

Y-01 モルモット胃ペースメーカー領域の同定

名古屋市立大学医学部研究科細胞生理学分野

○谷口 葉子, 三井 烈, 橋谷 光

胃蠕動は体部から始まり幽門部へ進行する。モルモット胃幽門部では、筋層間 ICC (ICC-MY) が発生するペースメーカー電位が筋層内 ICC (ICC-IM) により増幅されてスローウェーブが形成される。一方 ICC-MY が存在しない胃体部では、ICC-IM からスローウェーブが発生する。胃体部と幽門部が連続した状態ではスローウェーブの発生頻度は両部位で同じであるが、切り離すと幽門部では頻度が低下するが胃体部では変化しないことから、胃体部は優位なペースメーカー領域と考えられる。胃体部内におけるスローウェーブの起始部の同定を試みた。

加温 Krebs 液内でモルモット摘出胃の蠕動を観察、肉眼で確認した蠕動開始部から胃底部側に約 1 cm の部位から標本を作成し（予備実験で肉眼的な収縮輪起始部からは幽門部スローウェーブが記録された）、細胞内電位記録法により膜電位変化を記録した。Caffeine (1 mM) により胃体部輪走筋スローウェーブは消失するが、全層筋標本のスローウェーブは頻度、振幅とも抑制されたが消失しなかった。Caffeine の細胞内作用機序として cAMP 分解阻害、過分極が考えられるが、cAMP 増加作用を有する薬物 (8Br-cAMP, forskolin, cilostamide, CGRP) は caffeine と同様の抑制を示したのに対し、levcromakalim は過分極を生じたがスローウェーブを抑制しなかった。胃体部縦走筋からは輪走筋とは異なり、立ち上がりが速くブラト層を形成するスローウェーブが記録された。

Kit 抗体による免疫染色では、標本の大部分の領域で輪走筋および縦走筋内 ICC-IM のみが観察され、全層では格子状蛍光パターンを示した。ある限局した部位には筋間から縦走筋方向に立体的に複数の突起を伸ばす特殊な ICC を認められ、縦走筋スローウェーブおよびスローウェーブ起始部との関係が示唆された。

Y-02 Microelectrode array analysis of gut pacemaker activity in the mice lacking IL-10.

¹Department of Cell Physiology and ²Department of Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

○Habibul B. Shozib¹, Haruhiko Suzuki², & Shinsuke Nakayama¹

ICC act as pacemaker cells to generate basic electric rhythms for gut motility. ICC serve as an interface between the enteric nervous systems and smooth muscle. Interleukin-10 (IL-10) is known to suppress gut immunity by antagonizing interferon- γ . IL-10^{-/-} mice therefore suffer from chronic inflammatory bowel disease (IBD). We hypothesize that basal electric activity including ICC may be accelerated in IL-10^{-/-} mice, thus examined spatiotemporal electrical activity compared with wild-type (WT) mice (C57BL/6J). We employed a microelectrode array (MEA) to measure spontaneous electric activity in ileal musculatures of both WT and IL-10^{-/-} mice. 1 μ M Nifedipine and 250nM TTX were applied in modified Krebs solution to predominantly measure ICC electric activity. Spontaneous electric activity was synchronized throughout the recording \sim 1 mm² area in WT mice, while unsynchronized electric activity was frequently observed in IL-10^{-/-} mice. The peak value of cross-correlation was significantly lower in IL-10^{-/-} mice than WT mice (Mean \pm SD: 0.63 \pm 0.14, $n=9$ vs 0.77 \pm 0.06, $n=9$; $P<0.01$). The spectral power in the frequency range between 9.4 to 27.0 cpm ($Pw_{9.4-27.0}$) was estimated in all 64 channels. $Pw_{9.4-27.0}$ was larger in IL-10^{-/-} mice than in WT mice (0.014 \pm 0.024 vs 0.007 \pm 0.015 mV²; $P=0.48$). The frequency of oscillation estimated from auto-correlation was significantly higher in IL-10^{-/-} mice than in WT mice (20.47 \pm 3.50 vs 14.96 \pm 1.46 cpm; $P<0.01$). These results suggest that unorganized hyper gut activity may contribute to the etiology of IBD. In further investigation molecular gene expression of ICC is necessary to unveil its significance in IBD.

