直径 10 μm 以下の血管の収縮弛緩現象の計測に成功し、その血管が神経などからの入力のない状態でも律動的に自発収縮を繰り返しているという特性を発見した。

そこで、本研究課題では、これまで研究対象とされていない骨膜に存在する微小血管の動態に着目し、その収縮制御、神経性反応といった生理的機能について、次の 2 点を段階的に検討する。骨膜微小血管の自発的律動的活動の発生メカニズム、および本血管の神経支配機構の解明。骨粗鬆症に伴う骨膜血管の生理機能変化の解明。

(2)骨粗鬆症の基礎的变化の検討として老年モデル動物を用いて、本症状に伴う骨循環の機能変化を解明し、骨粗鬆症の新たな予防、治療方法の提案を目指す。

3. 研究の方法

(1)3 週齢及び 12 週齢のモルモットの脛骨より骨膜を剥離し、微小血管を含む骨膜組織標本を作成した。標本には 37 の Krebs 溶液で灌流し、血管壁追跡システムを用いて血管径を経時的に測定した。

標本の左右に置いた白金電極間に矩形波電流 (100 μs duration, 10 Hz, 10 s) を流し

(経壁電気刺激)、標本内に分布する末梢神経を刺激して、血管運動の神経支配を調べた。収縮反応の大きさは (% of resting diameter) = (収縮量 (μm)) / (非刺激時の静止時直径 (μm)) \times 100 で表した。薬物は灌流液中に溶解して投与した。データは平均値 \pm 標準誤差で表した。

(2)骨膜組織標本に免疫組織化学染色を施し、微小血管の平滑筋および末梢神経の分布に関する検討を行った。

4. 研究成果

(1)3 週齢のモルモットの骨膜組織標本では一対の並走する微小血管 (外径 10 μm ~ 30 μm) が観察され、平滑筋アクチン (SMA) 染色により輪状に走行する血管平滑筋が観察される血管 (動脈) と非紡錘形の平滑筋細胞が観察される血管 (静脈) (図 1) が識別された。

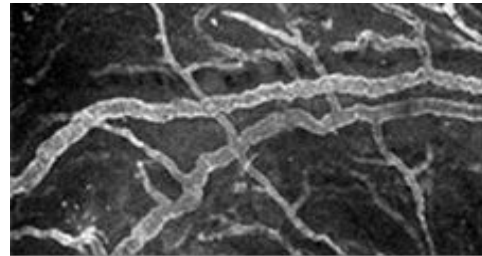


図 1 平滑筋アクチンによる染色

細動脈の約半数においては自発収縮を発生 (図 2) した。

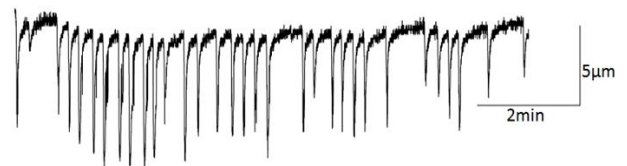


図 2 細動脈の自発収縮

自発収縮の発生機序に細胞内カルシウムイオン制御機構が関与するか検討した。自発収縮は細胞外カルシウム除去、L 型カルシウムチャネルブロッカーであるニフェジピン投与および筋小胞体カルシウム ATP アーゼ阻害薬である CPA 投与により消失した。自発収縮の有無に関わらず経壁神経刺激により収縮を生じ、この収縮はテトロドトキシン投与により消失した。この神経性収縮はブロッカーであるフェントラミンにより消失、サブスタンス P により抑制されたが、一酸化窒素合成阻害薬であるニトロアルギニンにより増強した。外因性ノルアドレナリンによる収縮もフェントラミンにより消失、ニトロアルギニンにより増強したが、ノルアドレナリン投与でおこした収縮はサブスタンス P の追加投与により抑制された。この抑制反応はニトロアルギニンで消失した。

免疫組織化学染色により、微小血管に沿っ

て交感神経マーカーである tyrosin hydroxylase (TH) 陽性神経線維およびサブスタンスP陽性神経線維が観察されたが、NO陽性神経線維は観察されなかった(図3)。

以上の結果より、骨膜微小血管のうち動脈と推定される血管では自発収縮が観察され、この自発収縮はL型カルシウムチャネルを介した細胞外カルシウムと小胞体からのカルシウム放出に依存していると考えられた。またこの血管はノルアドレナリン作動性の血管収縮性神経支配とサブスタンスP陽性神経によるNOを介した抑制性支配を受けていることが示唆された。

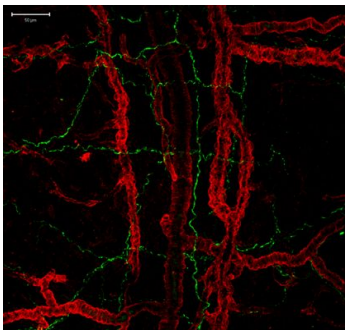
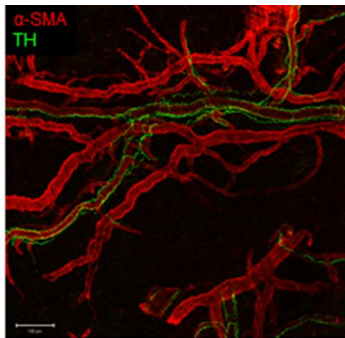


