

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07093

研究課題名(和文) 平滑筋に発現する機械刺激受容チャネルPiezo1の大腸運動調節における役割

研究課題名(英文) Roles of Piezo1 channels expressed on smooth muscle for regulation of colonic motility

研究代表者

棚橋 靖行 (Tanahashi, Yasuyuki)

京都産業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60582418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：消化管平滑筋の収縮は、内容物による筋組織の伸展により変化することが知られている。この反応は、機械刺激感受性イオンチャネルにより仲介されることが示唆されている。本研究は、機械刺激感受性陽イオンチャネルPiezo1に着目し、同チャネルの大腸運動調節における役割を明らかにすることを目的として行った。その結果、平滑筋に発現するPiezo1チャネルが大腸平滑筋の収縮を興奮性に制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸平滑筋の収縮調節におけるPiezo1チャネルの役割を明らかにした本研究の成果は、未解明な点が多く残されている腸管運動制御メカニズムの全容を解明するうえで、重要な情報となる。Piezo1チャネルの機能不全は、過敏性腸症候群などの消化管運動障害につながることを予想される。それ故、本研究の成果は、消化管運動障害におけるPiezo1チャネルの関与やPiezo1チャネルをターゲットとした治療薬の開発に向けた将来的な研究の実施に向けても、基盤的な情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The contractility of smooth muscle changes in response to mechanical stretching caused by luminal contents in the gastrointestinal tract, mediated by mechanosensitive ion channels. In this study, we aimed to elucidate the roles of Piezo1 channels, which have been identified as a new class of mechanosensitive nonselective cationic channels, in regulation of colonic motility. Our results suggest that Piezo1 channels expressed on smooth muscle cells contribute to the excitatory regulation of colonic smooth muscle contractions.

研究分野：薬理学

キーワード：Piezo1チャネル 機械刺激感受性イオンチャネル 大腸運動 平滑筋細胞 Ca²⁺

1. 研究開始当初の背景

腸管平滑筋の収縮は管壁に存在する内在性神経により調節されている[1]。我々は、平滑筋の収縮制御に特に重要とされるコリン作動性神経による平滑筋収縮調節機構に着目してこれまで研究を行ってきた[2]。コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンが平滑筋細胞に発現するムスカリン受容体を刺激すると、細胞膜上の各種イオンチャネルの開閉活性が変化する。その結果、「膜の脱分極→活動電位の放電(細胞の興奮)→Ca²⁺の細胞内流入→筋の収縮」といった一連の興奮収縮連関システムが作動する。平滑筋の収縮は、このような内在性神経による調節を受けるだけでなく、筋細胞が伸展されることによっても変化することが知られている。この伸展刺激を受容するセンサーとして働くのが機械刺激感受性イオンチャネルである。平滑筋細胞には古くから、Ca²⁺を含む陽イオンを透過する機械刺激感受性チャネルの発現が示唆されている[3,4]。しかしながら、未だにこのチャネルの分子実体が特定されていないため、腸管運動調節における生理学的な役割とその調節メカニズムについては明らかにされていない。

2010年にCosteら[5]により機械刺激感受性チャネルとして新しくPiezo1チャネルが同定された。Piezo1チャネルはCa²⁺透過性を有する非選択的陽イオンチャネルであることから、我々は、このPiezo1チャネルこそが腸管平滑筋の機械刺激感受性陽イオンチャネルではないかと考えた。そこで、平滑筋細胞に発現するPiezo1チャネルの大腸運動調節における役割を明らかにし、腸管運動制御メカニズムの全容解明につなげることを目的として本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、腸管運動調節の全容解明に向けて、機械刺激感受性陽イオンチャネルPiezo1に着目し、大腸におけるPiezo1チャネルの発現、大腸運動調節におけるPiezo1チャネルの役割およびその調節メカニズムについて明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 大腸におけるPiezo1チャネルの発現

- ① mRNA発現: ddY系統マウスの結腸組織からRNAを抽出し、マウスPiezo1に対するプライマーを用いてRT-PCRを行った。
- ② タンパク質発現: ddY系統またはtdTomatoとPiezo1の融合タンパク質を発現する*Piezo1^{PI-tdT}*系統マウス(Stock # 029214, The Jaxon Laboratories)の結腸から平滑筋細胞を単離し、Piezo1抗体またはtd-Tomato抗体を用いて免疫蛍光染色をそれぞれ行った。
- ③ イオンチャネルとしての機能的発現: ddY系統マウスから単離した結腸平滑筋細胞標本において、Piezo1チャネルの選択的作動薬であるYoda1[6]を適用した時の電流反応をホールセルパッチクランプ法により測定した。

