

高速共焦点レーザー顕微鏡を用いた細動脈における 細胞内カルシウム濃度変動の画像解析

齋野朝幸*, 松浦 誠*, 佐藤洋一*

要 旨

細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) は、セカンドメッセンジャーとして細胞内で重要な役割を果たしている。著者らは細動脈の生理機能を研究するため、組織本来の形を維持した細動脈標本(ラット; 精巣, 脳)を用いて血管平滑筋の Ca^{2+} 応答を高速共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) を用いて解析した。noradrenaline 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は一部の血管平滑筋細胞に限られ、しかも一過性であったが、serotonin と ATP は大部分の平滑筋細胞の Ca^{2+} 応答と収縮を引き起こした。また、ATP の反応は精巣と脳の細動脈で異なっており、精巣では ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞外からの流入によるものであったが、脳では細胞内貯蔵場からの放出も関与しており、臓器部位差が大きいことが示唆された。空間的解像度に優れた共焦点レーザー顕微鏡は、 Ca^{2+} 濃度のみならず収縮という形態的な変化も同時に観察できることから、組織内での細胞個々の反応性の解析に非常に有用なツールとなっている。組織標本を用いた細胞内 Ca^{2+} 画像解析法は、これまで実験や観察が難しかった細動脈の生理学や薬理学の研究にも応用が可能であると思われる。

はじめに

Ebashi ら^{1,2)} によって細胞内の Ca^{2+} が骨格筋の収縮に必須であると最初に提唱されて以来、細胞内シグナル物質としての Ca^{2+} の役割を研究する人が一気に増え、骨格筋の収縮のみならず他の酵

素反応も Ca^{2+} により調節されていることが明らかにされた³⁾。今日では、 Ca^{2+} が細胞内シグナル物質として細胞機能の制御に極めて重要な因子であることに疑いを持つ人はいない⁴⁻⁶⁾。

細胞が刺激を受けると、 Ca^{2+} が細胞外から、あるいは小胞体内腔のチャネルを通して細胞質に流入し、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇して細胞の諸活動を惹起する。従って、 $[Ca^{2+}]_i$ の空間的・時間的変動パターンを明らかにすることは、組織・細胞の機能を解析する上で欠くことのできないものとなっている⁷⁻¹²⁾。血管平滑筋における $[Ca^{2+}]_i$ の制御は、血管緊張の保持・調節の基礎をなし、血圧の調節に深く関わっており、この Ca^{2+} 動員制御機構を明らかにすることは、高血圧などの病態生理や治療薬などの薬理作用を考える上でも極めて重要である。けれども、これまでの血管の生理学および薬理学的研究は、ほとんどが太い弾性動脈あるいは筋性動脈で行われてきており、身体の局所の血流調節及び血流に対する末梢抵抗生成に重要な役割を果たしている細動脈の生理機能は十分に調べられてきたとは言い難い。

そこで著者らは、空間的及び時間的解像度に優れた高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて、直径100 μ m以下の細動脈～終末細動脈での各種刺激物質に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度変動について検討した。

方 法

(1) 標本の作製

雄性ウイスター系ラット (250-300g) を炭酸ガス殺処分後、リング液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.25 mM $CaCl_2$) を用いて左心から全身灌流後、精巣と脳から細動脈を分離した。

*岩手医科大学医学部解剖学第二講座

Hepes 緩衝リンゲル液 (HR; 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM CaCl₂, 1.13 mM MgCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 2.0 mM sodium L-glutamate, 5.5 mM glucose, MEM amino acids solution, 0.2% bovine serum albumin, 10 mM Hepes/NaOH (pH 7.4)) に 100 U/ml の純化 collagenase を加え、血管周囲の結合組織を消化した (25°C, 120分)。

(2) Ca²⁺濃度の測定

[Ca²⁺]_i の観察には Ca²⁺感受性蛍光指示薬の Indo-1/AM を用いた。標本を 0.02% Cremophor® EL と 5 μM Indo-1/AM を含む HR に一昼夜滲漬し (4°C), カバーガラスを底面に張った灌流チェンバーに Cell-Tak® を用いて標本を固着した (図 1)。標本周囲を HR で灌流し (室温), その中に noradrenaline (10 μM), serotonin (1 μM), または ATP (10 μM) を添加した。また, 細胞外の Ca²⁺ の影響について検討する際には, 上記 HR から Ca²⁺ を除去し, 1 mM EGTA を添加した。