図3 ノルアドレナリン作動性神経(緑色、上図)
サブスタンスP作動性神経(緑色、下図)

(2)12ヶ月齢モルモットの骨膜組織標本においても、平滑筋アクチン陽性の血管平滑筋が輪状に配列する動脈(10 μ m~30 μ m)と非紡錘形の壁細胞が分布する静脈が識別された。動脈においては自発収縮を生じる血管も観察されたが、12ヶ月齢モルモットでは自発収縮の自発パターンが多様であった(図4)。

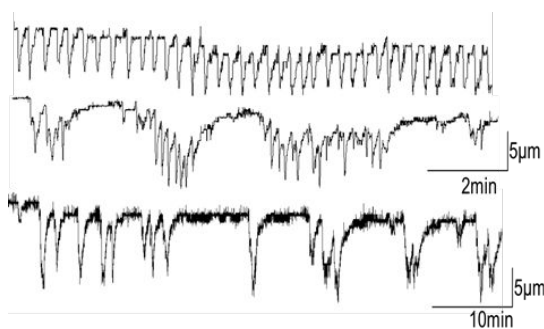


図4 自発収縮の多様性

自発収縮の有無に関わらず経壁神経刺激により収縮を生じたが、神経性収縮の大きさは3週齢に比べて減弱していた(図5)。

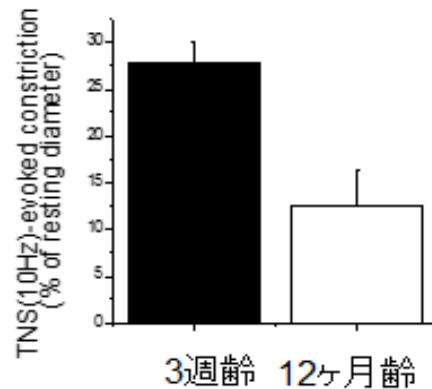


図5 神経性収縮の比較

神経性収縮はフェントラミンにより消失し、ニトロアルギニンにより増強するが、12ヶ月齢モルモットではその増強作用が増大していた(図6)。

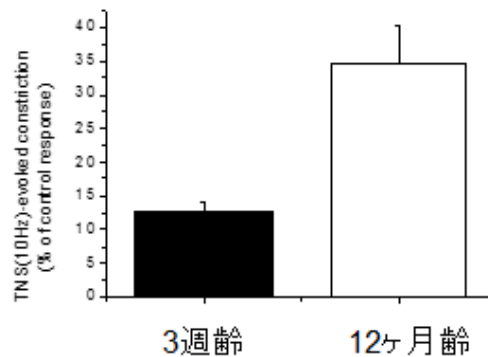


図6 ニトロアルギニンによる神経性収縮の増強

また12ヶ月齢モルモットにおいてはニトロアルギニンを投与するだけで収縮を生じ、更に自発収縮が見られなかった標本にも自発収縮が誘発された。

免疫組織化学染色により、12ヶ月齢モルモットにも微小血管に沿って交感神経マーカーである tyrosin hydroxylase 陽性神経線維およびサブスタンスP陽性神経線維が観察されたが、NO陽性神経線維は観察されなかった。また内皮細胞マーカーであるvWFと内皮型NO合成酵素であるeNOSはいずれも血管内皮層での局在が観察された。

以上の結果から12ヶ月齢モルモット骨膜細動脈において交感神経性収縮が減弱し、NO産生阻害により自発および交感神経性収縮が増強されたことから、加齢による内皮依存性NO放出の増強が示唆された。

骨粗鬆症の原因には骨代謝の異常が指摘されている。一般的に、ある組織の代謝障害を考える場合、その組織に栄養を供給し、組織の代謝産物を運び出す組織の血行の動態

に起因することが多い。本課題では、骨組織の機能維持を骨循環という全く新しい視点からの骨粗鬆症の発症メカニズムの解明を行おうと試みたものである。骨膜に存在する微小血管では現在まで報告されていない自動性を有する血管の循環動態がみられた。これは物質交換を行うには有用であり、その機能と役割の解析は、普遍的に同様の微小循環障害に起因する各種疾患の解明につながると期待される。

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

福田裕康、モルモット脛骨微小血管の加齢による機能形態変化、第58回日本平滑筋学会総会、H26年8月7日～8月8日、新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市)

福田裕康、モルモット脛骨微小血管における収縮特性、第57回日本平滑筋学会総会、H25年8月7日～8月8日、旭川市大雪クリスタルホール(北海道・旭川市)

6．研究組織

(1)研究代表者

福田 裕康 (FUKUTA, Hiroyasu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：90444984