

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380159

研究課題名（和文）腸管の蠕動発現メカニズムの究明：各種ノックアウトマウスを武器とした新たな展開

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for the generation of gut peristaltic reflex using various types of knockout mice.

研究代表者

小森 成一（KOMORI SEIICHI）

岐阜大学・応用生物科学部・名誉教授

研究者番号：70195866

研究成果の概要（和文）：

腸管運動の発現およびその調節には、アセチルコリンを放出する神経が主要な役割を担っている。神経から放出されたアセチルコリンは他の神経や平滑筋細胞の受容体に作用するが、どのタイプの受容体が蠕動の発現に重要なのか明らかになっていない。本研究では、各種受容体ノックアウトマウスを武器として蠕動運動の発現を検討し、従来より考えられていた M3 よりもむしろ M2 タイプの受容体が蠕動の発現に必須であることを明らかにした。このサブタイプは過敏性腸症候群など各種腸疾患の新たな治療薬のターゲットとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

The cholinergic neurons play an important role in the generation and regulation of gut peristaltic reflex. Acetylcholine released from the cholinergic neurons act on muscarinic receptors in various neurons and smooth muscles to produce peristalsis. However, the precise roles of muscarinic receptor subtypes have not yet been elucidated. In the present study, we analyzed gut peristalsis in muscarinic receptor subtype knockout mice. The results suggest that M2 subtype of muscarinic receptor plays an essential role in the generation of peristalsis and that this subtype may be a useful target for the development of new drugs to treat for various intestinal disorders, such as irritable bowel syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：消化管、蠕動運動、ノックアウトマウス、コリン作動性神経、カハール間質細胞、ムスカリン受容体、受容体サブタイプ。

1. 研究開始当初の背景

消化管の蠕動運動の発現機構の解明は、古くて新しい課題として国の内外や人医・獣医領域を問わず、基礎から臨床まで広い分野で

活発に研究されている。消化管の蠕動運動は輪走筋と縦走筋と呼ばれる平滑筋細胞の協調による反復性の腸収縮運動として発現する。蠕動を誘起する主な壁在神経としてアセ

チルコリン(ACh)を放出する神経(以下、ACh神経)が同定されている。この神経から放出された ACh は輪走筋および縦走筋に作用し収縮を誘起する。腸管組織には ACh 受容体として M2 と M3 のサブタイプが存在する。しかし、これらの受容体サブタイプが蠕動発現にどのような役割を担っているのか、その詳細は明らかにされていない。近年、胃標本において、ACh 神経がカハール間質細胞 (ICC 細胞) を仲介して平滑筋を収縮させる可能性が示唆されている。そのため、ICC 細胞は腸管の蠕動発現に関与している可能性もあり得るが、まだ検討されていない。本研究は、ACh 受容体サブタイプのノックアウトマウスや ICC 細胞が一部欠損したマウスを武器として、上述の未解決の問題や可能性も含めて蠕動発現メカニズムを究明しようと企画した。

2. 研究の目的

本研究では、腸管の蠕動発現メカニズムを解明し、その分子機構のモデルを構築する一環として、(1) 蠕動の発現とその周期性、持続性、および輪走筋と縦走筋の協調性における ACh 受容体サブタイプ (M2 と M3) ならびに ICC 細胞の役割・機能、(2) ACh 放出神経から平滑筋への情報伝達における各 ACh 受容体サブタイプと ICC 細胞の役割・機能、(3) ICC 細胞の ACh に対する応答反応とその細胞応答における各 ACh 受容体サブタイプの役割・機能を明らかにし、消化器疾患の病態解明や治療薬の開発に基礎情報を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画では、M2 または M3 ムスカリン受容体サブタイプの欠損マウス (必要に応じて M2/M3 両サブタイプ欠損マウスも用いる)、ICC 細胞の一部が欠損したマウス (W/Wv ミュータントマウス)、および対照として野生型マウスを実験動物として使用した。実験には、これらマウスの摘出小腸から各目的に応じた標本を作製・調製し、小腸条片の蠕動運動、小腸平滑筋の神経刺激収縮反応、単一小腸平滑筋細胞の膜電位反応・膜電流反応、単一 ICC 細胞の膜電流反応などを記録、解析した。

