

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390198

研究課題名(和文) ICCペースメーカー活動におけるシグナル連携・統合の研究

研究課題名(英文) Investigation of signal correlation and integration in ICC pacemaking

研究代表者

中山 晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30192230

研究成果の概要(和文)：①分子基盤の研究のため、c-KIT 蛍光抗体をマーカーとしてフローサイトメトリーを用いてマウス ICC を濃縮採取する技術を確立した。採取した ICC には、Ca 活性化 Cl チャネル(Ano1)や細胞内 Ca ストアーでの Ca センサーとして働く STIM 等が発現することを RT-PCR により確認した。②次に低インピーダンス仕様の微小電極アレイを用いることにより、1mm²の微小な空間で ICC ネットワークのペースメーカー電位伝搬の特性を調べることにより成功した。また、セロトニン(5-HT)が ICC の電気活動を増強し、さらにその基礎メカニズムである Ca オシレーションも活性化することも明らかにした。③さらに、動物個体での実験では、野生型マウスに比較し、5-HT 輸送体欠損マウスでは、5-HT 関連薬物の経口投与により、行動パターンが長期間大きく影響されることも見出した。

研究成果の概要(英文)：① First, for investigation of molecular basis, we established procedures to collect ICC from the murine gut by using a flow cytometry with fluorescent antibodies to c-KIT receptors. In collected ICC, RT-PCR detected expression of several important genetic products for Ca oscillations, such as Ca-activated Cl channels (Ano1) and STIM, which acts as a Ca sensor in intracellular Ca stores. ② Next, using arrayed microelectrodes with low impedance, we successfully characterized spatial properties of the propagation of ICC pacemaker potentials in a small area of 1mm². Also, we observed that serotonin (5-HT) potentiated both electric and Ca activities in ICC. ③ Furthermore, in experiments of individual animals, oral administrations of 5-HT-related drugs altered behavioral patterns of mice lacking 5-HT transporters for a long time (more than a week), compared to wild-type mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：高ストレス社会、超高齢化、Cajal細胞、消化管

1. 研究開始当初の背景

現在の日本は有史以来未曾有の高齢化速度で社会構造が変わろうとしている。統計予測

によると、2050年には高齢者は全人口の30-40%に達すると考えられている。また一方、過度の競争など高度のストレスが原因と推測されるが、うつ病患者の増加により平成10年

度以降の日本の年間自殺者は連続して3万人を越える状況であり、その遺児も1万人に達する。このように超高齢化と過度のストレスは相乗効果となり日本社会から活力を奪おうとしている。

消化管は、上記2つの問題へ同時に対処できるユニークな作用点である。筋層間神経叢をネットワーク状に取り囲むCajalの間質細胞(Interstitial cells of Cajal: ICC)が、消化管ペースメーカーとして働くことが、近年、明らかとなってきた。また消化管活動は、このペースメーカー組織を含む組織全体が連動して働くことにより、はじめてその機能を十分に発揮できる。

2. 研究の目的

消化管の新しい機能細胞として見つかったICCの細胞内・細胞間のシグナル連携と統合メカニズムを調べ、この社会状況への医学的対処を考察する。また、シグナル連携・統合を解明するための新しい技術ツールを開発する。

3. 研究の方法

実験動物

野生型マウス(C57/B6J)及び、ICC数が減少しネットワーク障害される W/W^u マウス、セロトニン再取り込みが減弱するセロトニン輸送体ノックアウト(SERT $^{-/-}$)マウス、炎症性腸疾患モデルのIL-10ノックアウト($^{-/-}$)マウスを使用した。(SERT $^{-/-}$)マウスは、東北大学・精神生物学講座より供与され、IL-10($^{-/-}$)は、名古屋大学免疫学講座から供与された。動物実験は、施設に実験内容を登録し、動物は国際倫理基準に基づいて扱われた。

分子基盤

マウス消化管(主に小腸)の筋層を剥離し、コラゲナーゼ等の消化酵素を用いて細胞を単離した。フィルター処理をした後、蛍光色素PEを結合したc-KIT抗体(ACK2)によりICCを標識し、フローサイトメトリー(ARIA2, BD)を用いて濃縮・採取した。採取したICCのmRNAを抽出しRT処理した後、PCRによってペースメーカー関連遺伝子産物の発現を調べた。

