

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590211

研究課題名（和文）

胃平滑筋における歩調とり細胞活動の電位依存性

研究課題名（英文）

Voltage-dependency of pacemaker activity in gastric smooth muscle tissues

研究代表者

鈴木 光 (SUZUKI HIKARU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80037548

研究成果の概要：

胃平滑筋は自発活動していて、その歩調とりは胃壁を構成する平滑筋組織内に分布するカハールの介在細胞（ICC）によって行われていることが近年あきらかになった。自発活動の頻度は胃の部位により異なり、体部で最も速く、幽門部に行くにしたがって遅くなる。そこで、胃平滑筋の自発活動の膜電位依存性の部位による差異について検討した。胃を構成する平滑筋の膜性質は均一ではなく、静止膜電位は噴門部で浅く（ $\sim -50\text{mV}$ ）幽門部で深い（ $\sim -70\text{mV}$ ）。また、自発活動の頻度には電位依存性があり、脱分極で速くなり過分極で遅くなるのが胃幽門部平滑筋において明らかにされている。そこで、胃各部から摘出した平滑筋組織を用いて、自発活動について調べたところ、胃のどの部位でも自発活動は見られ、さらに外液カリウム濃度を上げて膜を脱分極させると頻度は増大したので、活動頻度の部位差の一部は膜電位に依存していることがわかった。摘出した胃平滑筋の小標本作製し、2本電極法により通電を行い、細胞膜電位を一定値に揃えて自発活動の頻度を比較したところ、同じ電位においても自発活動には部位差が見られたので、膜電位以外にも興奮の頻度を規定する未知因子があることがわかった。特に、歩調とり部位といわれる胃体部における平滑筋の自発活動頻度の膜電位依存性については詳しく調べたが、他の部位と比較し特徴的な性質は見られなかった。胃体部は胃運動の歩調とり細胞といわれているICCの分布が幽門部と異なることが報告されているが、自発活動の頻度とICCの関係で特徴的な事項は認められなかった。また、自発活動発生に重要な役割をもつミトコンドリアと筋小胞体（細胞内カルシウム貯蔵部位）の関与についても調べたが、部位による自発活動頻度の差異をうまく説明できなかった。以上の実験結果から、胃平滑筋における自発活動頻度の部位差は静止膜電位の違いに加え、未知因子によって決められることがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：組織・器官生理学、平滑筋、歩調とり活動、胃運動、カハールの介在細胞、膜電位、ミトコンドリア、筋小胞体

1. 研究開始当初の背景

多くの消化管平滑筋で観られる自発活動の歩調とりは管壁の筋間神経層に分布するカハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal, ICC) で行われていることが近年あきらかになった。ICC は互いにギャップ結合を介してネットワークを形成しており、さらに周辺の平滑筋細胞ともギャップ結合していると考えられている。ICC で発生した歩調とり電位は電気緊張的にこれらの周辺細胞に伝播し、膜を脱分極させ、平滑筋の興奮・収縮をもたらす。

これまで、胃における歩調とり活動の発生部位については種々議論があったが、モルモット胃では体部が胃の中で最も活動頻度が高いので、ここに胃運動の歩調とり機構が在る十も割れる。この胃体部には筋間介在細胞 (ICC-IM) のみが分布しているので、従来から歩調とり細胞と考えられていた筋層間 ICC (ICC-MY) において考察される歩調とり電位発生の細胞内機序がそのままあてはまるかどうか不明である。

胃を構成する平滑筋の膜性質は均一ではなく、静止膜電位は噴門部で浅く (~-50mV) 幽門部で深い (~-70mV)。胃幽門部平滑筋の自発活動には電位依存性があり、脱分極で速くなり過分極で遅くなる。この自発活動の遅速が膜電位に依存したものなのか、あるいはそれ以外に自発活動を規定する因子があり、部位により異なるのか不明である。しかしながら、自発活動の部位による差異と静止膜電位の差異とは一致すると思われるので、活動頻度と膜電位との関係について調べる必要があると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では歩調とり部位といわれる胃体部における平滑筋の自発活動の頻度が膜電位によってどのように変化し、それらを制御 (あるいは規定) する因子が何であるか調べ、さらに胃の各部位における活動頻度の電位依存性の差異についても検討する。特に胃の中で最も速い興奮頻度を持つ体部平滑筋の活動発生機構は胃全体の運動の頻度を決めているので、体部における興奮頻度制御の細胞内機構についても注目しながら実験を進める。

