

氏 名 (本籍)	河 合 光 久 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第175号
学 位 授 与 年 月 日	平成17年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	腸管内在性一次知覚神経の興奮性調節機構に関する研究 —プロテインキナーゼCの関与—
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 小 森 成 一 副査 帯広畜産大学 教 授 西 村 昌 数 副査 岩 手 大 学 教 授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教 授 小久江 栄 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 武 脇 義

論 文 の 内 容 の 要 旨

腸管の運動反射や粘膜の分泌反射をつかさどる内在性一次知覚神経細胞は、持続時間の長い過分極（遅延性後過分極）を示すことから後過分極発生ニューロン(AH 神経細胞)と呼ばれている。AH 神経細胞のシナプス前線維に低頻度の刺激を与えると、同神経細胞には脱分極と膜抵抗の増加を伴った興奮性増大（後シナプス興奮性の増大:SSPE）が起こる。AH 神経細胞の遅延性後過分極を形成するイオンチャネルは Ca 依存性 K チャネルと非選択的陽イオンチャネル (I_h チャネル) と考えられ、赤血球や培養腸間膜動脈平滑筋において、前者の活性化がプロテインキナーゼC (PKC) により調節を受けることが知られている。そこで、本研究では、モルモット回腸の AH 神経細胞の興奮性、膜電位および膜抵抗に対する PKC 活性化薬 (PDBu) の効果をシナプス前線維刺激の効果と比較・解析することにより、SSPE 現象の発現における PKC の関与の妥当性について検討した。

モルモット回腸のアウエルバッハ神経叢付縦走筋を用い、細胞内微小電極法により AH 神経細胞から膜電位を記録した。SSPE 現象は AH 神経細胞の近傍のシナプス前線維を電気刺激 (1Hz、4 分間) することにより、活動電位および遅延性後過分極は軸索を逆行性刺激 (0.1 ms、 <0.3 mA) することによりそれぞれ誘発した。後シナプス興奮性は 500 ms の脱分極パルスを記録電極から直接細胞に与え、誘発される活動電位の発火数として評価した。

シナプス前線維刺激の停止後、AH 神経細胞では脱分極と膜抵抗の増加を伴う興奮性の増大が認められた。PDBu 1-100 nM は濃度依存性に AH 神経細胞の興奮性増大、脱分極および膜抵抗の増加を起こした。興奮性の調節要因として遅延性後過分極が重要視されてい

るので、PDBu とシナプス前線維刺激による興奮性増大が同過分極の抑制に起因するか否かを調べた。その結果、どちらも遅延性後過分極を有意に抑制した。この抑制が Ca 依存性 K チャネルの不活性化によると仮定して、その不活性化が活動電位発生時の細胞内 Ca 動態の変化に起因するか否かを検討した。AH 神経細胞における持続時間の長いスパイク成分は N 型 Ca チャネルの活性化に起因するので、スパイク波形の変化から間接的に細胞内 Ca 動態に対する効果を観察した。その結果、活動電位の持続時間および再分極相一次微分値に対して、PDBu およびシナプス前線維刺激は有意な影響を与えなかった。もうひとつの発生要因である I_h チャネルの関与について検討した結果、過分極性電気緊張電位により活性化させた I_h チャネルによる電位変化を、PDBu は変化させなかった。

以上の結果は、AH 神経細胞において、PKC 活性化薬はシナプス前線維刺激の効果と薬理学的性質の類似した興奮性増大、脱分極および膜抵抗の増加を誘発することを示す。したがって、AH 神経細胞における SSPE 現象の発現に PKC が関与している可能性が高い。さらに、PKC は Ca 依存性 K チャネルをリン酸化して同チャネルの活性を抑制することにより遅延性後過分極を抑制し、その結果 SSPE 現象を誘起することも示唆する。