組織学的検証

消化管筋層内のICCネットワークと筋層間神経叢の分布を蛍光色素で染色し、レーザー顕微鏡で画像観察を行った。

細胞内Ca計測

消化管筋層(ICC及び筋層間神経叢含有)をCa感受性蛍光色素Fluo-3/4(AM)で染色し、傾向顕微鏡下で蛍光画像を連続的に取得した。ICCのCa活動のみを計測するときには、DHP

感受性Ca拮抗薬とTTXにより、平滑筋と申請細胞の活動を抑制した。

微小電極アレイ

微細な白金黒粒子を固着し表面性を100-200倍に拡大した低インピーダンスの微小電極アレイ(Alpha Med Scientific)を用いて、1mm²の微小範囲の細胞外電位を64点(8x8)同時記録を行った。パワースペクトル、自己相関、相互相関関数などを用いて、ICCペースメーカー電位の周期や連携を解析した。

行動解析

高架プラスメイズにおけるマウスの行動をUSBカメラで録画し、オープンアーム領域に滞在する時間を解析した。

4. 研究成果

①ICC機能の分子基盤

消化管ペースメーカーとして働くICCは受容体型チロシンキナーゼc-KIT(CD117)を細胞表面に多量に発現する。そこで、消化管筋層標本を単離し、ICCをc-KIT蛍光抗体で標識し、フローサイトメトリーを用いて濃縮採取した。図1はその採取状況を示す。申請者達が本研究で行った手技では、P4, P5に相当する細胞は、それぞれ全細胞(イベント)の約1.5%及び0.7%程度であった。20分間程度の採取で約5万、約2万細胞を取得した。

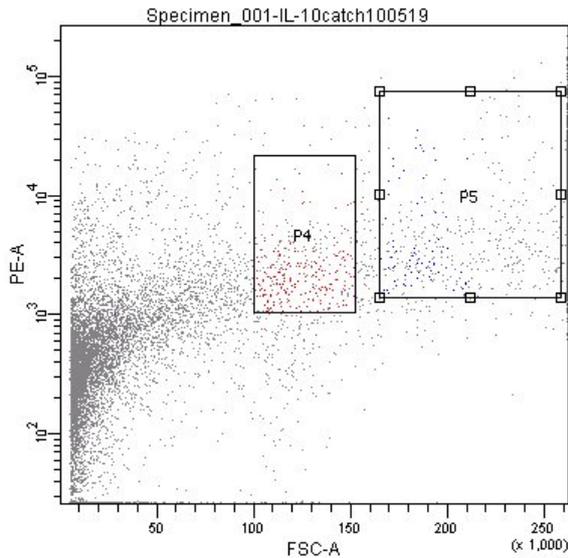


図1：フローサイトメトリーによる ICC 採取状況 X,Y 軸はそれぞれ PE と FSC 強度を示す。P4, P5 領域の細胞を ICC として採取した。

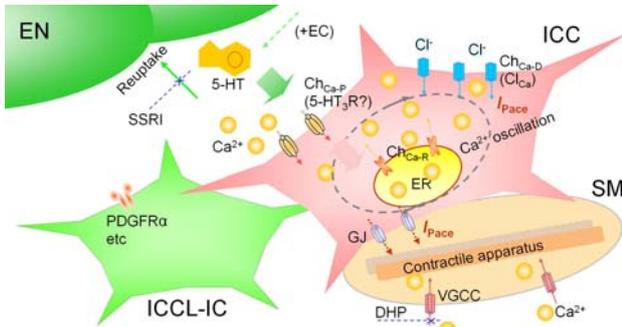


図2：消化管ペースメーカ活動発生のための細胞連携モデル。プライマリメカニズムである ICC の Ca オシレーションは ER の Ca 放出チャネル(Ch_{Ca-R})と細胞外からの Ca 流入チャネル(Ch_{Ca-P})の連携によって発生する。検出された STIM は、おそらくこの細胞外/細胞内 Ca 連携の Key として働く。また ICC の a オシレーションは細胞膜の Ca 依存性チャネル(Ch_{Ca-D})、おそらく Ca 活性化 Cl チャネル($Cl_{Ca} = Ano1$)を周期的に活性化してペースメーカ電流(I_{pace})を発生する。 I_{pace} はギャップチャネル(GJ)を介して平滑筋(SM)へ伝搬し、電位依存性 Ca チャネル(VGCC)を活性化し収縮を引き起こす。周辺の壁内神経細胞(EN)が放出する 5-HT は、 Ch_{Ca-P} を活性化して Ca 流入を増すことにより ICC のペースメーカ活動を增强する。5-HT により增强される Ch_{Ca-P} は非選択的陽イオンチャネルである 5-HT₃ 受容体自身も含まれる。

