

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450402

研究課題名(和文) 非神経性アセチルコリンによる胃粘膜細胞の分化・増殖制御機構

研究課題名(英文) Regulation of differentiation and proliferation of gastric mucosal cells by non-neuronal acetylcholine

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アセチルコリン(ACh)による胃粘膜および胃の平滑筋細胞の分化・増殖調節に、AChが作用する受容体のうちM2およびM3ムスカリン受容体サブタイプが関与する可能性について検討した。実験には、各サブタイプの欠損マウスを用い、胃における形態・組織学的変化および機能学的変化を検討し、野生型の場合と比較した。その結果、胃粘膜細胞のうち上皮細胞、表面粘液細胞および主細胞については、その増殖プロセスに対してM2サブタイプが抑制的に制御していることが示唆された。一方、平滑筋細胞については、その分化・増殖がM3サブタイプにより促進性に制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have tested a hypothesis that acetylcholine regulate the differentiation and proliferation of gastric mucosal and smooth muscle cells through M2 and M3 subtypes of muscarinic receptor. Using M2 or M3 subtype knockout (KO) mouse, morphological and functional differences between each KO mouse and wild type (WT) mouse were investigated in gastric mucosa and smooth muscle tissues. The results suggest that M2 subtype is involved in inhibitory regulation of cell proliferation process in gastric mucosa cells including epithelial cells, surface mucous cells and chief cells. On the other hand, it has been suggested that M3 subtype implicate in facilitatory regulation of cell proliferation process in gastric smooth muscle cells.

研究分野：薬理学

キーワード：非神経性アセチルコリン ムスカリン受容体 受容体サブタイプ ノックアウトマウス 胃粘膜細胞 増殖制御

1. 研究開始当初の背景

ムスカリン受容体はコリン作動性神経の伝達物質であるアセチルコリン (ACh) の作用を仲介する受容体であり、中枢および抹消を問わず様々な組織・器官に広く分布している。同受容体には M1 ~ M5 まで 5 種類のサブタイプが存在する。胃や小腸の各細胞には M1 ~ M4 までのサブタイプの存在が報告されている。このうち、M2 と M3 のサブタイプが、発現量および機能の面から重要な役割を果たしていると考えられており、両サブタイプは消化管における胃酸、消化酵素、消化管ホルモンの分泌や平滑筋の収縮制御に関わっていることが明らかにされている。これらの機能はいずれも神経から放出された ACh により制御されると考えられている。しかし、最近リンパ球など神経細胞以外にも ACh の合成能を有する細胞の存在が知られるようになり、いわゆる“非神経性 ACh”の機能的な役割が注目されるようになってきた。

我々はこれまで、ムスカリン受容体サブタイプの欠損マウスを用いて平滑筋の収縮発現に関わる M2 と M3 の役割を追求してきた (引用文献 ~)。その課程において、M2 サブタイプの欠損マウスでは加齢とともに胃が肥大することを見出した (図 1 参照)。M2 と M3 のダブル欠損型ではこのような異常は認められないので、単に M2 が欠損すると胃が肥大するわけではない。興味深いことに、M3 欠損型では、胃が萎縮するといった、M2 欠損型とはまったく逆の所見を示した。これらの結果は、胃粘膜細胞や平滑筋細胞の分化・増殖に M2 と M3 サブタイプの刺激が関与しており、M3 は増殖を促進するような、M2 は抑制するようなシグナル経路と連関することを示唆している。このような作用の発現には神経由来よりもむしろ、オータコイド様に放出される“非神経性 ACh”が関わっていると考えられる。そこで我々は、これまでの神経性の役割に加え、非神経性の役割を明らかにすることにより、消化管における ACh の包括的な機能を解明することを目的に本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 非神経性 ACh の由来となっている細胞は何か、(2) 胃の肥大や萎縮がどのタイプの胃粘膜細胞の変化に由来しているのか、(3) 粘膜の変化に伴って胃の機能がどのように変化するのか、(4) 各サブタイプがどのような情報伝達因子を介して胃の肥大や萎縮を誘発しているのか、について明らかにすることを目的とした。このために、M2 または M3 ムスカリン受容体サブタイプの欠損マウスを用い、胃における形態的变化、機能的变化および情報伝達分子の挙動を検討し、野生型のものと比較・解析した。