実験に用いた高速共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) は, 倒立顕微鏡 (TE-300, 水浸対物レンズ 40倍, Nikon) にアルゴンレーザー (励起波長; 351nm) を装着したもので, 最短 1/15 秒の間隔で画像取得が可能となっている。蛍光波

長 440 nm 以上と 440 nm 以下の蛍光画像 (512 × 480 ピクセル) を元に, 各ピクセル毎の蛍光強度の比 (F_{<440}/F_{>440}) を演算し, [Ca²⁺]_i を ratiometry にて算定した。[Ca²⁺]_i が上昇すると F_{>440} は減少するが F_{<440} は上昇し, 蛍光強度比は大きくなる。この ratiometry によって算定された [Ca²⁺]_i は, 蛍光の bleaching や細胞の厚さの変化に起因する蛍光強度の変動による影響を受けず, 筋細胞のように形が変化する細胞においては, 正確な [Ca²⁺]_i を算定する際に, Fluo-3 よりも適していると考えられる。

(3) 使用薬物

以下の試薬を使用した。Indo-1/AM (同仁), L-arterenol (noradrenaline) (Calbiochem), 5-Hydroxytryptamine (serotonin), LaCl₃ · 7H₂O (ナカライテスク), ATP (Kohjin), Cell-Tak® (Becton Dickinson Labware), Collagenase (Elastin Products), Thapsigargin (Alomone Labs)。

結 果

紡錘形の平滑筋細胞が一層～数層, 直径 100 μm 以下の細動脈を輪状に取り巻いていた (図 2)。多くの血管平滑筋細胞では, F_{<440}/F_{>440} が 0.5 付

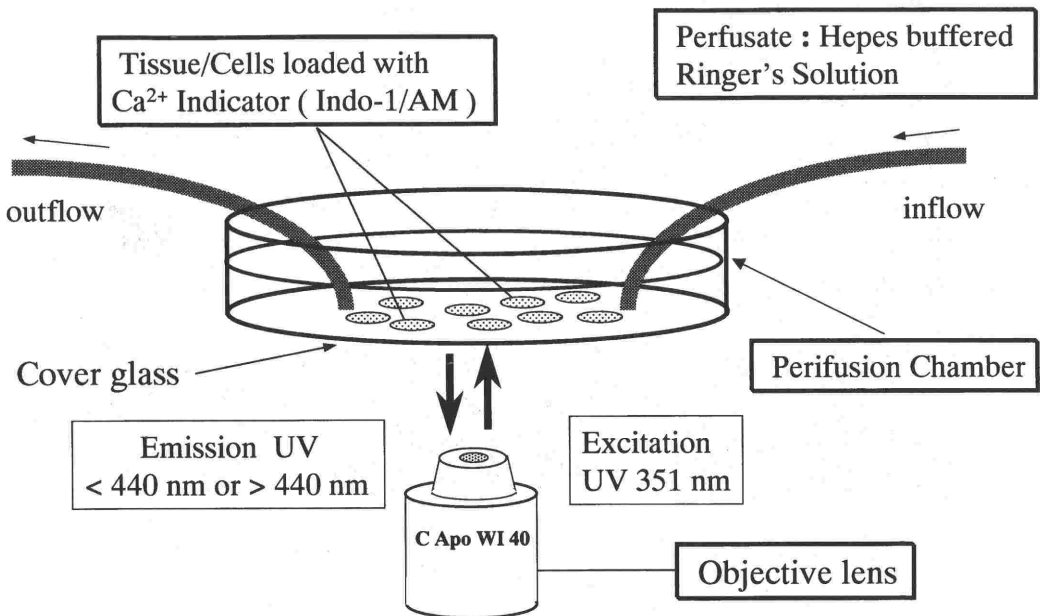


図 1 灌流チェンバー
今回用いた灌流装置の模式図

近と定常的に低く保たれており、これは $[Ca^{2+}]_i$ に換算すると約 30 nM に相当した (data not shown).

