

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07765

研究課題名(和文)大腸におけるATP, NOおよびSP放出神経に対するムスカリン性制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of muscarinic receptor subtypes in regulatory mechanism on ATP, NO and SP releasing nerves in the large intestine

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：M1～M5のムスカリン受容体サブタイプのうち、M2およびM3受容体は蠕動の最終反応を担う平滑筋細胞ばかりでなく、腸神経細胞にも局在している。本研究では、大腸における蠕動の誘発・調節メカニズムの全容を解明する一環として、各サブタイプの欠損マウスを用いて腸神経におけるM2およびM3受容体の役割・機能を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、M2およびM3受容体の両方がATP放出神経を促進的に制御しているという結果を得た。加えて、M2受容体を介する収縮はM3受容体を介する収縮よりも大きいという結果だけでなく、両受容体を介する収縮経路には新たな情報伝達分子が関わっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Among M1 to M5 muscarinic receptor subtypes, M2 and M3 receptors are located to not only a smooth muscle cell but also various enteric nerve cells. In this study, to make clear the mechanisms of peristalsis of the large intestine, we have investigated the role of M2 and M3 receptors on the enteric nerves, using muscarinic receptor subtypes knockout mice. In consequence of the study, both M2 and M3 receptor subtypes enhanced the ATP-mediated neuromuscular transmissions in the smooth muscle cells in the large intestine. In addition, M2 receptor-mediated contraction was larger than M3-mediated one. Furthermore, it is also expected that novel signaling molecules may be involved in the both M2 and M3 receptor-mediated contractions in the large intestine.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：神経 ムスカリン受容体 内臓平滑筋

1. 研究開始当初の背景

腸蠕動については、誘発機序や生理・病態機構が国の内外や人医・獣医領域を問わず活発に研究されている。蠕動運動は腸壁内の神経反射に起因しており、腸壁-感覚神経間、感覚神経-運動神経間、運動神経-平滑筋間での情報伝達が順次活性化され、最終的に平滑筋に収縮波を誘起する。最近の研究では、運動神経-平滑筋間の過程にカハール間質細胞 (ICC) が介在しており、運動神経から放出された伝達物質が同細胞に作用した後、細胞間の電気的なカップリングを介して平滑筋へ伝わる様式も明らかにされている。これらの情報伝達過程において、ムスカリン受容体は、末梢において蠕動の最終反応を担う平滑筋細胞ばかりでなく、各種運動神経の細胞体および神経終末部にも存在して一酸化窒素 (NO)、ATP、サブスタンス P (SP) などの放出を促進性、あるいは抑制性に制御している。しかし、各種神経伝達物質の放出制御を担うサブタイプの役割については、一部を除いて明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者は、腸蠕動の発現・調節メカニズムの解明を主柱として研究を展開している。その研究の一環として、運動神経から平滑筋への情報伝達には ACh, ATP, 一酸化窒素 (NO), SP が関与しており、これらの伝達物質は平滑筋に作用する一方、他の神経細胞に作用してその伝達物質の放出を制御する様式を明らかにしてきた (引用文献①、③、④、⑤、⑥参照)。このうち、ACh および NO の放出については、5つのムスカリン受容体サブタイプがどのように制御しているのかについて、他のグループから報告が出されている。しかし、各グループの研究で得られた結論には矛盾も報告されており、各ムスカリン受容体サブタイプの詳細な役割は解明されていない。また、SP 放出神経および ATP 放出神経からの伝達物質放出が5つのサブタイプによりどのように調節されているのかについて研究された報告は今のところない。

これまでの研究の問題点として、各サブタイプに対して比較的選択性の高い薬物を使用することによりサブタイプを同定する手法が取られていた点が挙げられる。すなわち、現在利用できる作動薬および拮抗薬は完全に各サブタイプを弁別することができないため、正確なサブタイプの同定が困難となっている。この問題を解決するために、申請者の研究グループはムスカリン受容体サブタイプを欠損した (KO) マウスを用いて、腸蠕動や平滑筋細胞における役割を明らかにする研究を続けている。KO マウスを用いて得られた結果は、従来の薬物を用いる方法で得られた結果と比較して格段に信憑性が高い。そこで、本研究では、これまでの研究成果を発展させるべく、運動神経-平滑筋間の情報伝達過程に着目し、そこでのムスカリン