Y-03 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger による消化管運動の調節

¹大阪府大・院・生命環境・獣医・応用薬理, ²福岡大・医・薬理, ³大阪大・院・医・循環器内科

○東 泰孝¹, 西山 和宏¹, 喜多 紗斗美², 小室 一成³, 中嶋 秀満¹, 岩本 隆宏², 竹内 正吉¹

【目的】 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) は細胞膜を隔てた Na^+ の濃度勾配および膜電位に依存して Ca^{2+} を輸送するトランスポーターである。近年、神経細胞および平滑筋細胞における NCX の重要性が明らかにされつつある。しかしながら、消化管運動における NCX の役割あるいは関与の可能性については全く不明である。したがって、本研究では消化管運動における NCX の役割解明を目的として NCX 遺伝子欠損マウスを用いて実験を行った。

【方法】 野生型 (WT), NCX1 heterozygous (NCX1 HET), および NCX2 heterozygous (NCX2 HET) の各マウスを用いた。WT および各 NCX HET マウスから遠位結腸標本を作製し、マグヌス法により経壁電気刺激 (EFS) による反応を縦走筋方向に等張性に記録した。各標本から放出される ACh 量を HPLC により定量した。

【結果】 免疫染色により遠位結腸において、NCX1 および NCX2 はいずれも平滑筋および筋層間神経叢の神経細胞に存在することを見出した。次に、WT 標本では EFS 開始直後から終了まで持続する弛緩が認められ、EFS 後に収縮が認められた。NCX2 HET 標本では、EFS による弛緩反応は WT 標本と比べて有意に増大した。しかしながら、NCX1 HET 標本の弛緩反応は WT 標本と同程度であった。一方、EFS 後に生じる収縮反応および静止張力については各群において明確な差異は認められなかった。続いて、Atropine と guanethidine を処置した NANC 条件下では、NCX2 HET 標本における EFS による弛緩反応は、WT 標本と同程度であった。腸神経からの ACh 放出量を比較したところ、NCX2 HET 標本からの EFS による ACh 放出量は WT 標本と比べて有意に減少した。

【考察】 以上の結果より、マウス遠位結腸において腸神経からの ACh 遊離を NCX2 が調節することにより運動制御に関与する可能性が示唆された。

Y-04 若年アカラシア患者の病態と手術成績の検討

¹東京慈恵会医科大学外科学講座消化管外科, ²同外科学講座

○坪井 一人¹, 小村 伸朗¹, 矢野 文章¹, 星野 真人¹, 山本 世怜¹, 柏木 秀幸², 矢永 勝彦²

【背景】 アカラシアは発生年齢のピークが 30~60 歳とされる稀な一次性食道運動機能障害の代表的疾患である。有効な治療としてバルーン拡張術と外科治療があるが、若年患者数が多くないため、その病態と治療効果については明らかでない。

【目的】 若年アカラシア患者の病態と腹腔鏡下 Heller-Dor 手術 (LHD) の手術成績を検討した。

【対象と方法】 1994 年 8 月から 2011 年 11 月までに LHD を施行した 30 歳未満の 63 例 (男性 30 例, 平均年齢 25.1 ± 3.9 歳) を対象とし、同時期に手術を行なった 30 歳以上の 290 例 (男性 153 例, 平均年齢 48.3 ± 12.5 歳) と比較検討した。評価項目は術前病態, 術前症状スコア, 手術成績, および術後経過と術後症状スコアとした。術前と術後につかえ感, 胸痛, 嘔吐, 胸焼けに関してアンケートを実施し, 手術の満足度についても調査した。