精巢の細動脈を noradrenaline (NorAdr) で刺激した細動脈の $[Ca^{2+}]_i$ 変動を図 2 に示す. 灌流液中に NorAdr を加えると、一部の血管平滑筋細胞で F_{<440} の上昇と F_{>440} の減少が認められ、また、血管の収縮も観察された. この Ca²⁺ 応答と収縮は限局性で、しかも持続時間も短いのが特徴的であった (図 2 : 矢印, 図 3 a : 太い矢印). 灌流液

から Ca²⁺ を除去すると、NorAdr に応答する細胞がさらに減り、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と収縮の持続時間も短くなった (図 3 b). 非選択的 Ca²⁺ channel blocker である La³⁺ 存在下では、細胞外 Ca²⁺ 除去時と同様の反応を示した (図 3 c). けれども、完全に NorAdr による Ca²⁺ 応答が抑えられなかったことから $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の一部は細胞内貯蔵場からの Ca²⁺ の放出により起こると思われた. 一方、小胞体 Ca²⁺-ATPase の阻害薬である Thapsigargin (TG) で前処理して細胞内貯蔵場を枯渇させても、

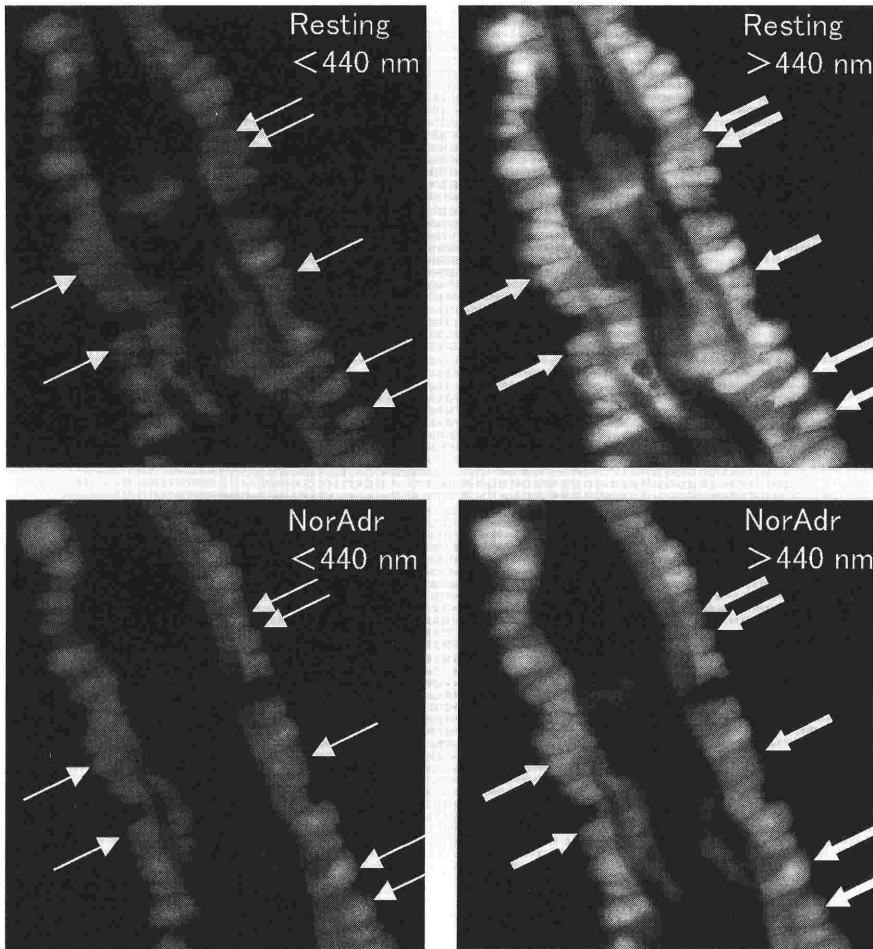


図 2 ラット精巢細動脈の Indo-1 蛍光像

向って左側の列は蛍光短波長側 (<440 nm), 右側が長波長側 (>440 nm) の画像である. 矢印は反応した細胞を示す. 静止時 (上段) で、長波長側 (太い矢印) の蛍光強度は短波長側 (細い矢印) より強くなっており、Ca²⁺濃度を示す短波長蛍光強度/長波長蛍光強度比 (F_{<440}/F_{>440}) は低い値となっている. NorAdr で刺激すると (下段)、短波長側 (細い矢印) の蛍光強度は増加し、長波長側 (太い矢印) の蛍光強度は減少し、比は高い値を示す. 蛍光強度の変化は、限局的であることに注目.