受容体サブタイプの役割・機能を究明することを企画立案した。

また、運動神経から平滑筋への情報伝達について申請者は、小腸ではコリン作動性神経が非常に強く平滑筋細胞を興奮性に制御していることと、5つのムスカリン受容体サブタイプのうち、M2 と M3 が重要であることを明らかにしている。また、小腸の蠕動運動の発現にも M2 と M3 の両サブタイプが重要であり、とりわけ M2 サブタイプが規則的な蠕動運動の発現に主要な役割を果たしていることも明らかにしている (引用文献②)。これに対し、大腸では ATP および NO 放出神経が強く抑制性に平滑筋を制御しているのが特徴であり、これら神経に対するムスカリン受容体サブタイプの役割は明らかになっていない。さらに、消化管疾患の多くが大腸に好発することから、これまで我々が行ってきた小腸における研究成果を発展させ、これまで対象にしていた小腸よりも大腸を用いてムスカリン受容体を介した腸管運動の制御機構を明らかにすることが、消化管の病態機構の解明に最適であると判断した。

3. 研究の方法

腸管において、ATP 放出神経から平滑筋への情報伝達に対する各種ムスカリン受容体サブタイプ (M2 および M3) の役割・機能を解明するために、以下の①~③を検討する。①および②の実験には各サブタイプの KO マウスを用い、野生型の場合と比較する。③では野生型マウスから摘出した大腸を用いて実験を行う。

<検討項目>

- ①ATP 神経が惹起する接合部電位反応に対する、各種ムスカリン受容体サブタイプによる制御の有無。
- ②大腸の興奮性神経-筋伝達における M2 および M3 ムスカリン受容体サブタイプの役割
- ③興奮性神経-筋伝達における陽イオンチャンネルの役割。

<実験手法>

- ①: ガラス微小電極法を用いて野生型マウスから摘出した結腸の輪走筋から膜電位を記録し、各種ムスカリン受容体サブタイプ欠損マウスから記録したものと比較した。
- ②: M2 および M3 欠損型マウスから摘出した大腸の輪走筋の収縮および興奮性接合部電位 (EJP) を記録し、野生型のものと比較した。
- ③: ガラス微小電極法を用いて野生型マウスから摘出した結腸の輪走筋から膜電位を記録し、各種陽イオンチャンネル阻害薬の影響を調べた。

4. 研究成果

ムスカリン受容体の役割

- (1) 野生型マウスの大腸輪走筋において

ATP および NO 放出神経が興奮した結果誘発される抑制性接合部電位 (IJP) を記録した (図 1)。IJP は ATP 成分と NO 成分の 2 つから構成されていた。

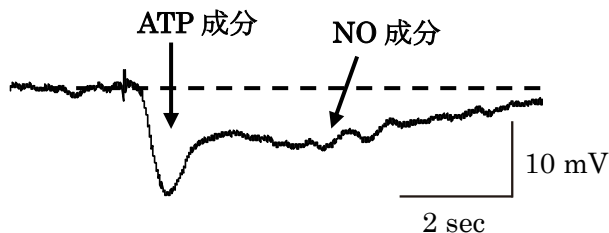


図 1 野生型マウスの大腸輪走筋から記録された IJP (破線は静止膜電位)

(2) ATP および NO 放出神経における M2 受容体および M3 受容体サブタイプの役割を明らかにするために、同サブタイプ欠損マウスの IJP と野生型のものと比較した。その結果、M2 受容体、M3 受容体、両受容体欠損マウスの IJP の ATP 成分の振幅は野生型のものと比較して有意に小さかった (図 2)。この結果は M2 および M3 受容体が ATP 成分を促進性に制御していることを示唆している。