【結果】 若年者は有意に低 BMI で病悩期間が短く (各 $p < 0.001$, $p < 0.001$), 拡張型で進行度は軽度であった ($p = 0.011$)。症状は胸痛の頻度, 程度ともに若年者で有意に高度であったが, つかえ感, 嘔吐, 胸焼けには差はなかった。手術成績は, 手術時間, 術中出血量, 術中粘膜損傷や食事開始日, 術後在院日数などの術後経過に差を認めなかった。若年者では術後胸痛の頻度, 程度ともに他の年齢層に比べ有意に高値であったが (各 $p = 0.018$, $p = 0.008$), 手術における満足度に差は認めなかった。

【結論】 若年アカラシア患者の病態は他の年齢層の患者と比較して軽度であった。LHD は若年者であっても他の年齢層と同等の高い症状改善効果が得られた。

Y-05 High-resolution manometry 検査中の食道運動機能の変化について

¹東京慈恵会医科大学外科学講座消化管外科, ²同外科学講座, ³Creighton University Medical Center

○星野 真人^{1,3}, 小村 伸朗¹, 矢野 文章¹, 坪井 一人¹, 山本 世怜¹, 秋元 俊亮¹, 柏木 秀幸², 矢永 勝彦¹, Mittal Sumeet³

【背景と目的】 食道内圧検査では経鼻的にカテーテルを食道内に留置した状態で被験者に嚥下させ、その際に食道運動機能に関するさまざまなパラメータを測定する。検査中に繰り返されるなかば強制的な嚥下が食道運動機能検査の結果に影響を及ぼすのか否かについては明らかではない。そこで新しい食道運動機能検査である High-resolution manometry (HRM) を用いて、wet swallow が食道運動機能に及ぼす影響を検討した。

【対象と方法】 2008年8月から2010年8月の間に Creighton University Medical Center において Gastro-esophageal reflux disease または食道運動機能障害が疑われ HRM を施行した 122 例 (男性: 39 例, 平均年齢: 51.6 ± 14.7 歳) を対象とした。なおアカラシア, 食道狭窄, 腹部消化管手術の既往例, 5 cm 以上の食道裂孔ヘルニアを認める患者は対象から除外した。HRM は wet swallow 10 回によって評価し, 前半 5 回の wet swallow を first swallow (FS), 後半 5 回の wet swallow を last swallow (LS) と大別した。また HRM より得られた integrated relaxation pressure (IRP) mmHg, distal contractile integral (DCI) mmHg-s-cm, contractile front velocity (CFV) cm/s, transition zone (TZ) cm などの各パラメータは Chicago 分類を基に算出した。症状は HRM 施行前に質問票により, なし, 軽度, 中等度, 高度の 4 段階に回答を得て, 軽度以上を有症状とした。データは中央値と四分位範囲で表記し, Wilcoxon signed rank 検定を行い $p < 0.05$ をもって統計学的有意差ありと定義した。

【結果】 IRP, DCI, CFV, TZ の中央値はそれぞれ 12.8 mmHg, 2,405 mmHg-s-cm, 2.76 cm/s, 1.4 cm であった。各パラメータを FS と LS で比較すると, DCI は LS で低値をとり (FS: 2,626 vs. LS: 2,247, $p=0.004$), CFV は LS で高値をとった (FS: 2.70 vs. LS: 2.76, $p=0.018$)。IRP および TZ については FS と LS との間に統計学的有意差を認めなかった (順に $p=0.596$, $p=0.579$)。一方, 嚥下困難を有する患者 38 例では, DCI (FS): 3,539 vs. DCI (LS): 3,229, $p=0.009$, CFV (FS): 2.78 vs. CFV (LS): 2.82, $p=0.029$ であり, FS と比較して LS では低 DCI, 高 CFV であった。また, 嚥下困難を有さない患者は, DCI (FS): 2,172 vs. DCI (LS): 1,828, $p=0.131$, CFV (FS): 2.76 vs. CFV (LS): 2.76, $p=0.300$ であり統計学的有意差を認めなかった。

