

血圧調整に関わる平滑筋および内皮細胞のカルシウム制御機構

東京大学大学院医学系研究科 細胞分子薬理学分野 教授 飯野 正 光

はじめに

動脈の収縮は、末梢抵抗を制御して血圧のコントロールに中心的役割を果たしている。動脈壁は内膜、中膜、外膜の三層からなり、内膜には内皮細胞、中膜には平滑筋細胞、外膜には結合組織とその中を走る交感神経線維が存在する。血管平滑筋細胞は、交感神経支配を受け、神経伝達物質のノルアドレナリンは、 α 受容体を介して平滑筋細胞内カルシウム濃度を上昇させ、平滑筋の収縮を引き起こす。一方、内皮依存性弛緩因子(EDRF)の発見により(1)、内皮細胞は生理活性物質を産生・放出して、血管トーン調節等に関与していることが明らかにされた。すなわち、血管内皮細胞は、アセチルコリン、ブラジキニン、ATP、ずり応力などの刺激により、内皮由来血管弛緩因子を放出する。この内皮由来血管弛緩因子として、一酸化窒素(NO)が同定されている(2)。内皮細胞にはカルシウム/カルモジュリン依存性のNO合成酵素が存在し、内皮細胞内のカルシウム濃度上昇が、NO合成の引き金となる。アセチルコリン等で内皮細胞を刺激すると、内皮細胞においても、カルシウムオシレーションとカルシウムウエーブが観察される(3)。この際に、NOが産生され、血管平滑筋細胞に拡散して血管の弛緩を引き起こすと考えられている。しかし、細胞間の相互作用については個々の細胞レベルでは解明されていない。

我々は、すでに共焦点レーザー顕微鏡を用いて、組織構築を維持した血管壁における個々の細胞応答を可視化するという新しいカルシウムイメージング法を確立している(4)。共焦点顕微鏡は、焦点深度を浅くした蛍光顕微鏡であり、組織標本を用いても、厚さ数 μm の断層像(たとえば平滑筋層だけ)を観察することができる。さらに、焦点面を上下に動かすことにより、内皮細胞層と平滑筋細胞層を個別に観察できると考えられる。そこで、内皮細胞と平滑筋細胞の相互作用を組織内で解析するため、対物レンズのピエゾドライブを装備した共焦点顕微鏡を用い、焦点面を数 μm 上下させることにより、平滑筋層と内皮層に交互にすばやく焦点を合わせ、それぞれのカルシウム動態を個別にかつ個々の細胞において測定することを試みた。その結果、内皮細胞による血管収縮制御に、平滑筋細胞のカルシウムオシレーション頻度が関与することが明らかになった(5)。

方 法

体重約50 gの雄性ラットの頭部を叩いて失神させ、頸部を切開し脱血致死させた後、尾動脈を取り出した。摘出した尾動脈を、生理的塩溶液(PSS, 表1)中に浸し、注意深く結合組織を取り除き、分岐している細動脈を結紮した。この尾動脈標本に、蛍光カルシウム指示薬(40 μ M Fluo-3AM)を含むPSSを、動脈壁の内腔から灌流した。長方形のガラス毛細管(幅300~400 μ m)を、尾動脈標本(長さ約8 mm)の内腔に挿入し、平らな面を作った(図1 A)。平滑筋細胞の動きを抑制するために、10 μ M サイトカラシンD[®]処理をした(6)。標本を固定した実験槽を倒立顕微鏡(IX 70、オリンパス)のステージ上に固定し、マイクロオームプレートを用いて実験槽内の温度を28~30°Cに保った。