4. 研究成果

得られた研究成果は以下の通りである。

(1) M2 と M3 の ACh 受容体サブタイプ欠損マウス的小腸標本を用いて蠕動運動を解析した結果、M2 サブタイプ欠損マウスの標本では蠕動が発現しなくなることで、M3 サブタイプ欠損マウスの標本では蠕動は発現するものの、周期的な運動は起こらないことが明らかとなり、M2 と M3 の両 ACh 受容体サブタイプが蠕動発現に関わっていることがわかった

(図 1)。これら欠損マウスでは、神経および ICC 細胞のネットワークには、野生型と比較して差が認められなかった (図 2)。輪走筋と縦走筋の運動を相互相関曲線法により解析すると、蠕動反射の発現そのものには M2 サブタイプが非常に重要な役割を果たしており、輪走筋と縦走筋の協調性に関与する事が、また、M3 サブタイプは蠕動の周期性の発現に関与する事が明らかとなった。蠕動の発現に関与する M2 サブタイプは、平滑筋に存在する受容体よりも、むしろ神経側に存在して各種伝達物質の放出を調節する受容体の方が重要であると考えられた。

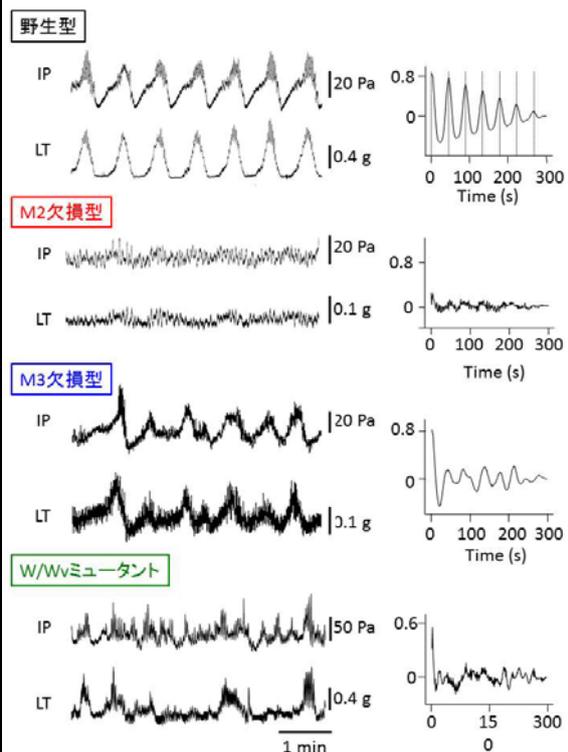


図 1. 各欠損型マウス的小腸標本における蠕動運動

マウス从小腸片を摘出し、管腔内圧 (IP: 輪走筋の収縮活性を反映する) および長軸方向の張力変化 (LT: 縦走筋の収縮活性を反映する) を同時測定した。蠕動運動は管腔内の圧を高めることにより誘発した。野生型の標本では律動的な蠕動運動が誘発されたが、M2 欠損型では誘発されなかった。M3 欠損型および W/Wv ミュータントの標本では、蠕動運動が誘発されたもののその発生周期は不規則であった。各トレースの右側は、IP および LT の変化について相互相関曲線法を用いて解析した結果を示す。野生型では蠕動運動がある一定の時間をもって繰り返し発現する周期性が認められるが、欠損型およびミュータントでは蠕動が発生する周期は不規則であり、周期性は認められなかった。