NorAdr によって $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めたことから (図 3 d), Ca^{2+} の細胞外からの流入もかなりのものであることが示された。また, TG 前処理で NorAdr による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が元の定常状態へ戻るまでの時間が遅延した (図 3 d)。

serotonin (5-HT) 刺激では, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と収縮が血管全周性に起こった。また, その反応も NorAdr に比べ持続的であった (図 4 a)。 Ca^{2+} を灌流液より除去することにより, この応答は一部抑えられ (図 4 b), 抑制効果は La^{3+} を加えた際も認められた。けれども, TG 存在下では 5-HT による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が生じた (data not shown)。以上から 5-HT による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には, NorAdr と同様に細胞外からの流入と細胞内貯蔵場からの放出の両方が関与しているとみなされた。

ATP によって引き起こされた精巢の細動脈の $[Ca^{2+}]_i$ の動きは 5-HT と同様に血管全体に認められたが, 収縮はより強く, 持続的であった。ま

た, NorAdr や 5-HT では認められていなかった $[Ca^{2+}]_i$ の律動の変動 (Ca^{2+} -oscillation) が引き起こされた (図 5 a)。この ATP による反応は Ca^{2+} の除去, あるいは La^{3+} の添加によりほぼ完全に抑えられた (図 5 b, c)。TG 存在下でも ATP による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めたが, Ca^{2+} -oscillation は生じなかった (図 5 d)。さらに, $[Ca^{2+}]_i$ が元の定常状態まで戻る時間の遅延が確認された (図 5 d)。これらの結果から ATP による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は, 細胞外からの流入によって起きるものの, 特有な Ca^{2+} -oscillation には TG 感受性の細胞内貯蔵場も関与していると考えられた。

脳の細動脈においても, NorAdr と 5-HT は精巢と同様な反応を示したが (data not shown), ATP に対する Ca^{2+} 応答に差が認められた。灌流液からの Ca^{2+} 除去, あるいは La^{3+} の添加をしてもわずかながら $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めたことから (図 6 b), ATP による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は, 脳では

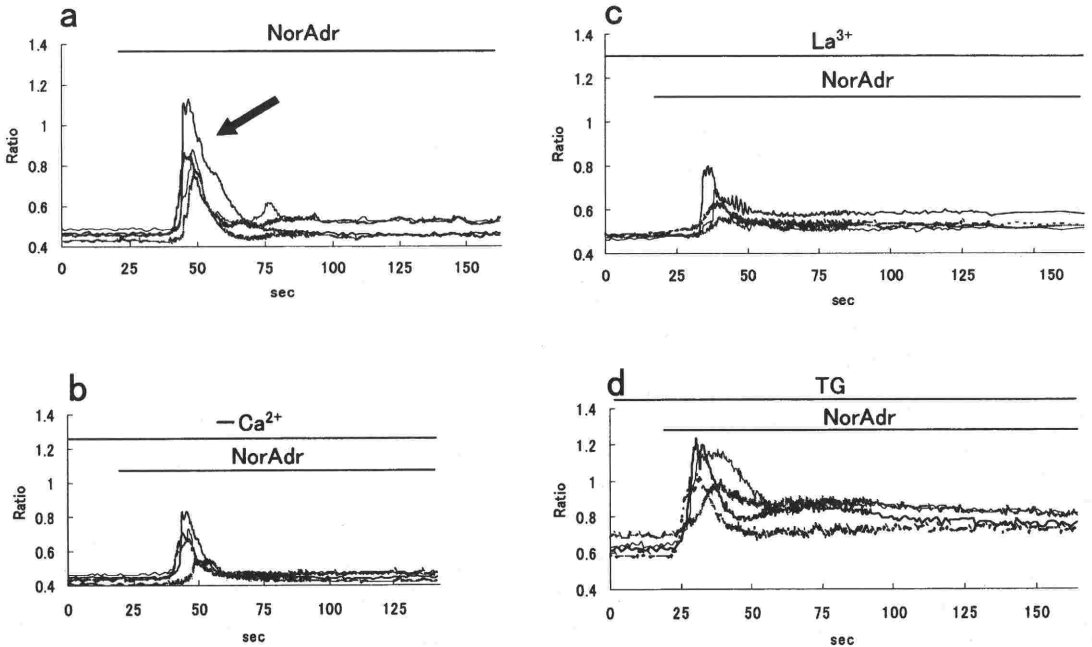


図 3 NorAdr (10 μ M) による $[Ca^{2+}]_i$ の変動

- 平滑筋細胞 ($n=4$; 測定スポットは約 $20 \mu m^2$) の $[Ca^{2+}]_i$ の変動を経時的に表したグラフ。急峻な立ち上がりを示す急峻相 (矢印) が主体をなす。 $[Ca^{2+}]_i$ の律動的な変動 (Ca^{2+} -oscillation) は認められない。
- 細胞外液より Ca^{2+} を除去した場合の経時変化。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められるが, 振幅は減少している。
- 細胞外液に La^{3+} を加えた時の経時変化。 b と同様な変化が認められた。
- 灌流液中に Thapsigargin (TG) を加えた場合の経時変化。 a とほぼ同様な変化が認められた。