カルシウムイメージングは共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview、オリンパス)を用いて行い、通常256×256ピクセル(120×120 μ m)のイメージを、1フレーム/秒の速さで取り込んだ。この共焦点顕微鏡のZ軸の解像度は、約2.5 μ mであった。さらに、使用した顕微鏡には対物レンズをピエゾドライブで急速に上下させる機能が付加されている。これを用いて平滑筋層と内皮細胞層に交互に焦点を合わせることができた。この間の移動に要する時間は0.2秒であった。カルシウムイメージ解析は、IP Labプログラムを使いパーソナルコンピュータ上で行った。

表1. 実験に使用した生理的塩溶液(PSS)の組成

	(mM)
NaCl	154
KCl	4
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
HEPES*	5
glucose	5.6

*HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid

結 果

1) 平滑筋細胞におけるカルシウムウエーブ

Fluo-3を負荷したラット尾動脈血管組織において、交感神経ネットワークを電気刺激すると、すべての平滑筋細胞が同期して反応するのではなく、個々の平滑筋細胞でばらばらに、細胞内カルシウム濃度の周期的な上昇が観察された(4) (図1 C、下3段)。ま

た、この周期的カルシウム濃度上昇（カルシウムオシレーション）は、空間的にみると、細胞内を20 $\mu\text{m/s}$ 程度の速度で伝播するカルシウムウエーブを形成していた(4)。このカルシウムオシレーション／カルシウムウエーブは、神経を電気刺激した場合だけにみられるものではなく、一定の濃度のノルアドレナリンを投与しても観測された(4)。またノルアドレナリンによる反応は細胞外カルシウムを除去しても観察されたので、細胞内カルシウム放出に依存した反応であることを示している。このように、カルシウムオシレーション／カルシウムウエーブは、細胞内カルシウムストアによる動脈平滑筋細胞の基本的なカルシウム濃度上昇パターンと考えられる。

またカルシウムオシレーションは、図1C下3段のように細胞毎に異なった時相で起こるため、平均化された組織全体のカルシウム濃度変化はオシレーションとしては観測されず、平滑な反応として観測される（図1C最上段参照）。すなわち、新しいカルシウムイメージング法により、組織全体ではカルシウム応答が平滑化されてみえても、個々の細胞でみるとすべての平滑筋細胞は同じように反応していないという事実が明らかになった。

2) 内皮細胞と平滑筋細胞のカルシウム動態の同時可視化

図2は、動脈壁の最内層の内皮細胞から、対物レンズのピエゾドライブによって3 μm 間隔で外側に向かって焦点面を動かして得られた断層像を示している。外膜中にある神経ネットワークは、Fluo-3負荷によっては観察しにくかったが、10 μM 4-Di-2-ASPを短時間（15秒）処理することで観察できた。これから分かるように、焦点面を約6 μm 移動させることで内皮細胞と平滑筋細胞は別々に観測することができた。そこで、図3に示すように、ピエゾドライブで対物レンズを急速に6 μm 上下させて、交互に内皮細胞層と平滑筋細胞層を観測した。

図4に示すように、アセチルコリンを投与すると、内皮細胞でカルシウムオシレーションが観察された。さらに詳しく画像解析を行うと、内皮細胞でもカルシウムウエーブが観測されることが分かった。この時、電気刺激により交感神経を刺激して平滑筋細胞におけるカルシウム動態を観察したところ、個々の細胞でカルシウムオシレーションの頻度が、アセチルコリンを投与しないときに比べると減少していることがわかった(5)。アセチルコリンを取り除くと平滑筋におけるカルシウムオシレーションの頻度は回復した（図4C）。