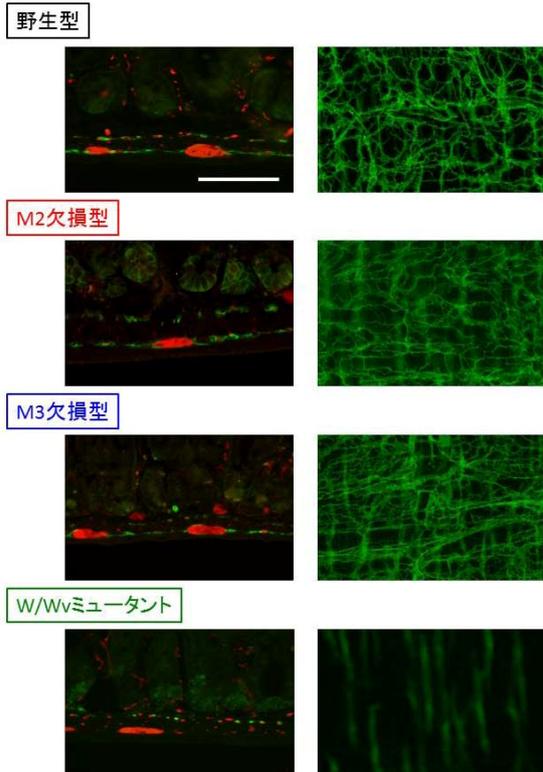


図 2. 各欠損型マウスの小腸における内在神経および ICC 細胞のネットワーク

左は小腸縦断面における PGP9.5 (赤: 神経細胞の標識マーカー) および c-kit (緑: ICC 細胞の標識マーカー) 陽性細胞を示す。各欠損型の神経ネットワークについては、野生型と比較して差は認められなかった。右は筋間神経叢における ICC 細胞のネットワークを示す。M2 および M3 サブタイプ欠損型の ICC 細胞ネットワークについては、野生型と比較して差は認められなかった。しかし、W/Wv ミュータントでは、筋間神経叢における ICC 細胞が欠損し、粘膜下神経叢に存在する ICC 細胞のみが検出されている。

(2) 筋間神経叢の ICC 細胞が欠損したマウス (W/Wv ミュータントマウス) の小腸標本を用いて蠕動運動を解析した結果、M3 サブタイプ欠損マウスの結果とほぼ同じとなり (図 1)、筋間神経叢における ICC 細胞の存在が周期的な蠕動運動の発現に必要であることが明らかとなった。(1) の結果および ICC 細胞に発現する受容体サブタイプのこれまでの報告を考え合わせると ICC 細胞の M3 サブタイプが蠕動周期の調節に重要である可能性が示唆された。

(3) ACh 放出神経から平滑筋への情報伝達 (コリン作動性情報伝達) における M2 と M3 の各サブタイプの役割を、興奮性接合部電位

(EJP) を指標に検討した結果、EJP の発現には、M2、あるいは M3 の ACh 受容体サブタイプの単独刺激により発生する経路に加え、両受容体の刺激を必要とする経路 (M2/M3 経路) が存在し、M2/M3 経路がコリン作動性情報伝達の主要経路であることが明らかとなった。これらの 3 経路 (M2 経路、M3 経路、M2/M3 経路) は、それぞれが陽イオンチャネルを活性化することにより EJP を発生させていると考えられる。また、M3 サブタイプを介した EJP の発現には、陽イオンチャネルの活性化に加え、Ca²⁺依存性 Cl⁻チャネルの活性化も関与することが明らかとなった。

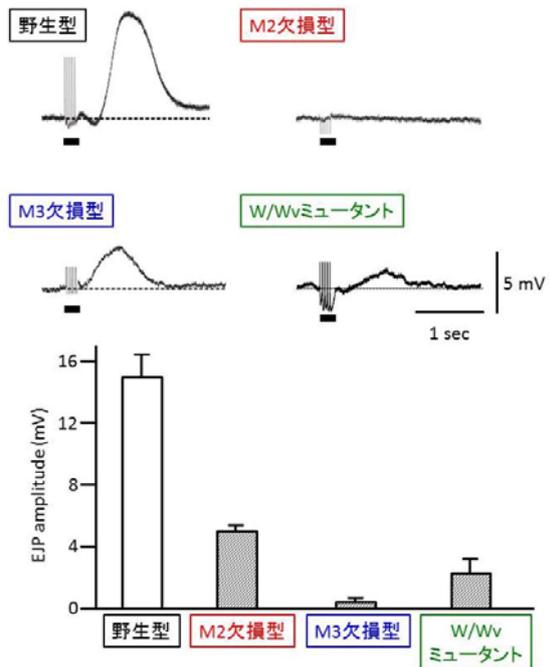


図 3. 各欠損型マウスの小腸標本における興奮性接合部電位

マウスから小腸片を摘出し、ガラス微小電極法により平滑筋細胞の膜電位反応を記録し、経壁電気刺激 (■: 30 V, 0.5 msec パルス幅、20 Hz、5 パルス) により興奮性接合部電位 (EJP) を誘発した。欠損型およびミュータントマウスの標本では、野生型と比較して著しく小さな EJP しか記録されなかった。M2 欠損型と M3 欠損型で記録された EJP の振幅を足し合わせても野生型の振幅には及ばなかった。