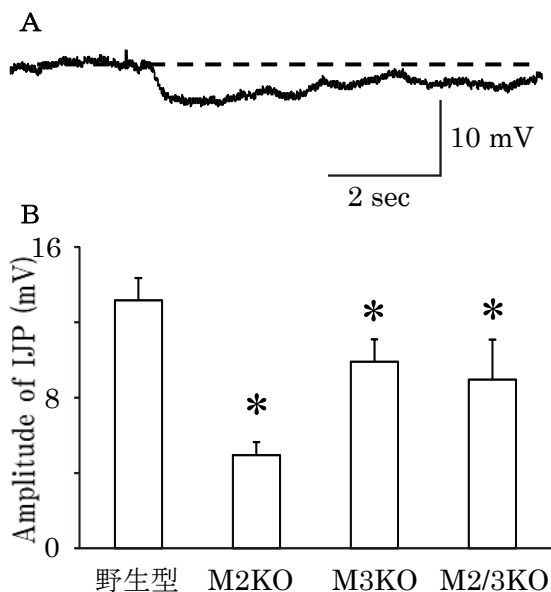


図 2 各種ムスカリン受容体サブタイプ欠損マウスの大腸輪走筋における IJP

A : M2KO の大腸輪走筋から記録された IJP。破線は静止膜電位

B : 各種ムスカリン受容体サブタイプ欠損マウスの大腸輪走筋から記録された IJP の振幅の大きさをまとめた結果 (M2KO : M2 欠損、M3KO : M3 欠損、M2/3KO : M2 および M3 両欠損マウス、*は野生型と比較して有意差があることを示す。)

(3) 図 2 の結果は、各種ムスカリン受容体を欠損したことによって興奮性接合部電位 (EJP) が大きくなったことで、IJP が抑制

された可能性がある。そこで、各種ムスカリン受容体 KO マウスから EJP を記録し、野生型のものと比較した (図 3)。抑制性神経の影響を抑えるため、guanethidine、L-NAME および MRS2500 存在下で実験を行った。その結果、野生型の標本では、EJP が記録された。M2KO の標本でも EJP が記録されたが、その振幅は野生型と比較して有意に小さかった。M3KO および M2/M3 double KO では、EJP は記録されなかった (図 3)。従って、図 2 において、M2 あるいは M3 受容体がないと IJP が抑制されたのは、ムスカリン受容体サブタイプを欠損させたことで EJP が増強された結果ではないことが明らかとなった。加えて、マウス大腸輪走筋におけるコリン作動性 EJP の発生には、M2 と M3 の両受容体が関与しているものの、M3 受容体を介した成分が優位であることを示唆している (図 3)。

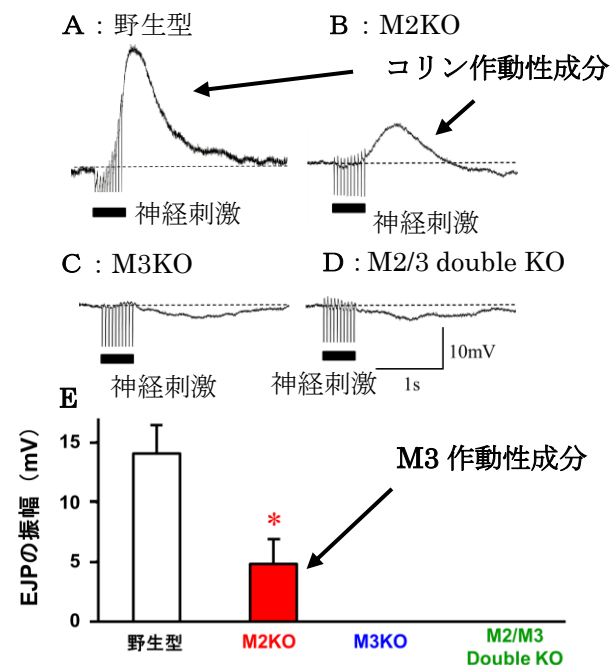


図 3 各種ムスカリン受容体欠損マウスから記録されたコリン作動性 EJP

A~D : ACh 放出神経を刺激した結果、大腸の輪走筋から記録された脱分極 (コリン作動性 EJP) の 1 例。破線は静止膜電位 E : コリン作動性 EJP の振幅の大きさをまとめた結果