3. 研究の方法

(1) 実験手順

主にモルモットから摘出した胃平滑筋組織

の小標本 (単一筋束、長さ 100-200 ミクロン程度) を作製し、自発活動の変化を測定する。通電などにより膜電位を変化させ、自発活動の変化を調べる。また、細胞内に蛍光色素 (fura-2 あるいは fura-3 を予定) を取り込ませ、2 波長励起により細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定する。

(2) 実験項目

①膜電位変化による自発活動の変化

二本電極法を用い、一本の電極から通電による刺激を行い膜電位を種々変化させたり、あるいは高 K 溶液を用いて細胞外 K^+ 濃度を変化させ、膜電位を種々のレベルに変化させて、各膜電位における自発活動を測定する。

②自発活動の電位依存性に及ぼす細胞内小器官の機能

細胞内 Ca^{2+} 制御機構を変化させ、膜電位変化に対する自発活動を観察する。特に小胞体の Ca^{2+} ポンプ抑制、 IP_3 を介する Ca^{2+} 遊離能阻害、ミトコンドリアにおけるプロトンポンプ抑制などにより、電位依存性がどのように変化するか観察する。

③単電位の頻度解析

胃輪走平滑筋の小標本は高い入力抵抗がある ($> 3 M\Omega$) のので、単電位の解析が可能である。膜電位を種々変化させ、単電位を記録し、その頻度解析を行う。

(3) 観察事項

得られたデータを解析し、自発活動の膜電位依存性変化、細胞内小器官の機能と自発活動の膜電位依存性との関連、単電位の解析、自発活動の温度感受性などについて検討する。

4. 研究成果

平成 19 年度には、胃運動の歩調とり部位といわれている Corpus における平滑筋の自発活動の頻度が膜電位によってどのように変化し、それらを制御 (あるいは規定) する因子が何であるか、という点について、Antrum 部位と比較しながら調べた。実験にはモルモットから摘出した胃平滑筋組織を用いた。通電あるいは外液 K 濃度を変化させることにより膜電位を変化させた。その結果、Corpus 部位では筋は 4-5 回/分で興奮しており、最も速い頻度であった。Corpus において膜を -70 mV まで過分極させると、緩電位の頻度は 2~3 回/分まで低下し、さらに過分極させると活動は停止した。一方、Antrum 部位では 1-2 回/分で興奮しており、静止電位 (およそ -70mV) から少し過

分極させても、すぐに自発活動は停止し、また膜を-60 mV 付近まで脱分極させても頻度は2~3回/分までしか上がらなかった。このように、両部位ともに自発活動の頻度には電位依存性があることがわかった。そこで、膜電位を一定値(-65mV)になるようにして、同じ膜電位における興奮頻度を比較したところ、Corpusの興奮頻度のほうがAntrum部位の頻度より速いことがわかった。そこで自発活動の頻度の部位差は膜電位の差異だけでは説明できないことがわかった。

これらの結果に基づき、平成20年度には興奮頻度の電位依存性に影響をおよぼす因子について、同じ組織(モルモット胃Corpus部位の組織)を用いて、更に検討を加えた。Antrum部位において、緩電位発生にはミトコンドリアのプロトンポンプ活性、小胞体のCa貯蔵能、プロテインキナーゼC活性、IP3などが必要であることが報告されているので、Corpus部位における自発活動に対するこれらの因子の関与について検討した。いずれの因子もCorpus部位の自発活動には必須因子であり、Antrumとの差異は見られなかった。また、胃体部は胃運動の歩調とり細胞といわれているカハールの介在細胞(ICC)の分布が幽門部と異なることが報告されているが、自発活動の頻度とICCの関係で特徴的な事項は認められなかった。

以上の結果から、本研究においてモルモット胃の自発活動についてわかったことは、以下の通りである。

(1) 胃平滑筋の自発活動には膜電位依存性があり、膜を脱分極させると頻度は上昇し、過分極させると頻度は低下した。およそ-70mV以下に過分極させると自発活動は停止した。この性質は胃のどの部位においても観られた。

(2) 自発活動の発生頻度の部位差は、一部は静止膜電位の差異に起因しており、最も興奮頻度の高いCorpus部位は静止膜電位がおよそ-60mVで、他の部位に比べ10-20mVも浅いことが原因であろうと思われた。

(3) 通電により静止電位を同じレベルにしても興奮頻度の部位差は依然として認められたので、頻度決定には電位依存性に加え未知因子が関与していると思われた。

(4) 胃平滑筋の自発活動に関与する細胞内因子(ミトコンドリアのプロトンポンプ活性、小胞体のCaポンプ、プロテインキナーゼC、IP3など)には部位差が認められなかった。

このように、胃平滑筋に自発活動の部位差を生ずる原因については、部分的にしか解明できなかった。今回用いたAntrum部位とCorpus部位とは、ICCの分布に差異があるこ