このサンプルから mRNA を採取し、RT-PCR で調べたところ、マーカ (蛍光標識) として使用した *c-Kit* だけでなく、Ca 活性化 Cl チャネル(*Ano1*)や細胞内 Ca ストアーでの Ca センサーとして働く *STIM1* に相当する遺伝子発現等が確認できた。後者は ICC のペースメーカ活動の根源である細胞内 Ca オシレーションにおいて、細胞内 Ca ストアーからの Ca 放出と細胞外からの Ca 流入経路を関連づける重要因子であり、前者は ICC の Ca オシレーションによって周期的に活性化されペースメーカ電流源となるチャネルと考えられる。

申請者達が現在考える細胞内・細胞外 Ca シグナルの連携とペースメーカ電位 (電流) 発生メカニズムの作業仮説を、図2にまとめる。

② ICC ペースメーカ活動の連携

白金黒粒子を固着した低インピーダンスの微小電極アレイ (microelectrode array: MEA) を用いて、 1mm^2 の微小領域における ICC ペースメーカ活動電位の伝搬・連携を観測・解析した。これまで、このような微小な領域の緩徐な電位活動の電氣的なマッピングできなかった。本研究手法は、特にモデル動物などの小動物において、消化管ペースメーカ活

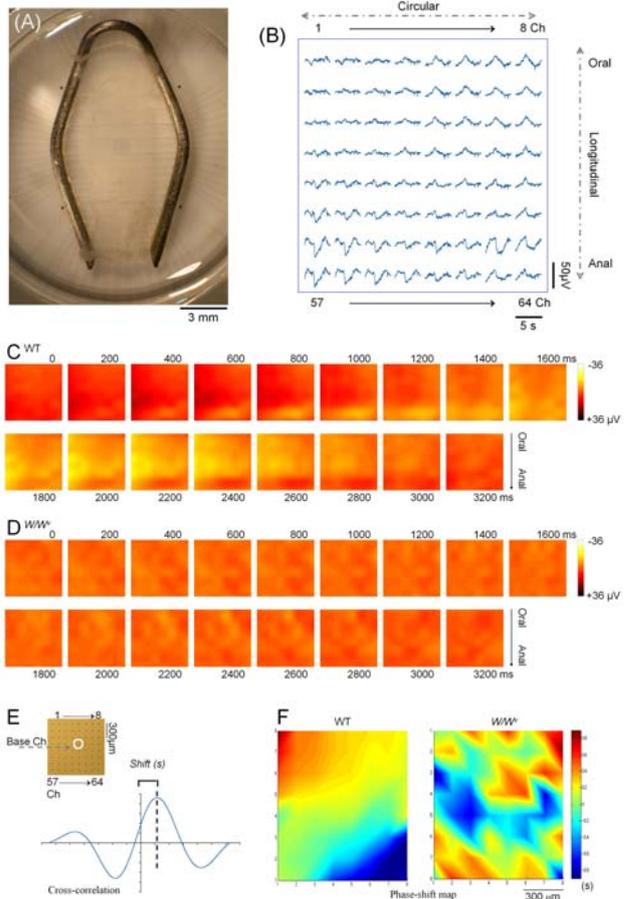


図3：8 x 8 MEA 計測と解析 (説明は本文参照) 動を詳細に調べるための新たな研究ツールとして利用できる。

図3は ICC ペースメーカ活動計測と解析例を示す。標本としてマウス小腸を使用している。8x8 MEA チャンバーは直流ヒータ上で保温され、その中の ICC ネットワークを含む筋層標本はナイロン糸を張った U 字アンカー下に固定され細胞外液で灌流されている (図3A)。このようにして (正常) 野生型マウス標本から記録された 64Ch 同時記録 (B) を、疑似カラーで電位マッピングし連続的に示すことができる (C)。この野生型マウスの小腸標本では、肛門側から口側へ (下から上に)