(4) 平滑筋細胞では EJP による膜の脱分極によって電位依存性 Ca²⁺チャネルが活性化される。その結果、細胞外から細胞内に Ca²⁺が流入することで平滑筋は収縮する。図 3 の結果において大腸輪走筋の EJP の発生には M3 受容体を介した成分が優位であったことから、収縮も同成分の役割は大きいことが予想される。しかし、大腸輪走筋の収縮における M2 および M3 受容体の役割は不明である。そこで、各種ムスカリン受容体欠損マウスを用いて大腸輪走筋の収縮を比較した。その結果、M2 欠損マウスから記録される収縮、すなわち

M3 受容体を介する収縮よりも、M3 欠損マウスで記録される収縮すなわち M2 受容体を介する収縮の方が大きいものが記録された (図 4)。従って、EJP の結果とは異なり、収縮に占める割合は M2 受容体の方が大きいことが分かった。大腸輪走筋の収縮は M2 を介する成分が優位であったのに対して、EJP は M2 受容体だけでは発生しなかった。このことは、大腸輪走筋の収縮のうち、M2 受容体を介する経路に EJP の発生は関わっていないことを示唆している。大腸輪走筋の収縮において、M2 受容体を介する経路の詳細は今のところ不明である。M2 受容体を介する収縮機構を調べることで、新たな情報伝達経路の発見につながることを期待される。一方、大腸輪走筋の収縮の M3 受容体を介する経路には EJP の発生が含まれていることが考えられた。