3) 平滑筋のカルシウムオシレーションに対するNOの関与

以上の結果は、アセチルコリンによって生じた内皮細胞のカルシウムオシレーションが、恐らく内皮由来血管弛緩因子であるNOを介して、血管平滑筋のカルシウムオシレーション頻度を低下させていることを示唆している。アセチルコリンの効果が、実際NOを介しているかを明らかにするために、NO合成阻害薬であるNG-ニトロ-L-アルギニン(L-NA)処理をした影響を調べた。アセチルコリン投与の間、内皮細胞におけるカルシウムオシレーションは、L-NA存在下でも変わりなく検出された。さらに電気刺激により交感神経を刺激した際の平滑筋細胞におけるカルシウム動態を観察してみると、カルシウムオシレーションの頻度の減少は観察されなかった(図5)。別のNO合成阻害薬である100 μ M NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル(L-NAME)でも同様に、平滑筋のカルシウム応答に対するアセチルコリンの効果が消失した。これらの結果から、アセチルコリンによる反応は、主としてNOを介するものと考えられ、NOは平滑筋細胞のカルシウムオシレーション機構を抑制して細胞内カルシウム濃度を低下させていることが示唆された。

この仮説を検証するため、NOドナーであるソディウムニトロプルシッド(SNP)の影響を調べた(7)。NOを介しているなら、平滑筋細胞のカルシウム応答に対してアセチルコリンと同じ効果を示すことが予想される。図6で示すように、電気刺激によって引き起こされた視野全体の平滑筋細胞における細胞内カルシウム濃度の増加は、1 μ MのSNP投与により減少した。個々の平滑筋細胞レベルでは、図6(エリア1~3)に示すように、カルシウムオシレーションの頻度が減少していたが、ピーク値にはあまり影響がなかった(5)。実験槽内にノルアドレナリンを投与した場合にも同様の結果が得られた。以上のことから、SNPの平滑筋に対する作用は、主としてNOを介するものと考えられ、NOはカルシウムオシレーション機構に作用してその頻度を低下させ、結果として細胞内カルシウム濃度を低下させていることが明らかになった。

おわりに

最新のカルシウムイメージング法を駆使して、組織構築を維持した血管壁における個々の細胞応答を可視化することができるようになった。これにより、血管平滑筋細胞では、細胞内ストアからのカルシウム放出により、カルシウムオシレーション/カルシウムウェーブが形成され血管緊張の維持・制御に深く関与していることが明らかにされた。ま

た、内皮細胞から産生される NO は、カルシウムオシレーションの頻度を変えることにより血管の弛緩を引き起こしており、従って、血圧調節にはカルシウムオシレーションの頻度が深く関与することが示唆された。今後は、NO のカルシウムオシレーションに対する作用のメカニズムおよび病態との関係についても研究を進めていきたい。

また、本研究により、共焦点顕微鏡にピエゾドライブを組み合わせたシステムを用いることによって Z 軸方向の情報も得られることが示された。この方法は、血管に限らず他の組織への応用も期待される。今後、測定機器や蛍光指示薬の開発とアイデアを練ることでさらに詳細なイメージングが可能になるであろう。また、将来は生きたままの個体における個々の細胞等におけるカルシウム動態も可視化できるようになるものと期待している。

文 献

- 1) Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. *Nature* 288: 373-376, 1980
- 2) Knowles, R. G. & Moncada, S. *Tr. Biochem. Sci.* 17: 399-402, 1992
- 3) Ying, X., Minamiya, Y., Fu, C. & Bhattacharya, J. *Cir. Res.* 79: 898-908, 1996
- 4) Iino, M., Kasai, H. & Yamazawa, T. *EMBO J.* 13: 5026-5031, 1994
- 5) Kasai, Y., Yamazawa, T., Sakurai, T., Taketani, Y. & Iino, M. *J. Physiol.* 504: 349-357, 1997
- 6) Saito, S., Hori, M., Ozaki, H. & Karaki, H. *J. Sm. Mus. Res.* 32: 51-61, 1996
- 7) Clapp, L. H. & Gurney, A. M. *Pflüg. Arch.* 418: 462-470, 1991