(4) W/Wv ミュータントマウスを用いて EJP および神経刺激収縮の発生を解析した結果、輪走筋だけでなく縦走筋においても筋間神経叢の ICC がコリン作動性情報伝達の一部を仲介する事が明らかとなった。小腸の内在神経、ICC 細胞および縦走平滑筋細胞について免疫組織化学的および形態学的検討を行っ

た結果、コリン作動性神経と ICC 細胞が接している領域が確認され、ICC 細胞を介した情報伝達を支持する結果が得られた。また、この経路とは別に、ICC 細胞を介さず直接平滑筋へ情報を伝達するコリン作動性経路のあることも明らかとなった。

(5) ICC 細胞に発現しているムスカリン受容体サブタイプを検討したところ、RT-PCR では M1~M5 のうち M2 と M3 のサブタイプのみが検出された。さらに、各サブタイプの抗体を用いた免疫組織化学的手法により検討した結果、M2 サブタイプの発現が確認され、このサブタイプが ICC を介したコリン作動性情報伝達に関与する可能性が示唆された。また、単離した ICC 細胞においてムスカリン受容体刺激により内向き電流が誘発されることが明らかとなった。この電流が脱分極を起こし、ギャップジャンクションを介して平滑筋に伝播する可能性が考えられた。現在、電流の発生メカニズムについて解析を行っている。

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 15 件)

- ① Matsuyama, H., Tanahashi, Y., Kitazawa, T., Yamada, M., Komori, S., Unno, T.: Evidence for M₂ and M₃ muscarinic receptor involvement in cholinergic excitatory junction potentials through synergistic activation of cation channels in the longitudinal muscle of mouse ileum. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 121: 227-236, 2013. DOI: 10.1254/jphs.12231FP
- ② Ochi, K., Teraoka, H., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Kitazawa, T.: A ganglionic stimulant, 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium, caused both cholinergic and adrenergic responses in the isolated mouse atrium. *Eur. J. Pharmacol.*, 査読有, 704: 7-14, 2013. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.02.019.
- ③ Kitazawa, K., Yoshida, A., Tamano, T., Teraoka, H., Kaiya, H.: Age-dependent reduction of ghrelin- and motilin-induced contractile activity in the chicken gastrointestinal tract. *Peptides*, 査読有, 43: 88-95, 2013. DOI: 10.1016/j.ygcn.2012.06.025.
- ④ Harada, N., Ochi, K., Yaosaka, N., Teraoka, H., Hiraga, T., Iwanaga, T., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Kitazawa, T.: Immunohistochemical and functional studies for M₃ muscarinic receptors and cyclooxygenase-2 expressed in the mouse atrium. *Auton. Autacoid Pharmacol.*, 査読有, 32: 41-52, 2012. DOI: 10.1111/j.1474-8673.2012.00472.x
- ⑤ Kitazawa, T., Itoh, K., Yaosaka, N., Maruyama, K., Matsuda, K., Teraoka, H., Kaiya, H.: Ghrelin does not affect gastrointestinal contractility in rainbow trout and goldfish in vitro. *General Comp. Endocrinol.*, 査読有, 178: 539-545, 2012. DOI: 10.1016/j.ygcn.2012.06.025.
- ⑥ Kitazawa, T., Nakamura T., Saeki A., Teraoka H., Hiraga T., Kaiya H.: Molecular identification of ghrelin receptor (GHS-R1a) and its functional role in the gastrointestinal tract of the guinea-pig. *Peptides*, 査読有, 32: 1876-1886, 2011. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.07.026
- ⑦ Kondo, T., Nakajima, M., Teraoka, H., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Kitazawa, T.: Muscarinic receptor subtypes involved in regulation of colonic motility in mice: functional studies using muscarinic receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 査読有, 670: 236-243, 2011. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.08.034. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.08.034
- ⑧ Iino, S., Horiguchi S., Horiguchi K.: Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W (jic) c-kit mutant mice. *J Smooth Muscle Res.* 査読有, 47: 111-121, 2011. DOI: 10.1540/jsmr.47.111
- ⑨ Liu H.N., Ohya S., Nishizawa Y., Sawamura K., Iino, S., Syed M.M., Goto K., Imaizumi Y., Nakayama S.: Serotonin Augments Gut Pacemaker Activity via 5-HT₃ receptors. *PLoS ONE* 査読有, 6: e24928(10 頁), 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0024928
- ⑩ Matsuyama, H., Unno, T., Komori, S., Takewaki T.: Nitric inhibition of tachykinergic neuro-muscular transmission via cyclic GMP in the hamster ileum. *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有, 73: 453-458, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0425
- ⑪ Okuno, Y, Kondo, T, Saeki, A, Uchida, E, Teraoka, H, Kitazawa, T.: Colon-specific contractile responses to tetrodotoxin in