(2) 大腸運動調節におけるPiezo1チャネルの役割とその調節メカニズム

- ① 大腸輸送能の測定: ddY系統マウスの結腸内に、プラスチック製ビーズを肛門から挿入し、ビーズが体外に排出されるまでの時間を指標として大腸輸送能を測定した。Piezo1チャネル阻害薬(GsMTx-4)[7]またはPiezo1チャネル選択的作動薬であるYoda1[6]をマウスにそれぞれ投与した時の大腸輸送能の変化について検討した。
- ② 結腸平滑筋標本における張力測定: ddY系統マウスから近位結腸標本作製し、縦走筋または輪走筋方向に発生する張力をマグヌス法により等尺性に測定した。GsMTx-4またはYoda1を標本に適用した時の張力変化を記録した。なお、内在性神経の刺激は経壁電気刺激により行った。

4. 研究成果

(1) 大腸組織におけるPiezo1チャネルの発現:

粘膜を除去したddYマウスの結腸組織標本において、Piezo1のmRNA発現が検出された。また、ddYマウスの結腸から単離した平滑筋細胞標本において、Piezo1に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、平滑筋細胞はPiezo1抗体に対して陽性反応を示した。さらに、*Piezo1^{PI-tdT}*系統マウスの結腸平滑筋細胞標本において、tdTomatoに対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、平滑筋細胞はtdTomato抗体に対して陽性反応を示した。ddYマウスの結腸平滑筋細胞標本において、保持電位を-60 mVに固定した条件にてPiezo1作動薬であるYoda1を適用したところ、内向き電流が発生した。これらの結果は平滑筋細胞においてPiezo1チャネルが発現することを示唆している。また、*Piezo1^{PI-tdT}*系統マウスの結腸から単離培養した内在性神経細胞においてもtdTomato抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、一部の内在性神経細胞もPiezo1タンパク質を発現することが示唆された。

(2) 大腸運動調節における Piezo1 チャンネルの役割：

ddY マウスに Piezo1 チャンネル阻害薬である GsMTx-4 を投与すると、大腸輸送能が低下したのに対し、Piezo1 チャンネル作動薬である Yoda1 を投与した場合には、大腸輸送能は亢進した。

(3) 大腸平滑筋収縮調節における Piezo1 チャンネルの役割：

ddY マウスから作製した近位結腸標本において、Piezo1 チャンネル阻害薬である GsMTx-4 を標本に適用すると、縦走筋、輪走筋ともに自発収縮が抑制された。一方、Piezo1 チャンネル作動薬である Yoda1 を標本に適用すると、両平滑筋ともに収縮反応が生じた (右図)。

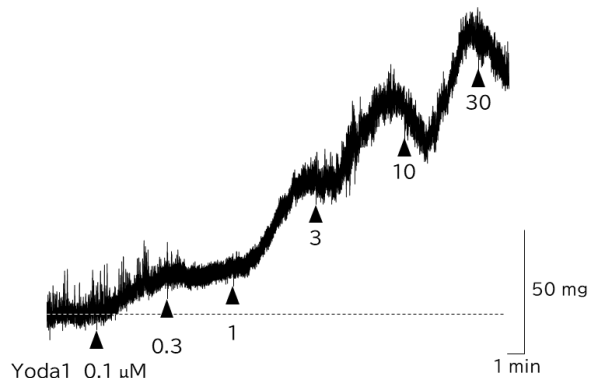


図 マウス結腸輪走筋における Yoda1 誘発性収縮反応

(2) および (3) より、大腸平滑筋の収縮調節において、Piezo1 チャンネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4) Piezo1 チャンネルを介した大腸平滑筋収縮調節メカニズム：

① 内在性神経の関与：

消化管平滑筋の収縮は内在性神経により制御されている [1]。(1) において記述したように、マウス結腸の一部の内在性神経細胞も Piezo1 タンパク質を発現することが示唆された。そこで、内在性神経-平滑筋伝達における Piezo1 チャンネルの役割について検討した。ddY マウスから作製した近位結腸標本において、経壁電気刺激により誘発された収縮反応のうち、コリン作動性神経を介した収縮成分は、縦走筋、輪走筋ともに、GsMTx-4 による影響をほとんど受けなかった。一方、非コリン作動性神経を介した収縮成分については、GsMTx-4 の処置により、縦走筋では反応の持続時間が短縮し、輪走筋では反応の最大振幅が減少した。これらの結果は、非コリン作動性神経-平滑筋伝達において Piezo1 チャンネルが一部関与している可能性を示唆している。一方、Yoda1 誘発性収縮反応については、縦走筋、輪走筋ともに、神経伝導遮断薬 tetrodotoxin を標本に前処置しても抑制されなかった。この結果は、マウス結腸において、内在性神経に依存しない Piezo1 チャンネルによる収縮調節機構も存在することを示唆している。