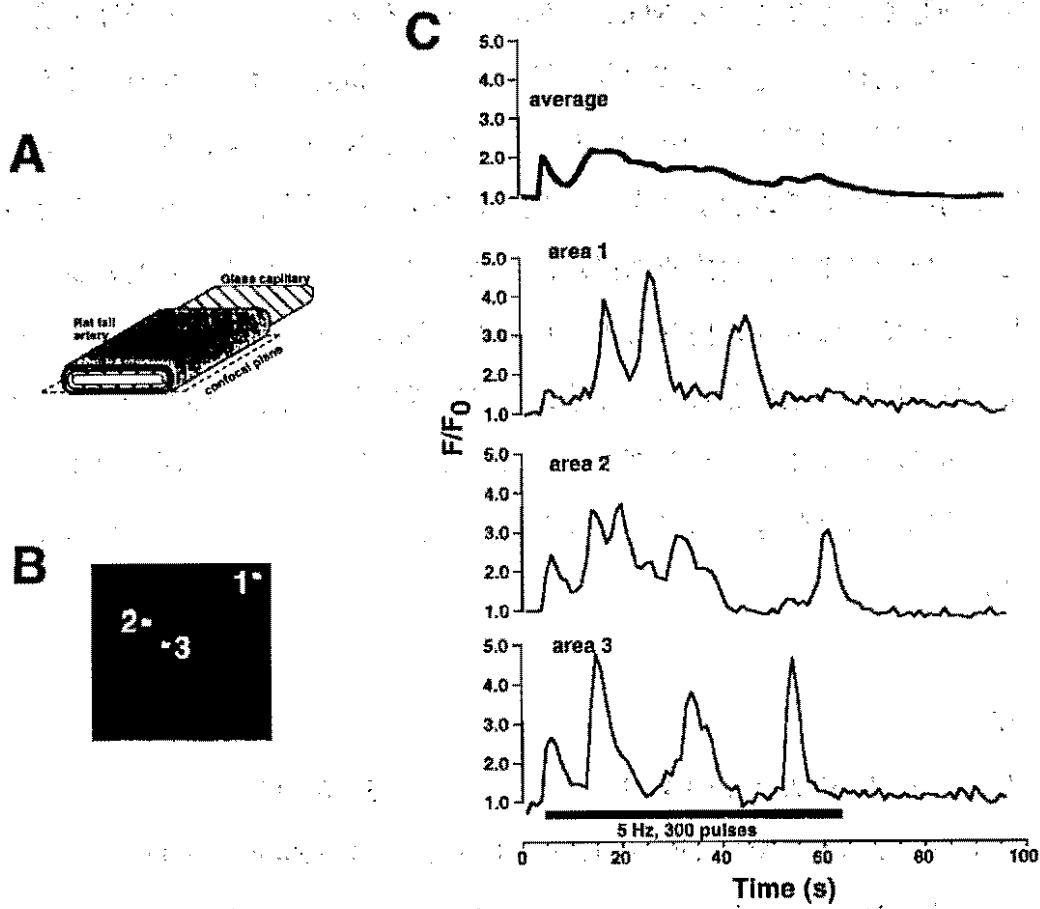


図1 血管壁内単一平滑筋細胞のカルシウム応答

A. ラット尾動脈内壁にガラスキャピラリを挿入して標本を固定した。

B. Fluo-3で染色された平滑筋細胞層。

C. 最上段はBの視野全体のカルシウム濃度変化を平均化した反応。

下3段は、Bの1、2、3で示された小領域におけるカルシウム濃度変化。