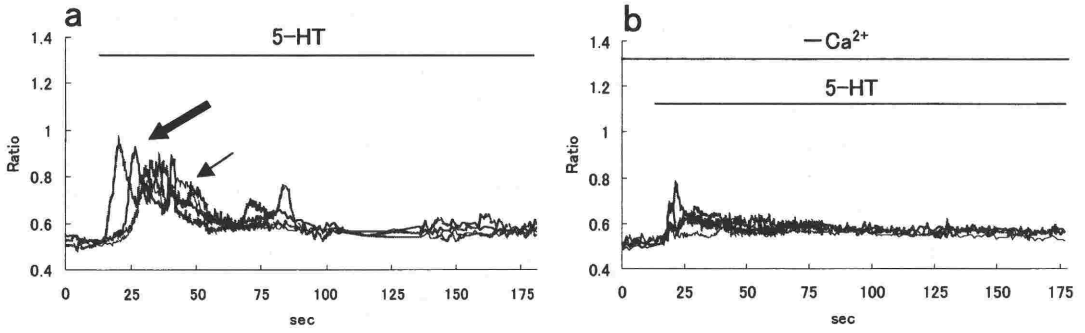


図4 serotonin (1 μM) による $[Ca^{2+}]_i$ の変動

- a. 平滑筋細胞 (n=4 ; 測定スポットは約20 μm²) の $[Ca^{2+}]_i$ の変動を経時的に表したグラフ. 急峻な立ち上がりを示す急峻相 (太い矢印) と比較的高値を示す維持相 (細い矢印) からなる二相性の $[Ca^{2+}]_i$ の変動が認められる. Ca^{2+} -oscillation は認められない.
- b. 細胞外液より Ca^{2+} を除去した場合の経時変化. $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められるが, 振幅は減少している.

