

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
<p style="text-align: center;">山上 高生</p>	<p>主査 教授 池田 恒彦  副査 教授 宮崎 瑞夫  副査 教授 窪田 隆裕  副査 教授 林 秀行  副査 教授 南 敏明</p>
<p>主論文題名</p> <p>ATP によって惹起された網膜微小血管周皮細胞の容積変化: 周皮細胞による網膜血流の調節  (Effects of ATP on pericyte volume in rat retinal microvessels: regulation of retinal blood flow by pericyte)</p>	
<p>学位論文内容の要旨</p>	
<p>《研究目的》</p> <p>網膜微小血管には、血管平滑筋が存在せず、代わりに血管を取り巻く様に存在している周皮細胞が網膜血流を調節していると考えられている。周皮細胞がアクチン-ミオシン系の収縮蛋白を持っていることが形態学的に確認されている。ATP は周皮細胞のアクチン-ミオシン系の収縮を介して血管内径の調節を行っていると考えられている。さらに ATP は周皮細胞において Cl<sup>-</sup> チャネルを活性化することも報告されている。しかし、ATP の周皮細胞における Cl<sup>-</sup> チャネルの活性化の網膜血管径に対する効果は不明のままである。本研究においては ATP の周皮細胞におけるイオン輸送の活性化と血管内径の減少の関係を、細胞容積変化の測定から明らかにすることである。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>実験に用いた溶液 I の組成 (mM) は、NaCl, 140; KCl, 3; MgCl<sub>2</sub>, 0.8; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; NaHEPES, 10; glucose, 5; mannitol, 15 (pH 7.4, 浸透圧310 mosM) である。また Ca<sup>2+</sup>-free 溶液 (溶液 II) は溶液 I から CaCl<sub>2</sub> を取り除いた。溶液 I、II は 100 % O<sub>2</sub> で通気し飽和した。実験はすべて 37°C で行った。動物は体重 200 - 250g の Long Evans ラット (SLC, 浜松) を用いた。CO<sub>2</sub> ガスをを用い屠殺した後、眼球から摘出した網膜をパパイン処理し、tissue-print 法にてカバースリップに接着し、網膜微小血管標本を得た。そのうえで周皮細胞を含む微小血管の形態変化をビデオ画像として記録した。ビデオ画面上でトレースして周皮細胞の面積 (A) 及び血管内径 (d) を測定した。刺激開始前の値をそれぞれ A<sub>0</sub>, d<sub>0</sub> とし、細胞容積変化 <math>V/V_0 (= (A/A_0)^{3/2})</math>、血管内径変化 (d/d<sub>0</sub>) を計算した。細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は細胞内 Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素 (fura 2) を用いて測定し、蛍光強度比 (F340/F380, 励起波長 340 nm/380 nm, 測定波長 510 nm) として表現した。</p> <p>《結果》</p> <p>ATP (1 mM - 10 μM) 刺激は、濃度依存性に周皮細胞容積の減少と周皮細胞に囲まれた部位での血管内径の減少を引き起こした。一方、周皮細胞の存在しない部位では血管内径の変化は認められなかった。また、Ca<sup>2+</sup>-free 溶液下では、ATP は周皮細胞容積の減少、血管内径の減少を著明に遅くし、Ca<sup>2+</sup> 存在下でイオノマイシン (Ca<sup>2+</sup> イオノフォア) により ATP の効果が再現された。これらの結果は ATP の効果が細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を介したものであることを示している。</p>	

一方、Cl<sup>-</sup> チャンネル阻害剤である NPPB (20 μM)は、単独で、わずかに細胞容積の増加を引き起こした。さらに ATP (100 μM) はこの細胞容積の増加を増強した。しかし、NPPB 存在下では、ATPは血管内径の減少を消失させた。これらの結果は、周皮細胞容積の減少が血管内径の減少に重要であることを示している。

さらに、P<sub>2</sub>受容体阻害剤であるスラミンは、ATPによる周皮細胞の容積減少、及び周皮細胞に隣接した血管内径の減少を完全に阻害した。P<sub>2</sub>受容体の親和性実験から、P<sub>2Y</sub>受容体は、ATP ≧ UTP > ADP、P<sub>2X</sub>受容体は ATP ≧ BzATP > α, β-methyleneATP の反応系列を持つことが明らかとなり、P<sub>2Y<sub>2</sub></sub>受容体と P<sub>2X<sub>7</sub></sub>受容体の関与が示唆された。

#### 《考察》

本研究により、ATPが細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を介して、Cl<sup>-</sup>チャンネルを活性化し、周皮細胞容積の減少を引き起こしていることが示唆された。

一方で、NPPB (Cl<sup>-</sup> チャンネル阻害剤)により細胞容積減少を消失させると血管内径の減少が起これないことも明らかとなった。このことは、周皮細胞におけるアクチン-ミオシン系による収縮よりも細胞容積の減少が、血管内径の減少にとって重要であることを示している。これまで、patch-clamp 法により、ATPが細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を介して、周皮細胞における Cl<sup>-</sup>チャンネルを活性化していることが報告されている。しかし、その生理的意味は不明のままであった。今回の結果は、Cl<sup>-</sup>輸送の活性化に伴う周皮細胞の細胞容積変化が血管内径の調節に重要な役割を果たしていることを示している。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	山上 高生
論文審査担当者		主 査 教授 池 田 恒 彦 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 窪 田 隆 裕 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 南 敏 明	
主論文題名 ATP によって惹起された網膜微小血管周皮細胞の容積変化: 周皮細胞による網膜血流の調節 (Effects of ATP on pericyte volume in rat retinal microvessels: regulation of retinal blood flow by pericyte)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は、ラット網膜微小血管を用いて、ATP 刺激時における周皮細胞による血管内径調節について検討している。周皮細胞にはアクチン-ミオシン系の収縮蛋白が存在し、ATP 刺激は細胞内 <math>Ca^{2+}</math> 濃度上昇を介してアクチン-ミオシン系を活性化することにより血管内径を調節しているとされている。一方で ATP は周皮細胞の <math>Cl^{-}</math> チャンネルを活性化することが報告されているが、その生理的な役割は不明のままである。本研究は ATP が <math>P2</math> 受容体 (<math>P2Y_2</math>、<math>P2X_7</math>) を介して細胞内 <math>Ca^{2+}</math> 濃度を上昇させることを示している。また、この細胞内 <math>Ca^{2+}</math> 濃度の上昇が、周皮細胞においてアクチン-ミオシン系の活性化による細胞収縮を引き起こすことに加え、<math>Cl^{-}</math> チャンネルの活性化が細胞容積減少を介して、隣接した血管内径を減少させることを示している。しかし、NPPB (<math>Cl^{-}</math> チャンネル阻害剤) 存在下では、血管内径は減少しなかった。また NPPB は ATP によるアクチン-ミオシン系を介した細胞収縮は阻害しなかったが、細胞容積の減少は消失させた。これらの結果は、網膜血管内径の減少は周皮細胞のアクチン-ミオシン系の収縮ではなく、細胞容積の減少により引き起こされていることを示している。このように申請者は、周皮細胞において ATP が、活性化した <math>Cl^{-}</math> チャンネルによる網膜微小血管内径の調節に重要な役割を果たしていることを示している。</p> <p>本研究は、網膜血流の調節という視点から見ると、周皮細胞容積が極めて重要な役割を果たしていることを明らかにしており、網膜循環障害をきたす疾患の病体機能の解明に有益な情報を提供している。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 66(1): 00-00, 2007 (in press)</p>			