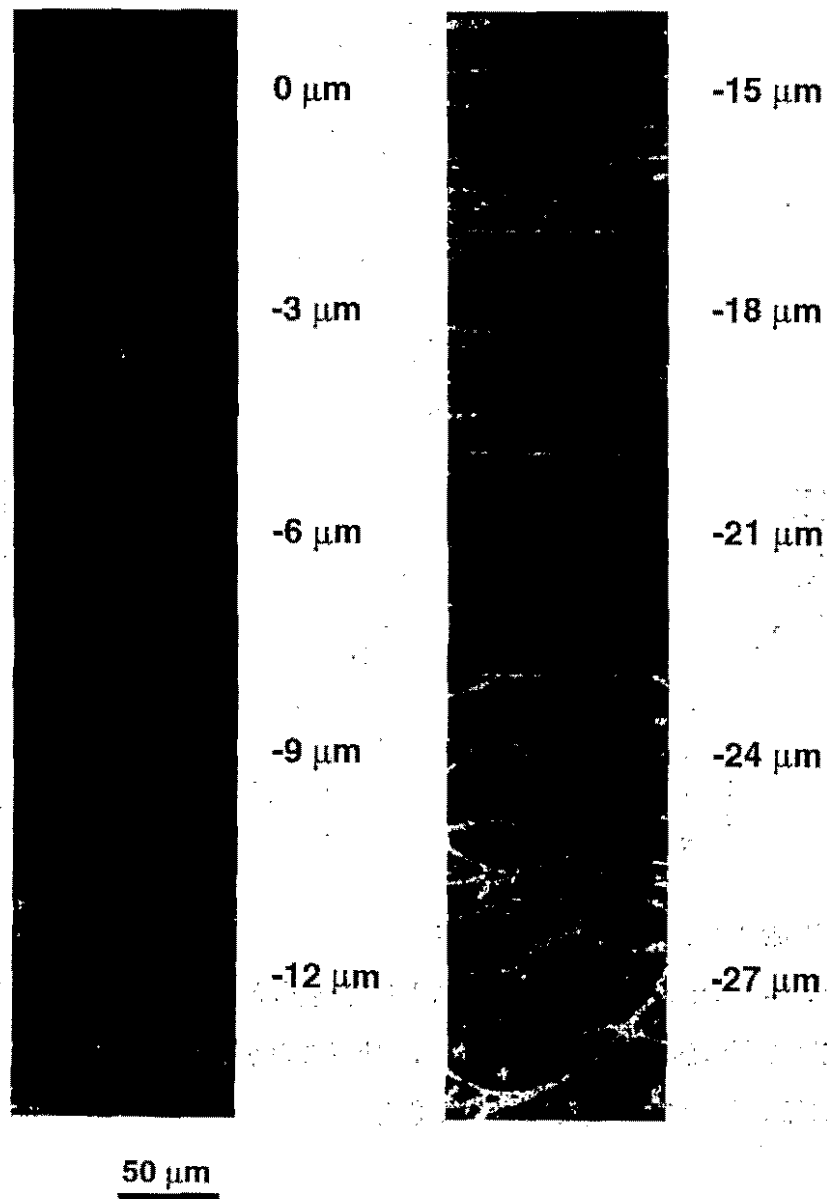


図2 蛍光染色された動脈壁の共焦点顕微鏡による断層像

最内腔にある内皮細胞から3 μm 間隔で得られた中膜および外膜の断層像。内皮細胞の長軸は動脈の血流方向に平行に、そして、中膜平滑筋細胞は血流と垂直に並んでいるのが分かる。内皮細胞と平滑筋細胞はFluo-3で染色し、外膜中にある交感神経ネットワークは4-Di-2-ASPで染色した。