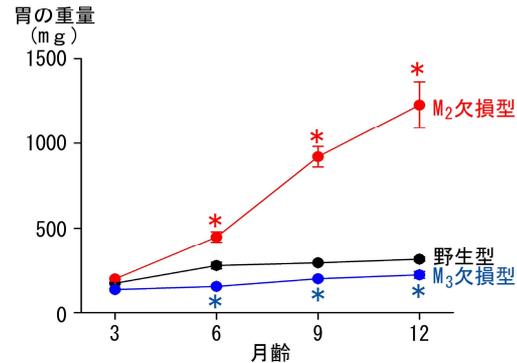
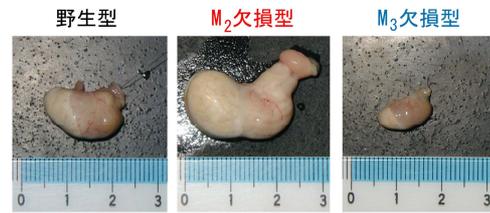


図 1. 野生型、M2 欠損型および M3 欠損型における胃重量の変化

3. 研究の方法

実験には、M2 欠損型、M3 欠損型、M2/M3 両サブタイプのダブル欠損型および野生型マウスを用いた。

(1) 各種臓器の形態学的変化

各欠損マウスから胃および他の主要臓器を摘出し、湿重量を測定するとともに外観の形態学的観察を行った。また、ヘマトキシリン・エオジン染色および必要に応じて PAS 染色を行い、組織像を観察した。

(2) 免疫組織学的手法

壁細胞は、プロトンポンプマウス抗体を使用した免疫染色により同定し、野生型と欠損型における抗体陽性細胞数を計測した。ACh 産生細胞の同定には、ACh の合成酵素であるコリンアセチルトランフェラーゼに対する抗体を用いた。

(3) 収縮反応および胃排出能の測定

胃、小腸、大腸における輪走筋および縦走筋の収縮反応は、マグヌス法を用いた張力測定により記録した。胃の排出能は経口投与したチャコールの移動度から評価した。また、大腸の内容物輸送能は、大腸に挿入したガラスビーズの排出時間を測定することにより評価した。胃における胃酸分泌については、胃粘膜面の pH を測定することにより評価した。

(4) 血中ホルモン濃度の測定

エーテル麻酔下において心採血またはアニマルランセットを用いて頸部静脈から採血し、血中ガストリン、バゾプレシン、アルドステロン濃度のラジオイムノアッセイ法による測定を株式会社モノリスに依頼した。

4. 研究成果

(1) 胃の形態学的変化

各欠損マウスの胃以外の臓器・器官に肥

大や萎縮などの異常がないか検討した結果、他の主要臓器には特段の異常は認められず、欠損型マウスにおける臓器の肥大・萎縮は消化管に特異的であることが明らかとなった。

胃の神経細胞およびカハール間質細胞 (ICC) のネットワークに形態学的な異常がないか検討した結果、各欠損型に異常は認められず、神経ネットワークの異常が胃の肥大・萎縮をもたらしているわけではないことが明らかとなった (図 2)。

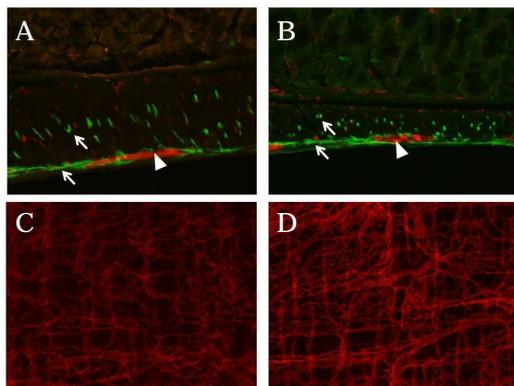


図 2 . M2 欠損型 (A および C) および M3 欠損型 (B および D) における神経 (矢頭) および ICC (矢印) の二重染色像 (上段) と神経のネットワーク像 (下段)。