【結語】 HRM 検査中, 後半 5 回の wet swallow は前半 5 回の wet swallow と比較して, 低 DCI と高 CFV が認められており, 検査施行回数とともに食道体部の蠕動力が減弱することが示唆された。またこの傾向は嚥下困難を有する患者にも認められた。

Y-06 2 型糖尿病ラット胸部大動脈におけるインスリンシグナル障害とアンギオテンシン / プロテインチロシンホスファターゼ 1B の影響

星薬大・医薬研・機能形態

○根本 真吾, 松本 貴之, 鎌田 勝雄, 小林 恒雄

糖尿病は長期の高血糖状態に起因する代謝性疾患であり, 主な死因は血管内皮細胞の機能低下による合併症の併発である。

以前から, 糖尿病時に Angiotensin (Ang)-2, protein tyrosine phosphatase (PTP)-1B の発現および活性増強が報告されている。しかし, 2 型糖尿病時における胸部大動脈全体の機能への影響は明らかにされていない。

そこで今回我々は 2 型糖尿病モデルである Goto-Kakizaki (GK) ラット胸部大動脈における Insulin (Ins) 弛緩反応の変化と, PTP1B の関与について IRS/eNOS pathway に焦点を絞り検討を行った。

健常動物の胸部大動脈において Ins 刺激は, Tyr612-IRS1, Ser1177-p-eNOS の増加を生じた (vs 無刺激)。一方, 糖尿病群においては上記の蛋白質発現の低下, NO 産生および Ins 弛緩反応の減弱が認められた (vs 対照群)。また対照群において, Ang2 の前処置により Ins 弛緩反応の減弱, 膜分画における PTP1B 発現の増加が認められたが, 糖尿病群においては変化が認められなかった。さらに PTP1B inhibitor と Ang2 を同時処置したところ, 両群共に Ins 弛緩反応, NO 産生, 蛋白質発現が改善した。以上のことから糖尿病にみられる Ins 弛緩反応の減弱は, IRS1/eNOS/NO pathway の障害に起因しており, Ang2/PTP1B pathway の恒常的活性化により引き起こされていると考えられる。今回, PTP1B inhibitor により, PTP1B の膜移行を制御し, IRS1/eNOS の活性化が生じた可能性が示唆されたことから, 本研究は非肥満 2 型糖尿病に対する新しい治療戦略を提唱するものである。

Y-07 血管攣縮シグナル伝達における Fyn チロシンキナーゼの膜ラフトでの活性化様式の解明

¹山口大学医学部医学科 4 年生, ²山口大学大学院医学系研究科・生体機能分子制御学

○梶間 未葵¹, 加治屋 勝子², 張 影², 岸 博子², 高田 雄一², 小林 誠²

突発性の血管病である血管攣縮は、突然死の主因として恐れられている。血管攣縮は、Rho キナーゼを介した血管平滑筋収縮の Ca^{2+} 感受性亢進によって引き起こされる。この Rho キナーゼの上流の活性化経路として、我々は、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) \rightarrow Fyn チロシンキナーゼ \rightarrow Rho キナーゼ経路を同定した。本経路は、従来、血管平滑筋の Ca^{2+} 感受性亢進を誘発すると報告されていたプロテインキナーゼ C や G 蛋白質の既存の経路とは完全に独立し、また、血清および血管組織コレステロール量に依存した、血管異常収縮に特異的な病的経路であった。即ち、この病的シグナル伝達は、コレステロールが局在する細胞膜ラフトを反応の場とし、SPC の刺激により Fyn が膜ラフトに移行する事、膜ラフト上では Fyn が活性化している事、を解明したが、① Fyn が活性化の後、膜移行するのか、あるいは、② 膜移行の後、活性化するのか、Fyn 活性化の時期と詳細については不明なままであった。特に、Fyn の膜移行・活性化は、血管攣縮の阻害薬 (EPA) の作用点であり、Fyn 活性化様式の解明は今後の創薬において重要課題である。