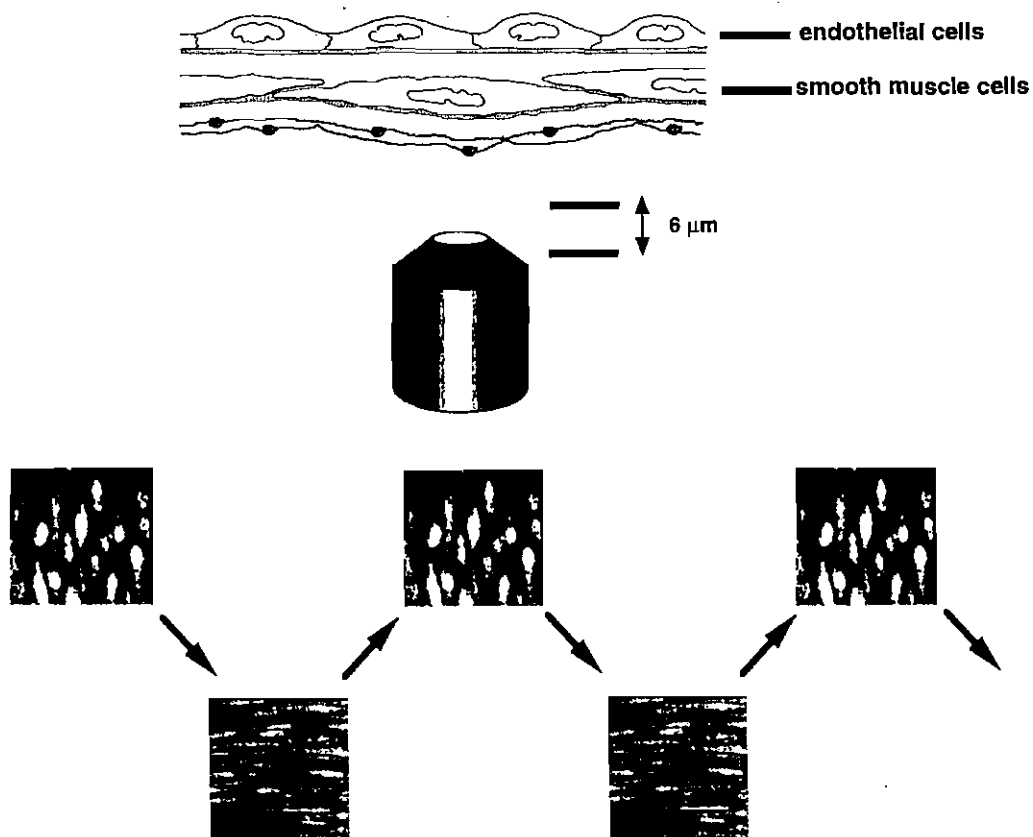


図3 内皮細胞と平滑筋細胞の同時測定。

対物レンズを6 μm 上下させることにより、内皮層と平滑筋層の単独の断層像が得られる。内皮層と平滑筋層のイメージは、1.2秒（このうち、焦点面の移動に要する時間は0.2秒）間隔で交互に取り込むことができた。