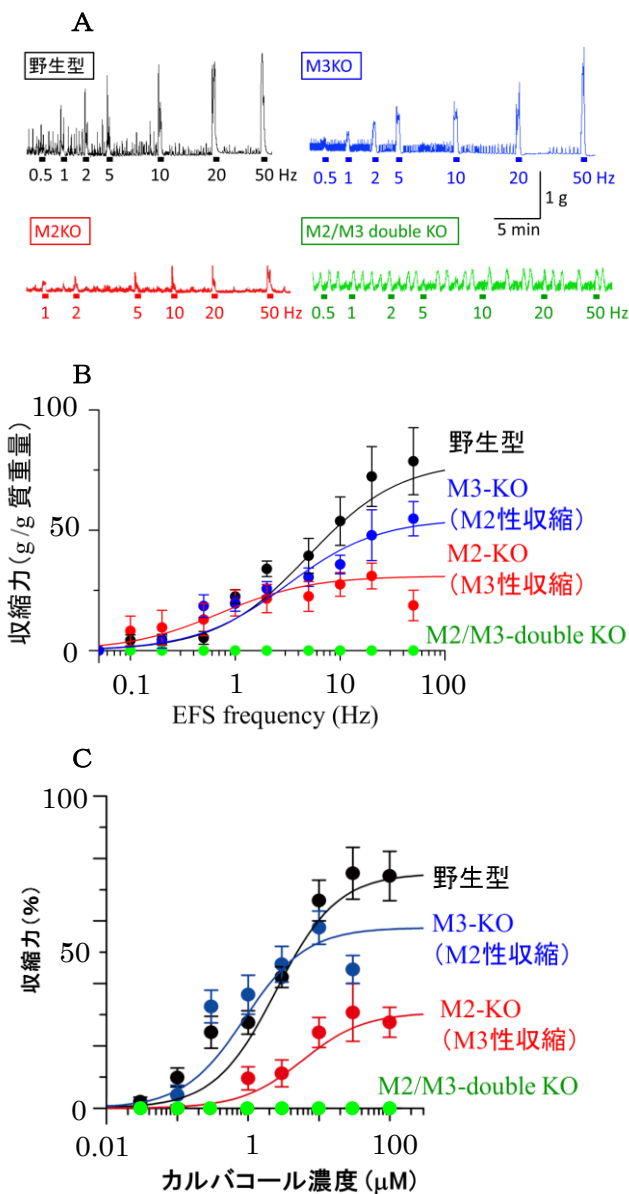


図 4 各種ムスカリン受容体サブタイプ欠損マウスの大腸輪走筋の収縮をまとめた結果

A : 神経刺激によって誘発した収縮の典型例

B : 神経刺激誘発収縮をまとめた結果
C : ムスカリン受容体刺激薬 (カルバコール) によって誘発した収縮の大きさをまとめた結果

(5) 大腸輪走筋におけるコリン作動性 EJP の発生機構が解明されれば、ムスカリン受容体を介する収縮の詳細の解明につながることになる。しかし、コリン作動性 EJP に関与している陽イオンチャンネルは不明である。これまでに、陽イオンチャンネルは SKF96365 や LOE908 といった阻害薬で抑制されるという報告 (引用文献⑦および⑧) や、EJP には NFA で抑制される Cl⁻チャンネルが関与しているという報告がある (引用文献⑨)。そこで SKF96365、LOE908、NFA の EJP に対する影響を調べた。SKF96365 は小腸から単離した平滑筋細胞において、ムスカリン受容体を活性化することで開く陽イオンチャンネル (ムスカリン受容体作動性陽イオンチャンネル) 電流を抑制することと、小腸の縦走筋における EJP の発生を強く抑制することが分かっている。しかし、SKF96365 (30 μM) は EJP を抑制しなかった (図 5)。

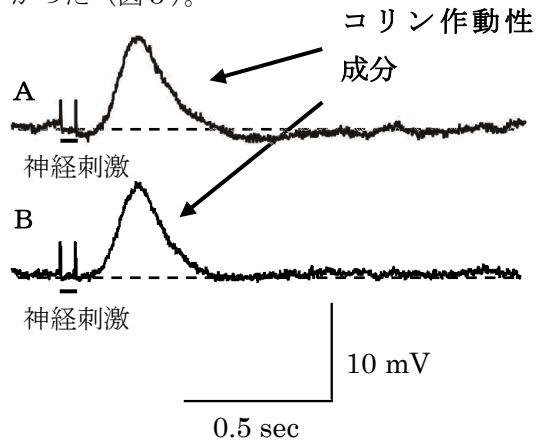
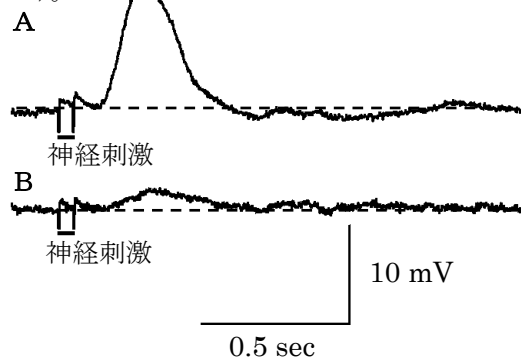


図 5 EJP に対する SKF96365 の影響

A : SKF96365 (30 μM) 投与前の EJP の 1 例
破線は静止膜電位

B : SKF96365 (30 μM) 投与後の EJP の 1 例
SKF96365 は EJP に影響を与えなかった。

LOE908 も陽イオンチャンネルを抑制することが報告されている (引用文献⑦)。そこで LOE908 (10 μM) の EJP に対する効果も検討した。その結果、EJP は有意に抑制された (図 4)。