ペースメーカ電位が伝搬することが観察される。一方、病態モデル動物として ICC ネットワークが障害される W/W^u マウスから摘出した小腸標本では、計測領域全体で小さな電位がバラバラに活動していた(D)。これを相互相関関数を用いて詳しく解析した。(Eは正常野生型マウス標本において中心の 28Ch を対照として作成した相互相関関数である。) 隔チャンネルの相互相関関数におけるシフトをマッピングしたところ、野生型では電位の伝搬に相当するカラーのグラジエントが見られたが、一方 W/W^u マウスでは、微小な領域でも活動が同期せず、まだらな色合いが表示された。

このほかに 5-HT によるペースメーカ活動の増強作用なども MEA によって評価することが出来た。また、この 5-HT の増強作用は、細胞内 Ca 測定でも観察された。さらに MEA を用いて、SERT(-/-)マウスや IL-10(-/-)マウス消化管の自発性電気活動の特徴付けを現在進めている。

③ 動物個体の行動研究

上述のように 5-HT は ICC の電位・Ca 活動を増強することが分かった。また、日本人の大部分は 5-HT 輸送体プロモータ領域が短い遺伝子多型に属する (5-HTTLPR short variant: s/s 60%; s/l 36%)。従って、5-HT 輸送体の発現は、欧米人に比べ少ないと思われる。この 5-HT 輸送障害のモデルとして、5-HT 輸送体欠損マウスを用いて行動解析を行った(付加的関連研究)。

5-HT 輸送体欠損マウスの運動量そのものは野生型マウスと同等であった。しかし 5-HT₃ 受容体拮抗薬の経口投与を行った後には、高架プラスメイズ試験において、その行動パターンが 1 週間以上の長期間に亘り大きく変化した。この事実は、日本人の消化管運動が 5-HT 受容体を介して過活動すること及び、その行動への影響も示唆している。このメカニズム解明および生体への意義付けを今後の課題とし、継続した研究を行いたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Teramoto H, Shimizu T, Yogo H, Nishimiya Y, Hori S, Kosugi T. & Nakayama S. (2012). Assessment of gastric emptying and duodenal motility upon ingestion of liquid meal using rapid magnetic resonance imaging. *Experimental Physiology* (in press). 査読有
- ② Nakayama S. (2011). Orexins stimulate the 'appetite' of the gut. *Journal of Physiology* **589**, 5907-5908. 査読有

- ③ Nakayama S., Sawamura K, Mohri K. & Uchiyama T. (2011). Pulse-driven magnetoimpedance sensor detection of cardiac magnetic activity. *PLoS ONE* **6**(10), e25834. 査読有
 - ④ Liu(Takekawa) HN., Ohya S, Nishizawa Y, Sawamura K, Iino S, Syed MMd, Goto K, Imaizumi Y. & Nakayama S. (2011). Serotonin augments gut pacemaker activity via 5-HT₃ receptors. *PLoS ONE* **6**(9), e24928. 査読有
 - ⑤ Nakayama S., Atsuta S, Shinmi T. & Uchiyama T. (2011). Pulse-driven magnetoimpedance sensor detection of biomagnetic fields in musculatures with spontaneous electric activity. *Biosensors and Bioelectronics* **27**, 34-39. 査読有
 - ⑥ Hamaguchi Y, Tatematsu Y, Furukawa K, Matsubara T. & Nakayama S. (2011). Imipramine inhibition of TRPM-like plasmalemmal Mg²⁺ transport in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **15**, 593-601. 査読有
 - ⑦ 中山晋介, (2011). 消化管運動ペースメーカを介した脳腸機能相関について。自律神経 **48** (2): 83-85. 査読無
 - ⑧ Takaki M., Suzuki H. & Nakayama S. (2010). Recent advances in studies of spontaneous activity in smooth muscle: ubiquitous pacemaker cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **102**, 129-135. 査読有
 - ⑨ Nakayama S., Ohishi R, Sawamura K, Watanabe K. & Hirose K. (2009). Microelectrode array evaluation of gut pacemaker activity in wild-type and W/W^u mice. *Biosensors and Bioelectronics* **25**, 61-67. 査読有
 - ⑩ Teramoto H, Mizuno H, Yogo H, Hori S. & Nakayama S. (2009). Assessment of gastric motility by magnetic resonance imaging in patients with enteral nutrition. *Journal of American Geriatrics Society* **57**, 1965-1966. 査読有
 - ⑪ Kajioka S., Nakayama S., Seki N, Naito S. & Brading, AF. (2008). Oscillatory membrane currents paradoxically induced via NO-activated pathways in detrusor cells. *Cell Calcium* **44**, 202-209. 査読有
- [学会発表] (計 25 件)
- ① 中山晋介, 「順逆方向の電氣的興奮伝搬を可能とする ICC ネットワーク連携活動の微小電極アレイによる研究」 第 1 回 Japan Gut Forum (東京、2010-10-30)