審 査 結 果 の 要 旨

腸管には壁内神経叢に細胞体をもつ内在性一次知覚神経 (AH 神経) が分布し、腸運動反射や粘膜の分泌反射を司っている。この神経は活動電位に続いて持続時間の長い過分極 (遅延性後過分極) を示す特徴がある。また、シナプス前線維から持続的な入力を受けると、入力停止後も長い時間にわたって脱分極パルスに対して活動電位の発火数が増える、いわゆる後シナプス興奮性の増大 (SSPE 現象) を示すことも特徴とされている。

本論文は、SSPE 現象の発現機序を解明する一環として、プロテインキナーゼ C (PKC) が発現因子として関与している可能性とその役割について検討した成績をまとめたものである。

実験は、標本としてモルモット摘出回腸から粘膜および輪走筋を剥がしたアウエルバッハ神経叢付き組織片を用い、AH 神経細胞の各種電気現象 (静止膜電位、膜抵抗、活動電位) に対する PKC 活性化薬の効果細胞内ガラス微小電極法を用いて記録し、シナプス前線維刺激 (1 Hz、4 分間) の効果と比較しながら進めている。その結果、PKC 活性化薬として用いたホルボールエステル (phorbol dibutyrate) は、シナプス前線維刺激と同様に、活動電位発火数の増加ならびに膜の脱分極と膜抵抗の増加を引き起こした。ホルボールエステルの効果は濃度依存性 (1~100nM) に増大し、10nM の効果がシナプス前線維刺激の効果と定量的にほぼ同じであった。ホルボールエステルとシナプス前線維刺激は共に遅延性後過分極を抑制した。薬理的解析により、この抑制は Ca^{2+} 依存性 K チャネルの抑制が原因であると考えられた。

これらの結果に基づいて、AH 神経細胞における SSPE 現象の発現に PKC が関与していること、そして PKC は Ca^{2+} 依存性 K チャネルを抑制することにより遅延性後過分極の減弱と膜抵抗の増大を引き起こし、その結果 SSPE 現象を誘起することを明らかにした。この研究成果は、過敏性腸症候群などの消化器疾患の発症機構の解明および治療薬の開発に有意な基礎情報を提供するものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題目 : Comparison of the effects of phorbol dibutyrate and low-frequency stimulation of synaptic inputs on the excitability of myenteric AH neurons

著者名 : Kawai, M., Nguyen, T.V., Stebbing, M.J., Clerc, N., Komori, S. and Furness, J.B.

学術雑誌名 : Pflügers Archiv (European Journal of Physiology)

巻・号・頁・発行年 : 447(3) : 298–304、2003

既発表学術論文

- 1) 題目 : GTP-binding protein involvement in membrane currents evoked by carbachol and histamine in guinea-pig ileal muscle

著者名 : Komori, S., Kawai, M., Takewaki, T. and Ohashi, H. and Bolton, T.B.

学術雑誌名 : Journal of Physiology

巻・号・頁・発行年 : 450(1) : 105–126、1992

- 2) 題目 : Oscillations of receptor-operated cationic current and internal calcium in single guinea-pig ileal smooth muscle cells

著者名 : Komori, S., Kawai, M., Pacaud, P. Ohashi, H. and Bolton, T.B.

学術雑誌名 : Pflügers Archiv (European Journal of Physiology)

巻・号・頁・発行年 : 424(5-6) : 431–438、1993

- 3) 題目 : Protein kinases expressed by interstitial cells of Cajal

著者名 : Poole, D.P., Van Nguyen, T., Kawai, M. and Furness, J.B.

学術雑誌名 : Histochemistry and Cell Biology

巻・号・頁・発行年 : 121(1) : 21–30、2004

4) 題目 : Evidence for protein kinase involvement in long-term postsynaptic
excitation of intrinsic primary afferent neurons in the intestine

著者名 : Nguyen, T.V., Stebbing, M.J., Clerc, N., Kawai, M.,
Harvey, J.R., and Furness, J.B.

学術雑誌名 : Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

巻・号・頁・発行年 : 115(1) : 1-6, 2004