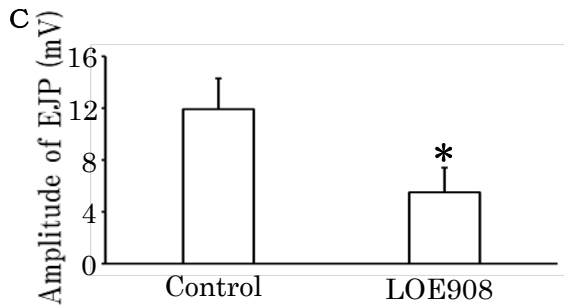


図4 EJP に対する LOE908 の影響

A : LOE908 (10 μ M) 投与前の EJP の 1 例
破線は静止膜電位

B : LOE908 (10 μ M) 投与後の EJP の 1 例

C : 振幅の大きさをまとめた結果

LOE908 (10 μ M) は EJP を有意に抑制した。

NFA も EJP を抑制することが予想されている。しかし、これらは EJP に影響を与えなかった (図5)。

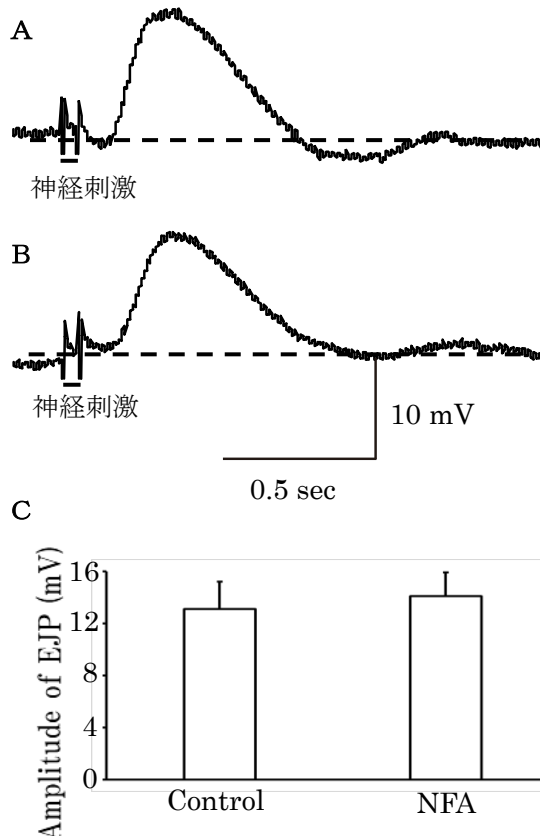


図5 EJP に対する NFA の影響

A : NFA (100 μ M) 投与前の EJP の 1 例
破線は静止膜電位

B : NFA (100 μ M) 投与後の EJP の 1 例

C : 振幅の大きさをまとめた結果

NFA (100 μ M) は EJP に影響を与えなかった。

これらの結果は、大腸輪走筋の EJP の発生に関わる陽イオンチャネルは、これまでに小腸で発見されたものとは異なることと、LOE908 に感受性のものであることを示唆している。もし、陽イオンチャネルの分子実態が明らか

となれば、ムスカリン受容体を介する収縮機構の解明がさらに進むことになる。

<引用文献>

- ① Matsuyama H, Tanahashi Y, Kitazawa T, Yamada M, Komori S, Unno T, (2013): 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.
- ② Tanahashi Y, Waki N, Unno T, Matsuyama H, Iino S, Kitazawa T, Yamada M, Komori S (2013): Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* (査読有) 25, e687-e697.
- ③ Matsuyama H, Unno T, Komori S, Takewaki T, Nitregic inhibition of tachykininergic neuro-muscular transmission via cyclic GMP in the hamster ileum (2011): *J Vet Med Sci.* (査読有) , 73, 453-458.
- ④ Matsuyama H, Nguyen, T.V., Hunne, B., Thacker, M., Needham, K., McHugh, D. and Furness, J.B (2008) Evidence that TASK1 channels contribute to the background current in AH/type II neurons of the guinea-pig intestine. *Neuroscience* (査読有) 155: 738-750.
- ⑤ Matsuyama H, El-Mahmoudy, A., Shimizu, Y. and Takewaki, T.: Nitregic prejunctional inhibition of purinergic neuromuscular transmission in the hamster proximal colon. *J. Neurophysiol.* (査読有) 89: 2346-2353, 2003.
- ⑥ Matsuyama H, Unno T, El-Mahmoudy, A.M., Komori, S., Kobayashi, H., Thapaliya, S. and Takewaki, T.: Peptidergic and nitregic inhibitory neurotransmissions in the hamster jejunum: regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience* (査読有) 110: 779-788, 2002.
- ⑦ Miwa S, Iwamuro Y, Zhang XF, Inoki T, Okamoto Y, Okazawa M, Masaki T.: Ca²⁺ entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn J Pharmacol.* 80:281-8. 1999.
- ⑧ Zholos AV, Tsytsyura YD, Philyppov IB, Shuba MF, Bolton TB., Voltage-dependent inhibition of the muscarinic cationic current in