胃粘膜細胞にどのムスカリン受容体サブタイプが発現しているか検討した結果、M2 サブタイプの存在が認められた。

M2 欠損マウスの胃における各種粘膜細胞について形態・組織学的研究を行った結果、胃小窩の領域においては、上皮細胞および表面粘液細胞の過形成が認められた。また、固有胃腺および胃底腺では、腺細胞 (主に主細胞) の過形成による胃腺の肥大も認められ、これらの変化が胃粘膜肥厚の原因であることが明らかとなった (図 3)。一方、壁細胞には形態学的な変化は認められなかったものの、その数はむしろ減少しており、このことが同マウスで認められた胃酸分泌低下の原因となっていることが明らかとなった。噴門腺および幽門腺部は、欠損型でほとんど変化は見られなかった。

M2 欠損マウスのヘマトキシリン エオジン染色像において減少が認められた壁細胞については、プロトンポンプに対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、その数の変化と形態についてさらに検討を加えた。その結果、壁細胞の形態、大きさに異常は認められないものの、その数は野生型と比較して有意に減少しており、M2 欠損マウスで増加が認められた上皮細胞、表面粘液細胞および腺細胞 (主に主細胞) とは、異なる増殖制御機構の存在が示唆された。

M2 欠損マウスにおける胃の平滑筋層の厚

さは、野生型と比較して有意に増加していた。一方、M3 欠損マウスを用いて胃粘膜および平滑筋細胞の形態学的変化を調べたところ、粘膜増の各種細胞に目立った形態学的変化は認められなかったが、平滑筋層の厚さは野生型と比較して有意に減少しており、このことが胃の萎縮に関与していることが明らかとなった。

胃粘膜細胞には ACh の合成酵素であるコリンアセチルトランフェラーゼを含有する細胞が検出された。しかし、その細胞腫の同定までには至らなかった。この点は、今後さらに検討する予定である。

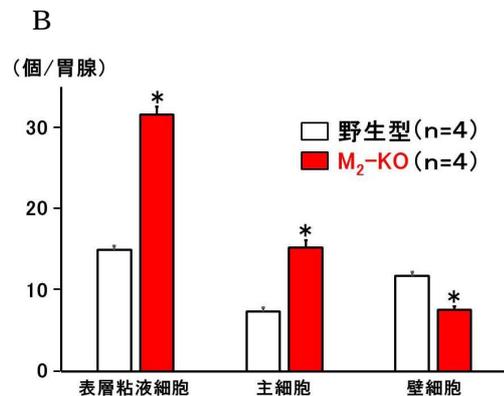
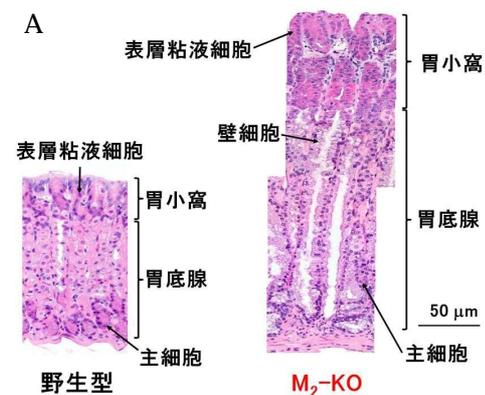


図 3 . 野生型および M2 欠損型マウス (M2-KO) の胃粘膜組織像 (A) および胃粘膜細胞数 (B)。細胞数は胃腺 1 個当たりの細胞数として計測した。* は野生型との間に有意差が認められたことを示す。

(2) 胃の機能的変化

胃の肥大・萎縮により、胃酸分泌、胃排出能、胃平滑筋の収縮能がどのように変化するか検討した結果、M2 欠損型においてこれら機能の低下が認められた。

胃、小腸および大腸平滑筋の機能的な変化を検討した結果、野生型と比較して各欠損マウスでは、輪走筋あるいは縦走筋の収縮張力が有意に小さくなっているものの、胃排出能および大腸における内容物輸送能に差は認められないことが明ら

かとなった。

(3) 胃の肥大を誘導する情報因子

胃粘膜の分化・増殖反応の制御に関わることが知られているガストリンの血中濃度を測定したところ、M2 サブタイプ欠損マウスにおいて有意に増加していることが明らかとなり、胃粘膜の肥厚が同ホルモンの過剰産生により発現している可能性が示唆された。

(4) 消化管以外の機能的変化

本研究過程において、M2 欠損マウスを用いた解析から、同マウスでは視床下部視索上核におけるバゾプレシン陽性細胞の数が野生型と比較して低下しており、血中バゾプレシン濃度も低下していることを新たに見出した。この結果は、M2 サブタイプがバゾプレシンの合成および分泌を制御していることを示唆しており、今後新たな研究課題として追及する予定である。

<引用文献>

Unno et al.: M₂ and M₃ muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 146: 98-108, 2005.