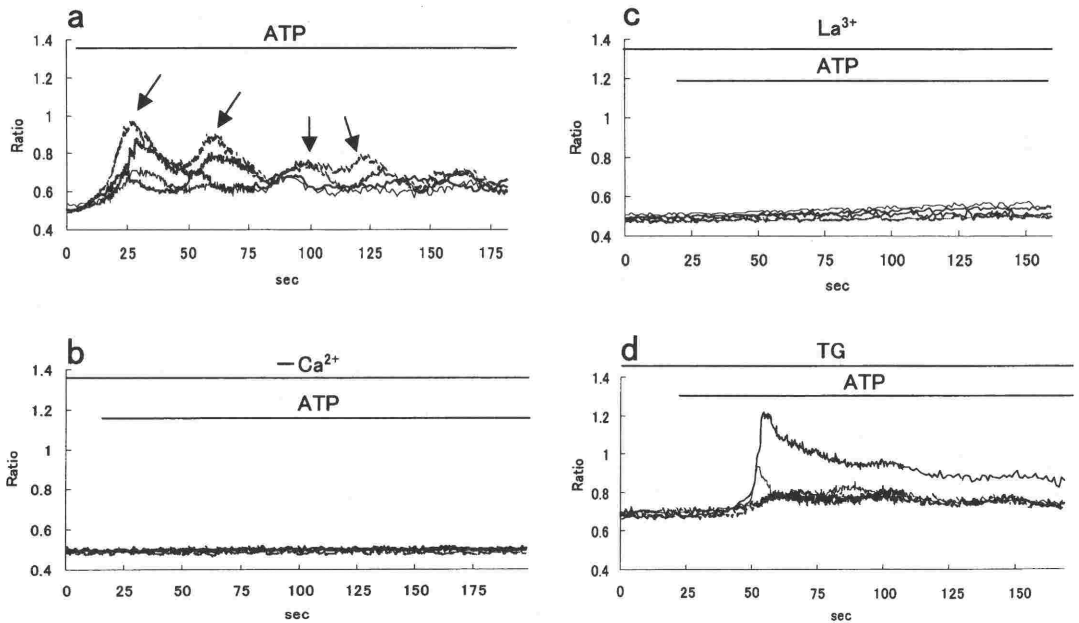


図5 ATP (10 μM) による $[Ca^{2+}]_i$ の変動

- a. 平滑筋細胞 (n=4 ; 測定スポットは約20 μm²) の $[Ca^{2+}]_i$ の変動を経時的に表したグラフ. 律動的な Ca^{2+} 変動 (Ca^{2+} -oscillation) が認められる.
- b. 細胞外液より Ca^{2+} を除去した場合の経時変化. $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められない.
- c. 細胞外液に La^{3+} を加えた場合の経時変化. b と同様に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は生じない.
- d. 灌流液中に TG を加えた場合の経時変化. $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められたものの, Ca^{2+} -oscillation は消失した.

細胞内貯蔵場からの放出も関与していることが示唆された.

考案

本研究では, 高速共焦点レーザー顕微鏡を用い

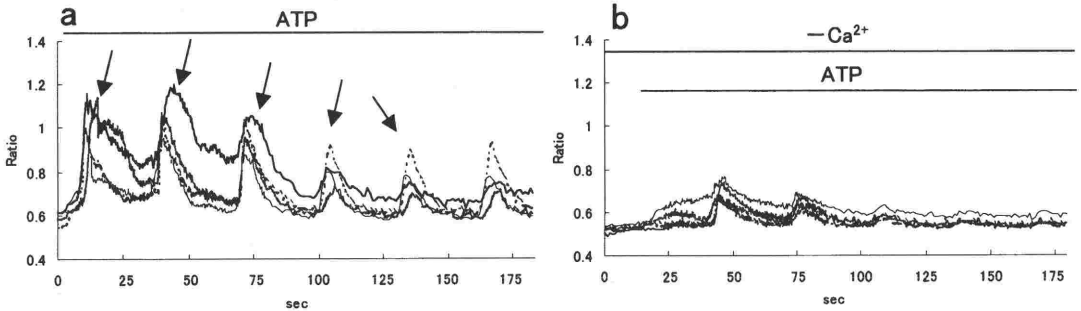


図6 脳の細動脈での ATP (10 μM) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変動

- 平滑筋細胞 (n=4; 測定スポットは約20 μm^2) の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変動を経時的に表したグラフ。精巣の細動脈と同様に Ca^{2+} -oscillation が認められるが、より顕著である。
- 細胞外液より Ca^{2+} を除去した場合の経時変化。振幅は減少しているものの Ca^{2+} -oscillation が認められる。

ることにより、NorAdr、5-HT、及び ATP による細動脈平滑筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇と収縮を明らかにすることができた。その結果、NorAdr は細動脈平滑筋の一部に作用するのに対し、5-HT や ATP はほぼ全ての平滑筋の反応を引き起こすことがわかった。すなわち、細動脈壁を構成する平滑筋組織は均質ではなく、多様性に富むと言える。

NorAdr は交感神経節後線維の末端から遊離される神経伝達物質で、血圧の調節に関与している。血流を調節する際には、血管全周を広範に収縮させる必要性はなく、一部分が収縮すれば充分である。しかも、持続性がないという点は神経性調節の即時性を考えると合目的といえる。一方、近年生体内伝達物質としての意義が強調されてきている ATP は、神経末端から放出されている他に、物理的的刺激や傷害を受けた細胞や血小板からも放出されている¹³⁾。また、生理活性モノアミンの一つである 5-HT は、中枢神経の細胞や腸クロム親和性細胞に加え、血小板にも含まれている。血管損傷を伴う組織傷害時は、組織から漏出した ATP や血小板から放出された 5-HT や ATP が、細動脈の持続的で強い収縮を引き起こし、止血に役立っているものと思われる。持続的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を引き起こした ATP や 5-HT と、一過性の変化しか生じなかった NorAdr の細胞内における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動パターンの相違が、受容体そのものの性質によるものか、あるいは、kinase も含む細胞内情報伝達系の違いによるものか今後の検討が必要であろう。