guinea-pig ileal cells by SK&F 96365.,
Br J Pharmacol., 129: 695-702, 2000

- ⑨ Zhu MH, Sung IK, Zheng H, Sung TS, Britton FC, O'Driscoll K, Koh SD, Sanders KM., Muscarinic activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ current in interstitial cells of Cajal., J Physiol. 589:4565-4582, 2011

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Nagano Hiroshi, Sobue Yuki, Matsuyama Hayato, Saito Shoichiro, Sakai Hiroki, Alom Firoj, Tanahashi Yasuyuki, Ishii Toshiaki, Unno Toshihiro: Muscarinic M2 receptor promotes vasopressin synthesis in mice supraoptic nuclei, 査読有, Journal of Endocrinology, 237, 207-216, 2018
DOI: 10.1530/JOE-17-0630

- ② Tanahashi Yasuyuki, Wang Ban, Murakami Yuri, Unno Toshihiro, Matsuyama Hayato, Nagano Hiroshi, Komori Seiichi: Inhibitory effects of SKF96365 on the activities of K(+) channels in mouse small intestinal smooth muscle cells, 査読有, The Journal of Veterinary Medical Sciences, 78, 203-211, 2016
DOI: 10.1292/jvms.15-0346

[学会発表] (計5件)

- ① Alom Firoj, Matsuyama Hayato, Nagano Hiroshi, Tanahashi Yasuyuki, Unno Toshihiro: Possible involvement of TRPM4 channels in the cholinergic contractile responses in mouse detrusor and ileal smooth muscles., 18th World congress of basic and clinical pharmacology, 2018 (Kyoto) in press
- ② 松山 勇人, 佐久間 絵光, 永野 宏, 棚橋 靖行, 北澤 多喜雄, 海野 年弘: マウス結腸輪走筋のコリン作動性神経—平滑筋伝達におけるM2およびM3ムスカリン受容体サブタイプの役割. 第160回日本獣医学会学術集会講演要旨 509, 2017 (鹿児島).
- ③ 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講演要旨, 2016 (神奈川)
- ④ Tanahashi Yasuyuki, Wang Ban, Murakami Yuri, Matsuyama Hayato, Komori Seiichi, Unno Toshihiro: 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 (Marseille)

- ⑤ Unno Toshihiro, Suzuki Kasumi, Sakuma Emi, Nagano Hiroshi, Matsuyama Hayato, Tanahashi Yasuyuki, Komori Seiichi: Cholinergic contraction mediated via the M2 muscarinic receptor is predominant in mouse colonic circular muscles., XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms, 2016 (Marseille)

[図書] (計1件)

松山 勇人 (分担): 消化器疾患の薬物治療. 獣医臨床薬理学, 近代出版, pp. 34-48, 2017 (ISBN 978-4-87402-238-2).

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

齋藤 正一郎 (SAITO, Shoichiro)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 60325371

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

棚橋 靖行 (TANAHASHI, Yasuyuki)

鈴木 香澄 (SUZUKI, Kasumi)

伊藤 惇 (ITO, Atsushi)

佐久間 絵美 (SAKUMA, Emi)

永野 宏 (NAGANO, Hiroshi)

Alom Firoj (FIROJ, Alom)