② Nakayama S, Sawamura K, Mohri K, Uchiyama T. 'Use of pulse-driven pico-tesla magnetoimpedance sensor to detect cardiac magnetic activity on the surface of the human chest'. 28th PIERS (Progress in Electromagnetics Research Symposium) (Cambridge, USA, 2010-7-8).

③ 谷口瑞毅、劉(武川) 紅年、中山晋介、「ゼロトニトランスポーターの消化管ペースメーカー活動への作用」第52回平滑筋学会シンポジウム (仙台、10-7-2)

④ Nakayama S, & Uchiyama T. 'Methods to analyze smooth muscle rhythmic activity'. 6th International Symposium on Interstitial Cells of Cajal. (Miyazaki, Japan, 2010-2-8).

⑤ Nakayama S, Liu(Takekawa) HN, Goto K, Takaki M, Kajioka S. 'Calcium and electric activities in gut pacemaker cells'. IUPS (International Union of Physiological Society) 36th World Congress, PSJ Symposium (Kyoto, Japan, 2009-7-28)

[図書] (計3件)

① Nakayama S, Taniguchi M. & Liu(Takekawa) HN. (2011). Network of gut pacemaker cells: spatio-temporal evaluation of electrical activity by use of microelectrode array. In: Modern Pacemakers - Present and Future, Chapter 24, pp427-440 (ed. Mithilesh Kumar Das, INTECH, Austria).

② 中山晋介, (2011). 高齢化社会にかかわる新しいヒト恒常性監視機関：脳腸相関。医学のあゆみ 239(5), 343-348.

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

名称：細胞組織磁気信号検出装置
発明者：中山晋介、内山剛、毛利佳年雄
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2010-509029
出願年月日：平成 22 年 11 月 2 日
国内外の別：国内・国外(PCT 出願)

名称：器官運動解析装置及び器官運動解析プログラム
発明者：小杉隆司、清水利恭、中山晋介、寺本英巳
権利者：アールテック
種類：特許
番号：特願 2010-265376
出願年月日：平成 22 年 11 月 29 日
国内外の別：国内

名称：磁気検出装置

発明者：内山剛、中山晋介、熱田諭志
権利者：名古屋大学、フジデノロ
種類：特許
番号：特願 2011-049710
出願年月日：平成 23 年 3 月 7 日
国内外の別：国内・国外(PCT 出願)

○取得状況 (計1件)

名称：細胞組織磁気信号検出装置
発明者：中山晋介、内山剛、毛利佳年雄
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特許第 4665105
取得年月日：平成 23 年 1 月 21 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0011077/?lang=english>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 晋介 (NAKAYAMA SHNSUKE)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30192230

(2) 研究分担者

鈴木 治彦 (SUZUKI HARUHIKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90283431

武川 紅年 (TAKEKAWA KONEN)
名古屋大学・大学院医学系研究科・研究補助員
研究者番号：10397458

岩下 寿秀 (IWSHITA TOSHIHIDE)
浜松大学・医学部・教授
研究者番号：00283432

(3) 連携研究者

西沢 祐治 (NISHIZAWA YUJI)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：80252229

廣瀬 謙造 (HIROSE KENZO)
東京大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00292730

高木 都 (TAKAKI MIYAKO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00033358