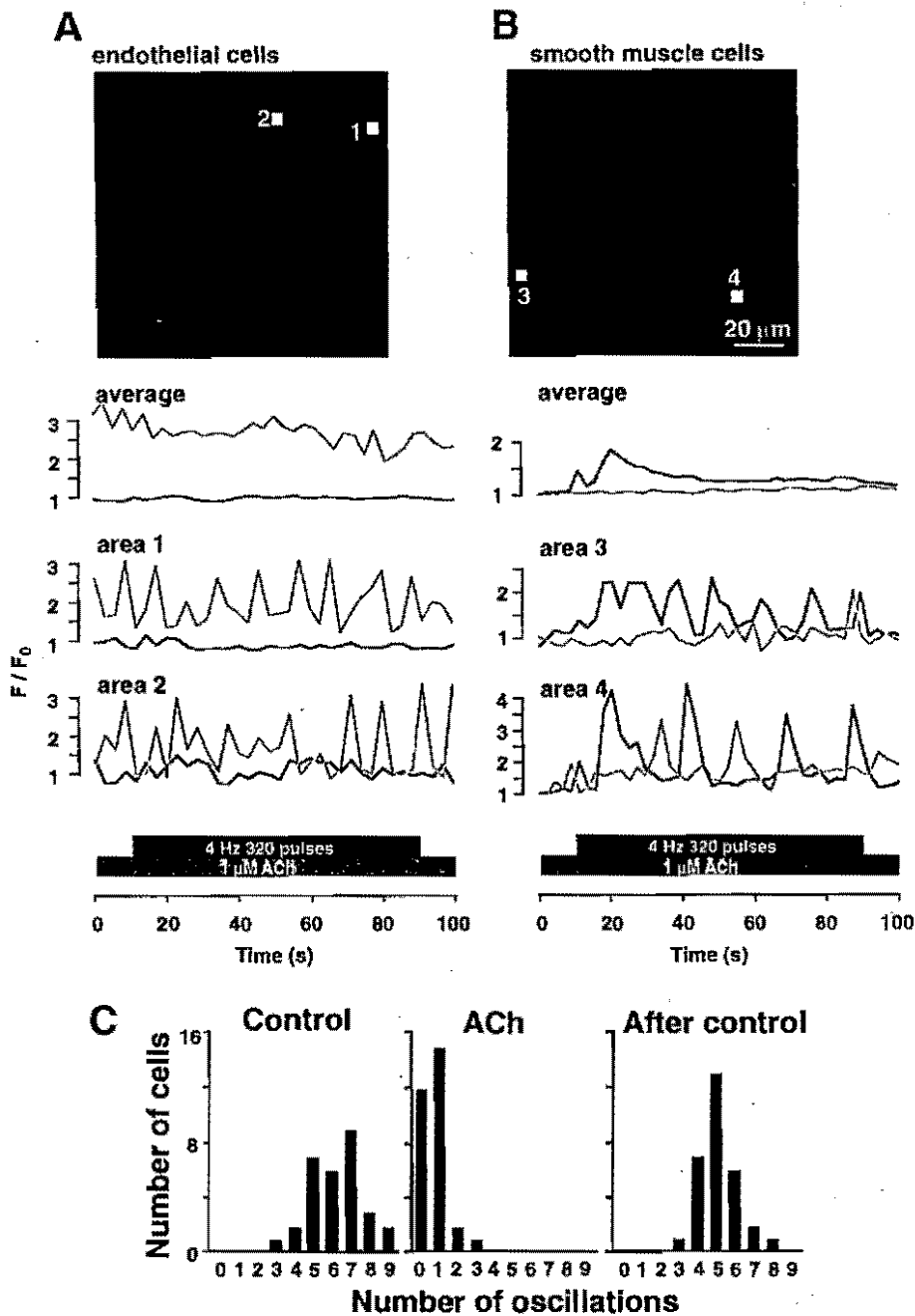


図4 内皮細胞による平滑筋のカルシウムオシレーションの制御

- A. アセチルコリンによる内皮細胞のカルシウムオシレーション（灰色線）。
- B. 内皮細胞でカルシウムオシレーションが起きている時に交感神経を刺激すると、コントロール（黒線）に比べると、オシレーションの頻度が減少しているのが分かる（灰色線）。
- C. 平滑筋細胞におけるカルシウムオシレーションの頻度の解析。アセチルコリンによりオシレーションの頻度が減少している細胞の数が増えているのが分かる（中央）。アセチルコリンを取り除くと回復した（右）。