Unno et al.: Roles of M₂ and M₃ muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 149: 1022-1030, 2006.

Sakamoto et al.: Three distinct muscarinic signalling pathways for cationic channel activation in mouse gut smooth muscle cells. *J. Physiol.* 582: 41-61, 2007.

Sakamoto et al.: A non-selective cationic channel activated by diacylglycerol in mouse intestinal myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 599: 54-57, 2008.

Tanahashi et al.: Multiple muscarinic pathways mediate the suppression of voltage-gated Ca²⁺ channels in mouse intestinal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 158: 1874-1883, 2009.

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 7 件)

Kinoshita, K., Muroi Y., Unno T., Ishii, T.: Rolipram improves facilitation of contextual fear extinction in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro pyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *J. Pharmacol.*

Sci., (in press), 査読有, 2017. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.04.002.

Saito, S., Shiina T., Shimizu, Y. : NeuN immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis*. *Tissue. Cell.*, (in press), 査読有, 2017.

Tanahashi, Y., Wang, B., Murakami, Y., Unno, T., Matsuyama, H., Nagano, H. Komori, S.: Inhibitory effects of SKF96365 on activities of K⁺ channels expressed on mouse small intestinal smooth muscle cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有, 78: 203-211, 2016. DOI: 10.1292/jvms.15-0346.

Anwar, S., Yanai T., Sakai H.: Overexpression of Peroxiredoxin 6 Protects Neoplastic Cells against Apoptosis in Canine Haemangiosarcoma. *J. Comp. Pathol.*, 査読有, 155:29-39, 2016. DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.05.002.

Kinoshita, K., Tada, Y., Muroi, Y., Unno, T., Ishii, T.: Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta after systemic administration of MPTP facilitates extinction learning. *Life Sci.*, 査読有, 137: 28-36, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.07.017.

Tanahashi, Y., Ichimura, Y., Kimura, K., Matsuyama, H., Iino, S., Komori, S., Unno, T.: Cholinergic neuromuscular transmission mediated by interstitial cells of Cajal in the myenteric layer in mouse ileal longitudinal smooth muscles. *Naunyn-Schmiederberg's Arch. Pharmacol.*, 査読有, 387: 377-388, 2014. DOI: 10.1007/s00210-013-0944-2.

Saito, S., Saito, K., Nabeka, H., Shimokawa, T., Kobayashi, N., Matsuda, S.: Differential expression of the alternatively spliced forms of prosaposin mRNAs in rat choroid plexus. *Cell Tissue Res.*, 査読有, 356:231-242, 2014. DOI: 10.1007/s00441-013-1773-9.

[学会発表](計 10 件)

Unno, T., Suzuki, K., Sakuma, E., Nagano, H., Matsuyama, H., Tanahashi, Y., Komori, S., Cholinergic contraction mediated via the M₂ muscarinic receptor is predominant in mouse colonic circular muscles. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. 2016年10月16日~20日, マルセイユ(フランス). Tanahashi, Y., Wang, B., Murakami, Y., Matsuyama, H., Komori, S., Unno, T., Muscarinic suppression of ATP-

sensitive K⁺ channels mediated by the M₃/phospholipase C pathway contributes to smooth muscle contractions in mouse small intestine. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. 2016年10月16日~20日, マルセイユ (フランス).

松山 勇人, 内藤清惟, 和田善明, 永野宏, 齋藤正一郎, 酒井洋樹, 棚橋靖行, 北澤多喜雄, 小森成一, 海野年弘. ムスカリン受容体を介した胃粘膜細胞の分化・増殖制御. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年9月6日~8日, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市).