この課題を解決するためには、他の細胞成分の影響のない状態で、Fyn と膜ラフト間の純粋な反応を解析する必要がある。そこで、本研究では、バキュロウイルス発現系を用いてリコンビナント Fyn 蛋白質 (活性型・非活性型) を精製し、一方、当研究室で独自開発した人工膜の作製法を用いて、人工ラフト膜を作製した。さらに、表面プラズモン共鳴法を用いて、Fyn 分子と膜ラフトの直接的な分子間相互作用を動力学解析した。その結果、Fyn は非活性型の状態で膜ラフトに移行し、膜ラフト上で活性化する可能性が示唆された。本研究により、血管攣縮のシグナル伝達における、Fyn の膜移行・活性化様式を解明し、特効薬を開発するための重要な知見を示すことができた。

Y-08 SERCA2a 過剰発現トランスジェニック (TG) ラットにおける膀胱機能の検討

¹奈良県立医科大学・生理学第二講座, ²奈良県立医科大学・泌尿器科学講座

○山田 篤^{1,2}, 鳥本 一匡², 松吉 ひろ子¹, 小畑 孝二¹, 松本 吉弘², 松下 千枝², 平山 暁秀², 藤本 清秀², 平尾 佳彦², 高木 都¹

【背景と目的】平滑筋収縮は細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存して起こり、平滑筋の弛緩は SERCA2 (Sarco/ Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase type 2) が、細胞内 Ca^{2+} を取り込んで起こる。本研究では SERCA2 TG ラットと WT ラットを比較し、膀胱での SERCA2 の役割の検討を目的とする。

【方法】雌 Wistar ラット計 20 匹 (TG: 10, WT: 10) を使用し、無麻酔拘束下に膀胱内圧測定を行い、排尿間隔、基線圧、排尿閾値圧、排尿時最大膀胱内圧を求めた。実験後に膀胱を摘出し、形態を調べた後、凍結標本作製し、Western blotting 法で SERCA2 の蛋白量を測定した。次に、WT, TG とともに尿道部分閉塞 (BOO) モデルを計 10 匹 (TGBOO: 5, WTBOO: 5) 作成し、同様に膀胱内圧測定を行い、SERCA2 の蛋白量を測定した。

【結果】TG ($n=10$) は膀胱内圧測定、膀胱肉眼的所見の結果より膀胱壁の肥厚が認められた膀胱壁肥厚群 TG ($n=4$) と膀胱壁非肥厚群 TG ($n=6$) に分けられた。膀胱壁肥厚群 TG は WT ($n=10$) に比べて有意に、基線圧が高く (9.5 ± 4.0 vs 4.2 ± 1.1 cmH₂O, $p < 0.05$)、排尿間隔が短かった (7.8 ± 1.8 vs 16.8 ± 3.9 min, $p < 0.014$)。この膀胱壁肥厚群 TG の SERCA2 蛋白の発現量は、膀胱壁非肥厚群 TG ($n=6$) に比べて有意に増加していた ($p < 0.05$)。WTBOO では WT と比較して有意に SERCA2 蛋白の発現量が増加していた ($p < 0.001$) が、TGBOO では WTBOO と比較して SERCA2 蛋白の発現量に変化はなかった。

【結論】膀胱においては SERCA2 を過剰発現させることにより膀胱壁の肥厚をとめない、1 回排尿量の減少、排尿回数の増加を認めた。膀胱壁の肥厚に対する SERCA2 の関与が示唆された。