② カハール間質細胞 (ICC) の関与：

消化管には ICC が存在し、平滑筋収縮の歩調取りを司るだけではなく、神経-筋伝達も仲介することが知られている。ICC の電氣的興奮性制御には、Ca²⁺活性化 Cl⁻チャンネル Ano1 が重要な役割を果たしている [8]。それ故、ICC において Piezo1 チャンネルを介した Ca²⁺流入が ANO1 チャンネルを開口させて、間接的に平滑筋の収縮を制御している可能性が考えられた。しかしながら、ANO1 の選択的阻害薬である Ani9 をマウス結腸標本に前処置した条件においても、縦走筋、輪走筋ともに、Yoda1 誘発性収縮反応は変わらず発生した。この結果は、Piezo1 チャンネルを介した結腸平滑筋収縮調節には、ICC は必須ではないことを示唆している。しかしながら、Ano1 チャンネルの開口とは別のメカニズムにより、ICC に発現する Piezo1 チャンネルが平滑筋収縮を制御している可能性は排除できない。この点については、今後、ICC 特異的 Piezo1 チャンネル欠損マウスを用いるなどして、慎重に検討する必要がある。

以上の結果を総合すると、マウス結腸において、平滑筋細胞に発現する Piezo1 チャンネルが筋の収縮調節において重要な役割を担っていると考えられる。当初計画していた、平滑筋特異的 Piezo1 チャンネル欠損マウスを用いた実験については、マウスの作製には至ったものの、検討すべき課題点がいくつか残っており、本格的な実験の実施にまで至らなかった。今後、残されている課題点を解決したうえで、同欠損マウスを用いて、「平滑筋細胞の Piezo1 チャンネルを介した筋収縮調節機構」の存在を示す更なる証拠を得たいと考えている。

③ Piezo1 チャンネルより下流の収縮調節メカニズム：

Yoda1 誘発性収縮反応に対する各種 Ca²⁺チャンネルおよび Ca²⁺トランスポーターに対する阻害薬の効果を検討した。その結果、結腸輪走筋においては、Na⁺/Ca²⁺ exchanger のリバースモードを介して流入する Ca²⁺が、一方、縦走筋においては、ストア作動性 Ca²⁺チャンネル Orai を介して流入する Ca²⁺が、Piezo1 チャンネルの下流シグナルとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

<引用文献>

1. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.*, **72**: 143-164, 2004. doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.12.004.
2. Tanahashi Y, Komori S, Matsuyama H, Kitazawa T, and Unno T. Functions of Muscarinic Receptor Subtypes in Gastrointestinal Smooth Muscle: A Review of Studies with Receptor-Knockout Mice. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(2)**, pp.926. 2021. doi: 10.3390/ijms22020926.
3. Kirber MT, Walsh JV Jr, Singer JJ. Stretch-activated ion channels in smooth muscle: a mechanism for the initiation of stretch-induced contraction. *Pflügers archiv: European Journal of Physiology* **412**: 339-345, 1988. doi: 10.1007/bf01907549.
4. Zou H, Lifshitz LM, Tuft RA, Fogarty KE, Singer JJ. Visualization of Ca²⁺ entry through single stretch-activated cation channels. *PNAS*, **99**:6404-6409, 2002. doi: 10.1073/pnas.092 654999
5. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* **330**: 55-60, 2010. doi: 10.1126/science.1193270.
6. Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, Matzen J, Lao J, Tully DC, Engels IH, Petrassi HM, Schumacher AM, Montal M, Bandell M, Patapoutian A. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *eLife*, 07369, 2015. doi:10.7554/eLife.07369.
7. Bae C, Sachs F, Gottlieb PA. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. *Biochemistry*, **50**: 6295-6300, 2011. doi: 10.1021/bi200770q.
8. Sanders KM, Ward SM, Koh SD. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiol. Rev.*, **94(3)**:859-907, 2014. doi: 10.1152/physrev.00037.2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanahashi Yasuyuki, Komori Seiichi, Matsuyama Hayato, Kitazawa Takio, Unno Toshihiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Functions of Muscarinic Receptor Subtypes in Gastrointestinal Smooth Muscle: A Review of Studies with Receptor-Knockout Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22020926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Pimpjong Kiattisak, Taichi Mizutani, Hayato Matsuyama, Yasuyuki Tanahashi, Toshihiro Unno
2. 発表標題 Possible involvement of transient receptor potential melastatin 4 channels in the adrenergic contraction in mouse prostate smooth muscles
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都産業大学生命科学部教員紹介 https://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/1s/tanahashi-yasuyuki.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ビーチ デイビッド (Beech David)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Leeds			