

Title	ATP : a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina
Author(s)	川村, 肇
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47509
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	かわむら 川村 はじめ 肇
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20717 号
学位授与年月日	平成18年10月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	ATP : a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. (血管周皮細胞を含むラット網膜毛細血管における血管作動性シグナルとしての ATP について)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 不二門 尚 教授 倉智 嘉久

論文内容の要旨

[目的]

糖尿病網膜症等でみられるように網膜組織は虚血に対して非常に脆弱であるが網膜組織内の毛細血管密度は他の組織に比して疎であるため特に効率的な血流供給(血流調節)が要求される。網膜毛細血管は起始部に括約筋を持たず、収縮能を持つ毛細血管周皮細胞が局所的に血流を調節していると我々は考えている。本研究では ATP をグリア細胞から毛細血管へのシグナルの一つとして想定し、ATP が網膜毛細血管に与える影響を観察し、それらに関するレセプターについて検討した。

[方法]

1. パッチクランプ法による検討

ラットから papain を用いて新鮮分離した網膜毛細血管を細胞外液で満たしたチャンバーに固定し perforate patch 法を行い ATP の投与によって誘導されたイオン電流を測定した。

2. YO-PRO-1 イメージング

特定の ATP レセプターの刺激により形成されると報告されている膜貫通孔の検証のため蛍光染色試料であり核酸に結合する YO-PRO-1 (629 Da) を用いて ATP レセプター刺激時の細胞内への取り込みを観察した。

3. カルシウムイメージング

1 μ M の fura-2AM を血管周皮細胞に取り込ませた上で fluorescence 蛍光を測定することによって細胞内のカルシウム動態を観察した。

4. 低速度撮影

血管周皮細胞の収縮緊張の変化を8秒間隔の低速度撮影で観察した。また周皮細胞の収縮によって変化する血管管腔径を測定した。

[成績]

1 mM の ATP を網膜毛細血管に暴露すると定常電流において内向きのイオン電流が増大した上に一過性の内向き

電流であるカルシウム依存性クロライドチャンネル ($C1_{ca}$ 電流) も誘導された。その後、容量性電流の減少に従って内向き電流、外向き電流共に減少し、さらには細胞間の電氣的伝達も抑制した。ATP の暴露中、細胞の膜静止電位は有意に脱分極 (7 ± 3 mV) した。この ATP の作用は可逆的であった。次にこれらの ATP の作用がどのレセプターの活性化によって生じたものであるかを特定するために ATP レセプターのサブタイプである $P2X_1$ と $P2X_7$ に親和性が高い benzoylbenzoyl-ATP (BzATP) を投与したところ同濃度の ATP に比して 2.5 倍の内向き電流の増加を認めた。一方 $P2X_1$ のアゴニストとされる α, β -methylene-ATP では電流は誘導されず、 $P2X_7$ レセプターのアンタゴニストである oxidized-ATP は Bz-ATP による誘導電流を抑制した。このことから ATP による内向き電流の誘導に $P2X_7$ レセプターが強く関与していることが示唆された。更に低カルシウム、低マグネシウムの細胞外液中では $P2X_7$ による作用が増強することから 2 価の陽イオンが $P2X_7$ の作用を抑制していることが示された。

YO-PRO-1 imaging では BzATP による持続的なレセプターの活性化が最大 900 Da の分子を透過するとされる膜貫通孔を毛細血管細胞に形成することを示した。

カルシウムイメージングでは $P2X_7$ レセプター刺激時には細胞外液からのカルシウムイオンの流入がみられたことに対して UTP による $P2Y$ レセプター刺激時には細胞内のカルシウム貯蔵からの放出がみられた。ATP 及び UTP 投与時に生じる一過性の内向き電流 ($C1_{ca}$ 電流) は BzATP 投与時には見られなかった。このことにより $C1_{ca}$ 電流は $P2Y$ レセプター刺激による細胞内に貯蔵されたカルシウムの放出によるものであることが示唆された。

細胞の低速度撮影では $P2X_7$ 投与時に毛細血管周皮細胞が収縮し、カルシウムキレーターである BAPTA-AM によって収縮は阻害された。また BzATP のみならず ATP 及び UTP によっても細胞の収縮が観察され、毛細血管の管腔径も有意に減少した。

[総括]

本研究により網膜毛細血管細胞に ATP レセプターのサブタイプの一つである $P2X_7$ の存在が明らかになった。 $P2X_7$ の刺激によって毛細血管周皮細胞にカルシウムの流入や細胞の収縮が生じた。また ATP は UTP binding receptor を介しても細胞内カルシウム貯蔵の放出、ひいては周皮細胞の収縮を来した。以上のことから網膜毛細血管では ATP が血管作動性シグナルとして血流の調節に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

網膜組織は虚血に対して脆弱であるにもかかわらず網膜毛細血管の分布は疎であるため効率的な血流供給が要求される。筆者らは網膜毛細血管が括約筋を持たず、網膜血管柵も存在することから毛細循環が局所的に調整されていると考え網膜毛細血管に作用する細胞外シグナルについて検討した。筆者はアデノシン三リン酸 (ATP) に注目し、毛細血管周皮細胞に対するパッチクランプ法による検討から ATP レセプターの一つである $P2X_7$ が網膜毛細血管に存在し多量の内向き電流を誘導することを示した。また持続的な $P2X_7$ 刺激により形成シアポトーシスを誘導すると報告される膜貫通孔が周皮細胞にも形成されることが示された。それに加えて ATP は $P2Y$ レセプターにも作用しカルシウム依存性クロライドチャンネルを活性化し一過性内向き電流を発生させるとともに、細胞内の貯蔵カルシウムを放出することが fura-2 を用いたカルシウムイメージで示された。さらに低速度撮影によって毛細血管の収縮を視的に観察した。

本研究で示された結果により、ATP が網膜毛細循環の調節に関与している可能性が示唆されたことに加え、糖尿病網膜症の初期からの毛細血管周皮細胞の脱落にはじまり血管新生からの血漿成分の漏出による更なる病態の悪化までに何らかの関わりを持つ可能性が示された。これは病態のメカニズムの解明に貢献するものと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。