Y-09 マウス眼内平滑筋の収縮調節機構の検討

旭川医科大学・生理学講座・自律機能分野

○赤尾 鉄平, 宮津 基, 竹谷 浩介, 高井 章

毛様体筋や瞳孔括約筋のムスカリン受容体刺激に伴う収縮の持続相は、他の多くの平滑筋の場合と同様、細胞外からの Ca^{2+} 流入を必要とする。われわれは、ウシ毛様体筋における実験により、この Ca^{2+} 流入が単位コンダクタンスの異なる2種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCCS と NSCCL) を介することを示すとともに、それらの分子候補としての TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 や Orai1 などの発現を確認している。しかし、ウシ材料では、遺伝子ノックダウンなどの適用が困難で、また遺伝子改変動物の利用は事実上不可能であるため、電気生理学的に検出された NSCCL/S と免疫染色により同定された TRPC や Orai-1 との関連を突止めるには至っていない。そこで、遺伝子改変マウスの導入を目指し、通常のマウスを使った予備実験を行った。

まず、そのあまりの小ささからこの分野の生理学的研究にほとんど用いられてこなかったマウス眼球の毛様体-虹彩領域において、免疫染色法により細胞内に α アクチンを含み細胞膜に M3 型ムスカリン受容体などを発現している細胞の存在と局在を証明した。また、瞳孔括約筋の輪状摘出標本においてカルバコール (CCh) が持続的収縮を発生させること、その収縮がアトロピンにより抑制されるが、ニフェディピンには感受性を示さないことを観察した。さらに、単離筋細胞において fura-2 を用いて測定される細胞内 Ca^{2+} 濃度が CCh 添加により上昇を示すこと、この応答もアトロピンにより消失、ニフェディピンには非感受性であることを確認した。これらの結果は、マウス瞳孔括約筋にもウシ毛様体筋と同様の NSCCs が存在することを示している。ウシ材料を用いて行ってきたのと同様の実験はマウス材料でも実行可能であることは明かで、遺伝子改変の NSCCS/L への影響を検討するために利用できるものと考えられる。

Y-10 ウシ毛様体筋における平滑筋ミオシンのリン酸化

旭川医科大学・医学部・生理学講座

○竹谷 浩介, 宮津 基, 赤尾 鉄平, 高井 章

【背景】 一般に平滑筋の収縮・弛緩は平滑筋ミオシンのリン酸化・脱リン酸化によって制御されていると考えられている。従って、平滑筋の収縮・弛緩調節のシグナル伝達経路を調べるためにはミオシンのリン酸化状態が重要な指標となる。しかし、これまで毛様体平滑筋に於けるミオシンのリン酸化についての報告はなされていない。

【目的】 本研究ではウシ毛様体筋に於けるミオシンのリン酸化を定量的に測定し、毛様体筋の収縮・弛緩調節機構解明のための生化学的な足がかりを得ることを目指した。

【方法】 新鮮なウシ毛様体筋切片を用いてカルバコール刺激時の等尺性張力を測定した。張力測定中の任意の点で冷却 10% TCA/acetone を用いて毛様体筋切片を急速凍結し、その時のミオシンのリン酸化状態を phos-tag SDS 電気泳動法により定量した。

【結果】 カルバコール刺激時の初期ピークとそれに引き続く持続相に於けるミオシンのリン酸化は 40-50% と高かった。驚いたことに、刺激のない基底状態と細胞外 Ca^{2+} を EGTA でキレートし完全に弛緩させた状態でもミオシンのリン酸化は高い (~40%) ままであった。また、MLCK 阻害剤である ML-7 はカルバコールによる毛様体筋収縮をほとんど阻害しなかった。これらの結果は、ウシ毛様体筋では MLCK 以外の Ca^{2+} 非依存性のキナーゼがミオシンのリン酸化に関わっている可能性を示唆している。

【結論】 ウシ毛様体筋では刺激の有無によらずミオシンのリン酸化状態が高いままに保たれており、ミオシンのリン酸化以外の収縮・弛緩制御機構が関与している可能性が強く示唆された。 Ca^{2+} 依存性の毛様体筋収縮では MLCK 以外の Ca^{2+} 依存性因子が調節に関わっており、この未解明の機構により素早い遠近調節を可能にしているのかもしれない。