Suzuki, K., Sakuma, E., Matsuyama, H., Tanahashi, Y., Nagano, H., Kitazawa, T., Wess, J., Komori, S., Unno, T., Cholinergic contraction mediated via M2 subtype of muscarinic receptors is predominant in the mouse colonic circular muscles. 第89回日本薬理学会年会, 2016年3月9日~11日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

永野宏, 松山 勇人, 齋藤正一郎, 酒井洋樹, Wess Jergen, 小森成一, 海野年弘. M2 ムスカリン受容体は視索上核におけるバソプレシン分泌を促進する. 第26回バソプレシン研究会, 2016年1月9日, 慶應義塾大学病院 (東京・新宿区).

NAGANO, H., MATSUYAMA, H., SAITO, S., SAKAI, H., WESS, J., KOMORI, S., UNNO, T., M2 muscarinic receptor mediates arginine-vasopressin secretion in the mouse supraoptic nuclei. The 8th FEDERATION OF THE ASIAN AND OCEANIAN PHYSIOLOGICAL SOCIETIES CONGRESS, 2015年11月22日~25日, バンコク (タイ).

永野宏, 祖父江由希, 松山 勇人, 齋藤正一郎, 酒井洋樹, 棚橋靖行, Wess Jergen, 小森成一, 海野年弘. M2 ムスカリン受容体サブタイプを介したバソプレシンの分泌調節機構. 第42回日本神経内分泌学会, 2015年9月18日~19日, 仙台市戦災復興記念館 (宮城県・仙台市).

Wang, B., Murakami, Y., Unno, T., Matsuyama, H., Komori, S., Tanahashi, Y., The mechanisms of M3 muscarinic suppression of ATP sensitive K⁺ (KATP) channels in mouse small intestinal smooth muscle cells. 第88回日本薬理学会年会, 2015年3月18日~20日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

永野宏, 祖父江由希, 松山 勇人, 齋藤正一郎, 酒井洋樹, 棚橋靖行, 山田真久, Wess Jergen, 小森成一, 海野年弘. M2 ムスカリン受容体サブタイプを介したバソプレシンの分泌調節機構. 第157回日本獣医学会学術集会. 2014年9月6日~8日, 北海道大学高等教育推進機構 (北

海道・札幌市).

鈴木香澄, 松山 勇人, 永野宏, 棚橋靖行, 北澤多喜雄, 山田真久, Wess Jergen, 小森成一, 海野年弘. マウス結腸輪走筋におけるコリン作動性神経 平滑筋間の情報伝達を仲介するムスカリン受容体サブタイプ. 第157回日本獣医学会学術集会. 2014年9月6日~8日, 北海道大学高等教育推進機構 (北海道・札幌市).

[図書](計 1 件)

Kitazawa, T., Teraoka, H., Harada, N., Ochi, K., Nakamura, T., Asakawa, K., Kanegae, S., Yaosaka, N., Unno, T., Komori, S., Yamada, M.: Regulation of Heart Contractility by M2 and M3 Muscarinic Receptors: Functional Studies Using Muscarinic Receptor Knockout Mouse. In *Neuromethods 107, Muscarinic Receptor: From Structure to Animal Model*, Jaromir and Myslivecek Jan Jakubik eds. Humana Press, New York, pp.235-259, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

齋藤 正一郎 (SAITOH, Shouichirou)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 60325371
酒井 洋樹 (SAKAI, Hiroki)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 40283288
松山 勇人 (MATSUYAMA, Hayato)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 80345800

(3) 連携研究者

飯野 哲 (IINO, Satoshi)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 40242854

(4) 研究協力者

棚橋 靖行 (TANAHASHI, Yasuyuki)
京都産業大学・総合生命科学部・准教授
内藤 清惟 (NAITO, Kiyotada)
岐阜大学大学院連合獣医学研究科・基礎獣医学講座
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)
岐阜大学大学院連合獣医学研究科・病態獣医学講座

アロム フィロジ (ALOM, Froj)
岐阜大学大学院連合獣医学研究科・病態獣
医学講座

鈴木 香澄 (SUZUKI Kasumi)

岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

佐久間 絵光 (SAKUMA Emi)

岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

池田 知実 (IKEDA Tomomi)

岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

宮川 真澄 (MIYAKAWA Masumi)

岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

伊藤 惇 (ITO Atsushi)

岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

和田 喜明 (WADA Yoshiaki)

岐阜大学・応用生物科学部・学部学生