- the isolated mouse gastrointestinal tract. *Auton. Autacoid Pharmacol.*, 査読有, 31: 20-30, 2011. DOI: 10.1111/j.1474-8673.2011.00462.x.
- ⑫ Fujikawa, R., Muroi, Y., Unno, T., Ishii, T.: Ouabain exacerbates botulinum neurotoxin-induced muscle paralysis via progression of muscle atrophy in mice. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 35: 795-805, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.35.795>
- ⑬ Kodama, Y., Iino, S., Shigemasa, Y., Suzuki, H. Properties of acetylcholine-induced relaxation of smooth muscle isolated from the proximal colon of the guinea-pig. *J. Smooth Muscle Res.*, 査読有, 46: 185-200, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1540/jsmr.46.185>
- ⑭ Suguro, M., Matsuyama, H., Unno, T., Tanahashi, Y., Kitazawa, T., Yamada, M., Komori, S.: Muscarinic receptor subtypes mediating Ca²⁺ sensitization of intestinal smooth muscle contraction; studies with mutant mice lacking the receptor subtypes. *J. Vet. Med. Sci* 査読有, 72: 443-451, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.09-0458>
- ⑮ Horiguchi, S., Horiguchi, K., Nojyo, Y., Iino, S.: Downregulation of msh-like 2 (*msx2*) and neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (*ntrk2*) in the developmental gut of KIT mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 査読有, 396: 774-779, 2010. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.030.
- [学会発表] (計25件)
- ① 海野年弘他: Involvement of M2 or M3 muscarinic receptor-coupled signalling molecules in the activation of muscarinic cation channels in mouse ileal smooth muscle cells. 第86回日本薬理学会総会. 2013年03月21日~2013年03月23日, 福岡.
- ② 棚橋靖行他: Muscarinic regulation of ATP sensitive K⁺ channels in mouse ileal smooth muscles. 第86回日本薬理学会総会. 2013年03月21日~2013年03月23日, 福岡.
- ③ Iino, S.他: Interstitial cells of Cajal in c-Kit mutant mice. The 7th international symposium on ICC. 2012年09月02日~2012年09月05日, Florence (Italy).
- ④ Iino, S.他: Interstitial cells of Cajal in c-Kit signal deficient W-sash mutant mice. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. 2012年08月26日~2012年08月29日, Kyoto (Japan).
- ⑤ Iino S.他: Morphological and functional properties of fibroblast-like cells in the gastrointestinal musculature. 第89回日本生理学会総会. 2012年3月30日, 松本.
- ⑥ Ochi K. 他 (Unno T.3番目): A gabgion stimulant, 1,1 dimethyl-4 phenyl-piperazinium iodide (DMPP) stimulates both cholinergic and adrenergic neurons in isolated atrium of the mouse. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月16日, 京都.
- ⑦ Hayato M., Nguyen T., Unno T., Komori S., Thacker M., Pontell L., Hunne B., Nurgali K., Furness J. Role of T type Ca²⁺ channels in myenteric AH neurons of the guinea-pig ileum. 第85回日本薬理学会年会 2012年3月15日, 京都.
- ⑧ Kondo K. 他 (Unno T.3番目) Neuronal M₁ muscarinic receptor mediates inhibition of mouse colonic motility through activation of nitrenergic nerves. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月14日, 京都.
- ⑨ 飯野哲他: マウス胎生期消化管における c-Kit 受容体型チロシンキナーゼ発現の解析. 第52回日本組織細胞化学会総会. 2011年9月24日, 金沢.
- ⑩ 飯野哲他: c-Kit を発現しない Wsh ミュータントマウスにおけるカハール介在細胞. 第52回日本組織細胞化学会総会. 2011年9月24日, 金沢.
- ⑪ 海野年弘他: 過活動膀胱モデルマウスの膀胱における神経刺激収縮反応の変化. 第152回日本獣医学会学術集会. 2011年9月20日, 大阪.
- ⑫ 松山勇人他: モルモット回腸の筋層間神経細胞における T-型電位依存性 Ca²⁺チャネルの役割. 第152回日本獣医学会学術集会. 2011年9月20日, 大阪.
- ⑬ 飯野哲他: マウス消化管筋層における線維芽細胞様細胞の組織学的検討. 第53回日本平滑筋学会総会. 2011年8月4日, 東京.
- ⑭ 飯野哲他: c-Kit 遺伝子異常を持つ W ミュータントマウスにおける消化管カハール介在細胞. 第53回日本平滑筋学会総会. 2011年8月3日, 東京.
- ⑮ Iino S.他: ICC and fibroblast-like cells: Interstitial cells in the gastrointestinal musculature. 第116回日本解剖学会総会. 2011年3月30日, 横浜.

