

分化型血管平滑筋の収縮 ライブイメージング解析

共焦点スキャナユニットCSUシリーズ

はじめに

血管平滑筋は血管壁を構成する主要細胞です。近年、脳卒中・心筋梗塞をはじめとする「血管病」の発症は様々なリスク因子が関係することが知られていますが、中でも高血圧はこれらの基礎疾患として注目を浴びています。高血圧は血管平滑筋の異常収縮により引き起こされます。したがって、平滑筋の収縮メカニズムを詳細に解析する必要があります。

これまで、平滑筋細胞を通常の培養液で維持すると脱分化を引き起こし、収縮しない増殖型平滑筋へと変換することが知られていました(図1)。そこで、ラット大動脈平滑筋を特殊な培養条件で培養し、分化形質を維持した収縮型平滑筋細胞を単離培養した後、時々刻々と変化する収縮ダイナミックスを高速・高解像度でライブイメージングすることが出来る評価法を開発しました。

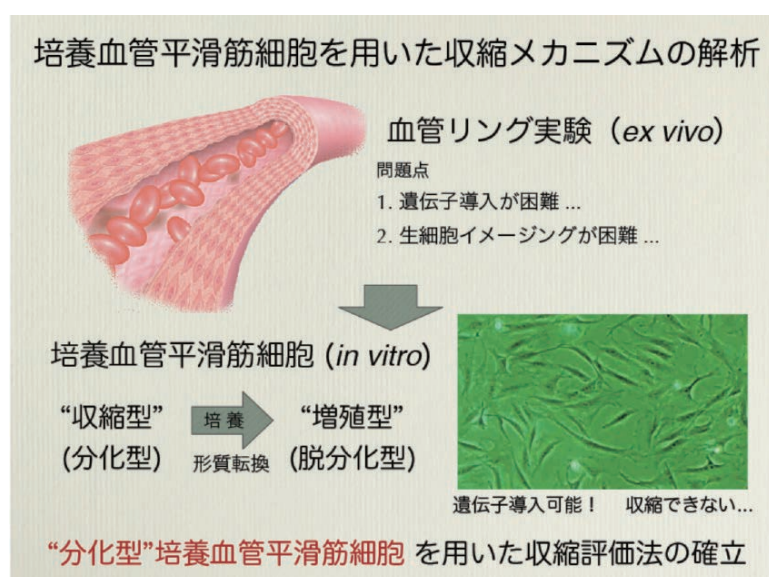


図1 分化型血管平滑筋を用いた収縮評価法の確立

データご提供：金沢大学大学院医学系研究科 血管分子生理 吉岡 和晃先生、多久和 陽先生

参考文献：Wang, Y. et al., Biochem J 394:581-592, 2006, Yoshioka, K. et al., Mol Pharmacol 71:912-920, 2007
Azam, M.A. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 320: 907-916, 2007,
Takuwa, Y., et al., Biomed. Res. 16: 12-21, 2005

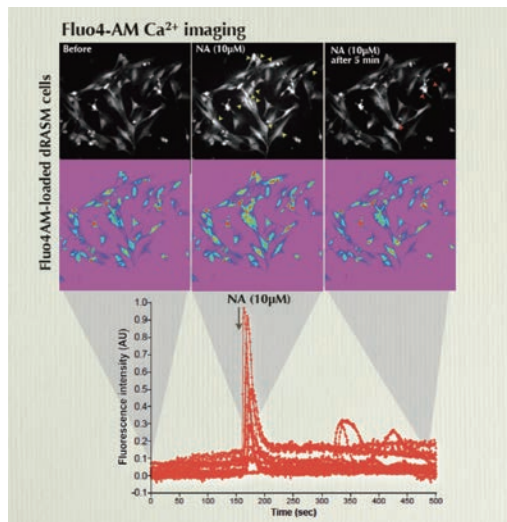


図2 分化型血管平滑筋の Ca^{2+} イメージング

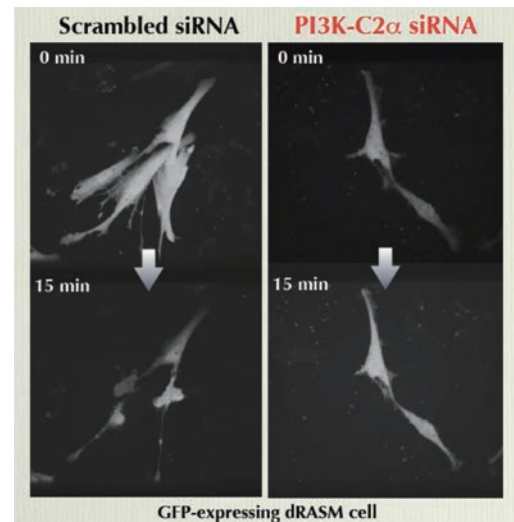


図3 分化型血管平滑筋の収縮イメージング

実験手順

- ① ラット大動脈の血管平滑筋細胞を酵素(エラスターゼ+コラゲナーゼ)法により単離
- ② ラミニンでコーティングした35mmガラスボトムディッシュ上でインシュリン様成長因子(IGF-I)を含む無血清DMEM培地中で3日間培養
- ③ GFP発現ベクター (pEGFP-C1) 及びsiRNA をLipofectamine2000により遺伝子導入、もしくは蛍光カルウム指示薬Fluo-4AMをロード(条件:10 μM 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、10min)
- ④ GFP遺伝子導入2日後、又はFluo4-AMロード後、共焦点スキャナユニットCSU10でライブ画像取得
 - ・レーザー: ArKr (488nm)
 - ・カメラ: iXon EM-CCD (Andor社製)
 - ・顕微鏡: オリンパスIX70
 - ・対物レンズ: 40X UPlan Apo/NA1.00 Oil
 - ・その他: 35mmガラスボトムディッシュ用ステージヒーター、ステージ培養チャンバー (TOKAI-Hit)

結果と考察

本システムを用いて単一の分化型血管平滑筋細胞の収縮を、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と同時に高解像度にイメージングすることが可能になりました(図2)。RNA干渉法(RNAi)により特定遺伝子発現を特異的に抑制することができ、収縮メカニズムの解明に有益な情報を得ることが可能になりました。これにより、クラスII型PI3キナーゼC2 α が平滑筋収縮に必須な制御因子であることが新たに同定されました(図3)。

まとめ

本イメージング手法を用い、生きた細胞の形態を長時間正確に、かつ低侵襲的にイメージングすることができま。これまで困難であった分化型平滑筋の収縮イメージングとRNA干渉法を組み合わせた本解析法により、新たな収縮制御因子の同定及びその制御メカニズムの解析が可能となりました。

横河電機株式会社

〒180-8750 東京都武蔵野市中町 2-9-32

E-mail : CSU@CSV.yokogawa.co.jp

URL : <https://www.yokogawa.co.jp/solutions/products-and-services/life-science/spinning-disk-confocal/>



記載内容は、お断りなく変更することがありますのでご了承ください。

本文中に使用されている会社名、団体名、商品名およびロゴ等は、各社または各団体の登録商標または商標です。

All Rights Reserved. Copyright © 2009, Yokogawa Electric Corporation.

[Ed:03d]