今回の結果では、精巣と脳の細動脈では ATP による Ca^{2+} 応答機構が異なることが示された。精巣では細胞外からの Ca^{2+} 流入が主であるのに対し、脳では細胞内 Ca^{2+} 貯蔵場からの放出も考えなければいけない。従って、精巣の細動脈では P2X 受容体が主体で、脳の細動脈では P2X 受容体と P2Y 受容体が発現していると思われるが、今後受容体の同定が必要であろう。また、ATP による特有な Ca^{2+} -oscillation には細胞内 Ca^{2+} 貯蔵場が重要な役割を果たしていることが示唆された¹⁴⁾。TG の反応後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇から定常状態への回復の遅延が認められたが、これは Ca^{2+} 消去系における小胞体の重要性を示唆する¹⁵⁾。

今までの研究では暗黙の前提として、全ての平滑筋細胞が一樣に反応すると考えられてきたが¹⁶⁾、どうもそうではないらしい。むしろ今回の実験が示すように、ligand による差と細胞個々の差、更に器官における相違も存在するのが当然である。今後は、各臓器の組織標本を用いて細胞内情報伝達系の多様性を明らかにしていく必要がある。

まとめ

共焦点レーザー顕微鏡を用いて細動脈の Ca^{2+} 応答を検討したところ、細動脈平滑筋細胞の反応が一樣ではないことが示された。ましてや、血管壁を構成する他の細胞（内皮細胞や線維芽細胞など）は全く異なった反応をすると考えられる。今後は生体の組織にできるだけ近い状態で個々の細

胞機能を解析する実験系が必要になってくる。この点、空間的解像度に優れた共焦点レーザー顕微鏡は、 $[Ca^{2+}]_i$ のみならず、収縮といったような形態的な変化もリアルタイムで観察できることから、これまで実験や観察がしにくかった細動脈の生理学および薬理学的な研究に 응용が可能であると思われる。

文 献

- 1) Ebashi S, Endo M : Calcium ion and muscle contraction. *Progr Biophys Mol Biol* 18 : 123-183, 1968
- 2) Ebashi, S : Excitation-contraction coupling. *Ann Rev Physiol* 38 : 293-313, 1976
- 3) Ozawa E, Hosoi K, Ebashi S : Reversible stimulation of muscle phosphorylase b kinase by low concentrations of calcium ions. *J Biochem (Tokyo)* 61 : 531-533, 1967
- 4) Rasmussen H : Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170(956) : 404-412, 1970
- 5) Berridge MJ : Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 361 : 315-325, 1993
- 6) Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. : Calcium-a life and death signal. *Nature* 395 : 645-648, 1998
- 7) Satoh Y, Habara Y, Ono K, et al : Carbamylcholine- and Catecholamine- induced intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts. *Gastroenterology* 108 : 1345-1356, 1995
- 8) Satoh Y, Nishimura T, Saino T, et al : Application of Real-Time Confocal Microscopy for Observation of Living Cells in Tissue Specimens. *Human cell* 11 : 191-198, 1998
- 9) Kimura K, Yamashita H, Satoh Y, et al : Application of Real-Time Confocal Microscopy to Observation of ATP-induced Ca^{2+} -Oscillatory Fluctuation in Intact Corneal Epithelial Cells. *Acta Histochem Cytochem* 32(1) : 59-63, 1999
- 10) Kimura K, Nishimura T, Satoh Y : Effects of ATP and its analogues on $[Ca^{2+}]_i$ dynamics in the rabbit corneal epithelium. *Arch Histol Jpn* 62(2) : 129-138, 1999
- 11) 佐藤洋一 : 共焦点顕微鏡を用いた生細胞のイメージング-特に細胞内カルシウムイオン動態の可視化について-。電子顕微鏡 34(3) : 217-219, 1999
- 12) 西村朋子, 木村 桂 : 種々の生理活性物質に対するウサギ培養水晶体上皮細胞の反応性について-細胞内カルシウムイオン濃度を指標としての検討-。岩手医誌 51(3) : 247-256, 1999
- 13) Enomoto K, Furuya K, Yamagishi S, et al : The increase in the intracellular Ca^{2+} concentration induced by mechanical stimulation is propagated via release of pyrophosphorylated nucleotides in mammary epithelial cells. *Pflügers Arch* 427 : 533-542, 1994
- 14) Miyazaki S : Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium* 12(2-3) : 205-216, 1991
- 15) Wier G : Cytoplasmic Ca^{2+} in mammalian ventricle : dynamic control by cellular process. *Annu Rev Physiol* 52 : 467-485, 1990
- 16) Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, et al : Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 259 : C3-C18, 1990