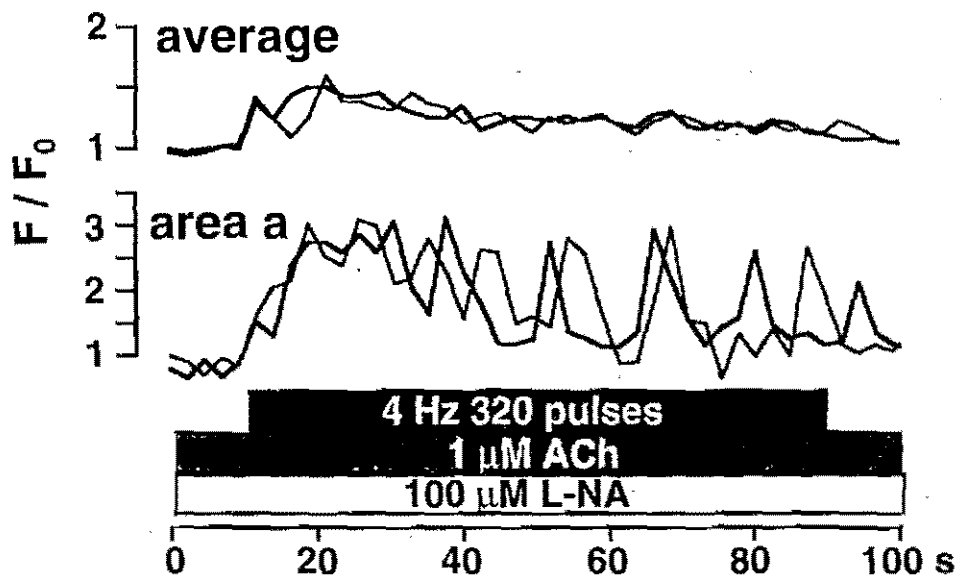


図5 NO合成阻害薬の影響

NO合成阻害薬（100 μ M L-NA）前処理後には、交感神経電気刺激によって生じる平滑筋細胞内カルシウムオシレーションの頻度は、アセチルコリンによって変化しなかった。従って、アセチルコリン投与による平滑筋細胞のカルシウムオシレーション頻度の減少は、NOを介しているものと考えられた。

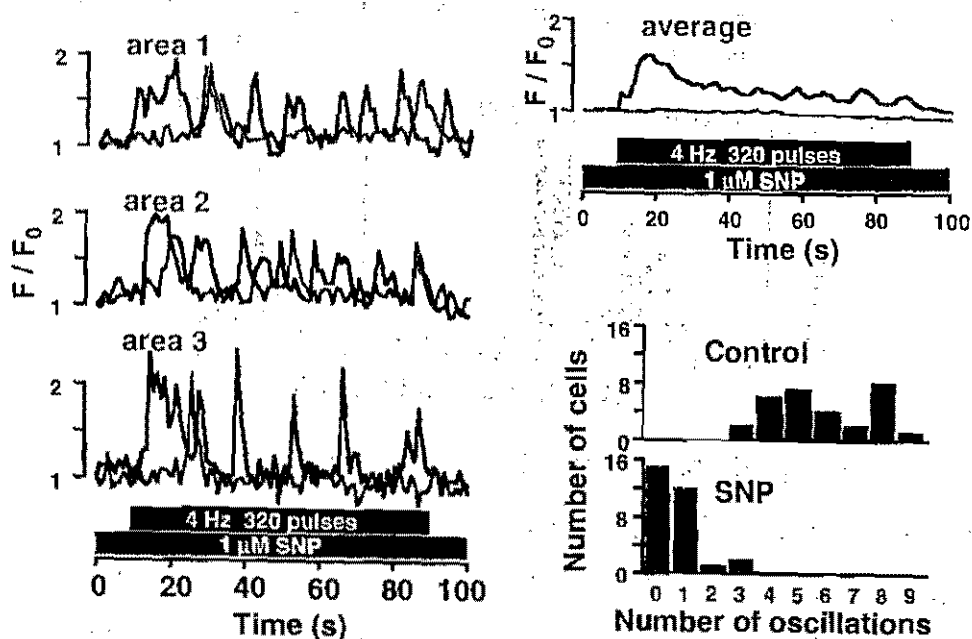


図6 平滑筋細胞のカルシウムオシレーションに対するSNPの作用

電気刺激によって引き起こされた視野全体の細胞内カルシウム濃度の上昇は、NOドナーである1 μ M SNPにより抑制された（右上；灰色のトレース）。微小な領域（エリア；1～3）では、カルシウムオシレーションの頻度が減少しているのが分かる（左）。SNPによりオシレーションの頻度が減少している細胞の数が増えているのが分かる（右下）。