とが報告されているので、ICCの種類により活性が違うことも、こうした部位差を生ずる原因の一つになっているかもしれないと考えている。

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 7件)

- ① Hirst, G.D.S., Hashitani, H. & Suzuki, H. (2008). Cellular mechanism of the voltage-dependent change in slow potentials generated in circular smooth muscle of the guinea-pig gastric corpus. *Journal of Physiology* (London) 586 巻 5521 頁-5536 頁. (査読あり)
- ② Hashitani, H., Hayase, M. & Suzuki, H. (2008). Effects of imatinib mesylate on spontaneous electrical and mechanical activity in smooth muscle of the guinea-pig stomach. *British Journal of Pharmacology* 154 巻 451 頁-459 頁. (査読あり)
- ③ Kim, Y.C., Suzuki, H., Xu, W.X., ほか7名 (2008). Voltage-dependent Ca current identified in freshly isolated interstitial cells of Cajal (ICC) of guinea pig stomach. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 12 巻 323 頁-330 頁. (査読あり)
- ④ Domae, K., Hashitani, H. and Suzuki, H. (2008). Regional differences in the frequency of slow waves in smooth muscle of the guinea-pig stomach. *Journal of Smooth Muscle Research* 44 巻 231 頁-248 頁. (査読あり)
- ⑤ Kim, Y.C., Sim, J.H., Kang, T.M. & Suzuki, H. (2007). Sodium-activated potassium current in guinea pig gastric myocytes. *Journal of Korean Medical Sciences* 22 巻 57 頁-62 頁. (査読あり)
- ⑥ Kato, K., Kito, Y. & Suzuki, H. (2007). Mechanical and electrical responses modulated by excitation of inhibitory nerves during stimulation with high potassium solution in circular smooth muscle of the rabbit rectum. *Journal of Smooth Muscle Research* 43 巻 229 頁-246 頁. (査読あり)
- ⑦ Kito, Y. & Suzuki, H. (2007). Effects of temperature on pacemaker potentials in the mouse small intestine. *Pflugers Archiv* 454 巻 263 頁-275 頁. (査読あり)

[学会発表] (計 9件)

- ① 鈴木光・Hirst, G. D. S.・橋谷光 . モルモット胃体部輪走平滑筋における自発活動の電位依存性, 日本平滑筋学会第51回総会, 平成20年7月3日, ホテルニューキャッスル (弘前市)
- ② 鬼頭佳彦・鈴木光. ラット胃噴門部における単電位発生機序について, 日本平滑筋学会第51回総会, 平成20年7月3日, ホテルニューキャッスル (弘前市)
- ③ 橋谷光・早瀬麻沙・郡健二郎・鈴木光. マウス膀胱平滑筋の自発活動制御における K-channel の役割日本平滑筋学会第51回総会, 平成20年7月3日, ホテルニューキャッスル (弘前市)
- ④ Kito, Y. & Suzuki, H. Effects of K-channel blockers on spontaneous activity of the mouse small intestine. 日本生理学会第85回大会, 平成20年3月25-27日, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑤ Hashitani, H., Lang, R. J. & Suzuki, H. Role of ATP-sensitive K-channels in sensory nerve-mediated regulation of spontaneous activity in the mouse renal pelvis. 日本生理学会第85回大会, 平成20年3月25-27日, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑥ 早瀬麻沙, 鬼頭佳彦, 橋谷光, 鈴木光 . モルモット胃輪走平滑筋における自発活動の部位による差異, 中部の本生理学会第54回大会, 平成19年10月19-20日, 三重大学 (津市)
- ⑦ Suzuki, H. Regional differences in the property of ICC in the guinea-pig stomach. 5th International Symposium on ICC, 平成19年8月21日, Monaghan (Ireland)
- ⑧ 早瀬麻沙, 橋谷光, 矢内良昌, 窪田泰江, 小島祥敬, 佐々木昌一, 郡健二郎, 鈴木光 . クエン酸アルベリンのモルモット膀胱平滑筋への作用, 日本平滑筋学会第49回総会, 平成19年7月4-6日, 榎原ロイヤルホテル (榎原市)
- ⑨ 鈴木光 . モルモット胃平滑筋の歩調とり活動の性質について, シンポジウム「ユビキタスペースメーカー」, 日本平滑筋学会第49回総会, 平成19年7月4-6日, 榎原ロイヤルホテル (榎原市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 光 (SUZUKI HIKARU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 80037548

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

橋谷 光 (HASHITANI HIKARU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 10315905

鬼頭 佳彦 (KITO YOSHIHIKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 60381787