- ⑬ 飯野哲他：c-Kit 遺伝子異常を持つ W ミュータントマウスにおける消化管カハール介在細胞. 第 51 回日本組織細胞化学会総会. 2010 年 9 月 4 日, 東京.
- ⑭ 松山勇人他：ハムスター小腸のタキキニン作動性神経—平滑筋間の情報伝達に対する NO 作動性神経による抑制機構. 第 151 回日本獣医学会学術集会. 2011 年 3 月 30 日, 東京.
- ⑮ Unno, T.他：Role of M3 muscarinic receptor-coupled signalling molecule in the activation of muscarinic cation channels in mouse ileal smooth muscle cells. 第 84 回日本薬理学会年会. 2011 年 3 月 23 日, 横浜.
- ⑯ 海野年弘他：マウス回腸平滑筋細胞のムスカリン作動性陽イオンチャンネルの活性化における M3 受容体サブタイプに関連した情報伝達分子の役割. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 9 月 16 日, 帯広.
- ⑰ 棚橋靖行他：マウス回腸縦走筋標本におけるムスカリン作動性収縮に対するカハール細胞の役割. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 9 月 16 日, 帯広.

[その他]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~pharmaco/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森 成一 (KOMORI SEIICHI)
岐阜大学・応用生物科学部・名誉教授
研究者番号：70195866

(2) 研究分担者

海野 年弘 (UNNO TOSHIHIRO)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：90252121
北澤 多喜雄 (KITAZAWA TAKIO)
酪農学園大学・獣医学部・教授
研究者番号：50146338
飯野 哲 (IINO SATOSHI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：40242854
松山 勇人 (MATUYAMA HAYATO)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：80345800
棚橋 靖行 (TANAHASHI YASUYUKI)
京都産業大学・総合生命科学部・助教
研究者番号：60582418

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

Jurgen Wess (JURGEN WESS)
National Institute of Diabets and Digestive and Kidney Diseases.
山田 真久 (YAMADA MASAHISA)
沖縄科学技術研究基盤整備機構・コモンリソースグループ
酒井 洋樹 (SAKAI HIROKI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
齋藤正一郎 (SAITOH SHOUCHIROU)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
安藤 久美子 (ANDOH KUMIKO)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
木村 佳織 (KIMURA KAORI)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
杉山京子 (SUGIYAMA KYOKO)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
松井 隆輔 (MATSUI RYUUSUKE)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
桂田 泰輔 (KATSURADA TATSUKE)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
内藤清惟 (NAITO KIYIOTADA)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
祖父江 由希 (SOBUE YUKI)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
永野 宏 (NAGANO HIROSHI)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生
若田 智博 (WAKATA TOMOHIRO)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生