

氏名(本籍)	山本正行(広島県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第273号		
学位授与年月日	平成21年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3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	Activation Mechanism and Property of Muscarinic Receptor-Operated Cation Channels in Urinary Bladder Smooth Muscle (膀胱平滑筋のムスカリン受容体作動性陽イオンチャネルの活性化機構及びその性質に関する研究)		
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	石井利明
	副査	岩手大学 教授	山本欣郎
	副査	東京農工大学 教授	下田実
	副査	岐阜大学 教授	志水泰武

論文の内容の要旨

膀胱をはじめとする内臓平滑筋は副交感神経により興奮性支配を受けている。同神経から放出されたアセチルコリンが平滑筋のムスカリン受容体を刺激すると、細胞膜の脱分極、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化、細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入、という一連の過程を経て、筋は収縮する。腸管平滑筋では、ムスカリン受容体刺激による脱分極の発生に陽イオンチャネルの活性化が関与している。しかし、膀胱平滑筋に関しては脱分極反応の発現機構が解明されていない。

本論文は、この点を追求する一環として、モルモット及びマウスの膀胱平滑筋においてムスカリン受容体刺激で活性化する陽イオン電流の検出を試み、その電流の性質と開口メカニズムについて電気生理学的手法を用いて検討した成果をまとめたものである。実験には、膀胱から単離した単一平滑筋細胞を用い、パッチクランプ法により膜電流反応を記録した。ムスカリン受容体の刺激にはカルバコール (CCh) を用いた。

1. モルモット膀胱平滑筋における陽イオン電流の検出

モルモットの膀胱平滑筋細胞に CCh (10 μ M) を適用すると、適用直後に発生する一過性電流と、その後の持続性電流から成る二相性の内向き電流が発生した。電流反応は、アトロピン (1 μ M) を処置すると消失した。また、細胞外液の Na^+ を $Tris^+$ に置換すると消失し、 Cs^+ に置換するとその振幅が大きくなった。一方、細胞内の Cl^- を $glutamate^-$ に置換しても影響を受けなかった。これらの結果より、ムスカリン受容体刺激により生じる初期の一過性とその後の持続性の内向き電流は、ともに陽イオンチャネルの活性化により発生することが示された。

2. 一過性陽イオン電流の発生メカニズム

細胞内 Ca^{2+} 濃度を 100 nM に固定した場合、EGTA (20 mM) を用いて細胞内の遊離 Ca^{2+} を低濃度 (<10 nM) にキレートした場合、あるいはタプシガルジン (1 μM) を処置して細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させた場合、いずれの場合も一過性電流は発生せず、持続性電流のみが発生した。細胞内ストアから Ca^{2+} を放出させることが知られているカフェイン (10 mM) を適用すると、CCh の場合と同様な一過性の陽イオン電流が発生した。これらの結果より、細胞内ストアから放出された Ca^{2+} が一過性陽イオン電流の重要な発生要因であることが示された。

3. 持続性電流の特徴と発生メカニズム

持続性電流の濃度-反応関係について、腸管平滑筋の陽イオン電流と比較すると、50%有効濃度及び Hill 係数には、両者の間に差は認められなかった。しかし、電流の最大振幅は腸管に比べて著しく小さかった。膀胱平滑筋における電流-電圧関係は、0 mV から -50 mV まで膜電位が過分極側へ行くに従って内向き電流の振幅が増大し、それ以降は振幅が変わらないような関係を示した。これは腸管の細胞で見られるようなU字型の電流-電圧関係とは異なっていた。持続性電流の発生中に、脱分極パルスを加えることにより電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを活性化し、細胞外から Ca^{2+} を流入させると、腸管では持続性電流が一過性に増強されたが、膀胱ではそのような効果は認められなかった。これらの結果より、膀胱と腸管では、ムスカリン受容体刺激により活性化される陽イオンチャンネルの生物物理学的性質あるいは開口メカニズムが異なる可能性が示された。

4. 陽イオンチャンネルの活性化に関わるムスカリン受容体サブタイプ

野生型マウス及び M_2 -KO マウスの膀胱平滑筋細胞に CCh (10 μM) を適用すると、モルモットの場合と同様な一過性電流が発生したが、 M_3 -KO 細胞では発生しなかった。これらの結果に一致して、野生型及び M_2 -KO 細胞では CCh の適用により、ストアからの Ca^{2+} 放出に伴う Ca^{2+} 感受性 K^+ 電流が誘発されたが、 M_3 -KO 細胞では誘発されなかった。細胞内の Ca^{2+} 濃度を 100 nM に固定した条件下で野生型マウスの細胞に CCh (10 μM) を適用すると、モルモットの場合と同様な持続性電流が発生した。しかし、 M_2 -KO 細胞および M_2/M_3 ダブル KO 細胞では CCh による電流反応はまったく検出されなかった。 M_3 -KO 細胞では、電流反応が記録されたもののその振幅は著しく小さかった。これらの結果より、野生型細胞における持続性電流の発生には、 M_2 と M_3 の両サブタイプの刺激により活性化する経路と M_2 サブタイプ単独の刺激により活性化する経路の二つが関与していることが示された。

以上の結果より、膀胱平滑筋のムスカリン受容体刺激により活性化される陽イオンチャンネルには、 Ca^{2+} により開口するタイプ (Ca^{2+} 活性化チャンネル) と、受容体に連関した情報伝達系を介して開口するタイプ (受容体作動性チャンネル) が存在することが明らかとなった。また、 Ca^{2+} 活性化陽イオンチャンネルの開口には、 M_3 サブタイプを介した細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が関与し、受容体作動性陽イオンチャンネルの開口には、 M_2 サブタイプの刺激により活性化する経路と M_2 と M_3 の両サブタイプの刺激により活性化する経路の二つが関与しているという情報伝達モデルが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

膀胱は副交感神経による興奮性支配を受けている。この神経から放出されたアセチルコリンが膀胱平滑筋に作用してムスカリン受容体を刺激すると、細胞膜の脱分極、電位依存性カルシウム (Ca) チャンネルの開口、細胞外からの Ca イオンの流入、という一連の反応が誘起されて、筋収縮が生じる。その結果、膀胱内圧が上昇し、貯留している尿が排出される。しかし、筋収縮に導く

最初のステップである脱分極の発現にどのようなイオンチャネルが関与しているのか、その詳細は明らかになっていない。研究が進んでいる腸管平滑筋では、Na や K イオンをはじめ多くの一価陽イオンに透過性を示す非選択的陽イオンチャネルが脱分極の発生要因であることが実証されている。

本論文は、モルモットおよびマウス膀胱の平滑筋細胞を標本として、ムスカリン作動薬のカルバコール（アセチルコリン類似薬）により活性化されるイオンチャネルの性質とその活性化機構について、電気生理学的ならびに薬理学的手法を用いて検討した成績をまとめたものである。

まず、モルモット膀胱の標本において、ムスカリン受容体刺激により2つのタイプの非選択的陽イオンチャネルが活性化されることを明らかにした。そのひとつは細胞内 Ca 貯蔵部（小胞体）から放出された Ca イオンによって直接活性化されるタイプ（Ca 活性化陽イオンチャネル）で、もうひとつは受容体に連関した情報伝達系を介して開口するタイプ（受容体作動性陽イオンチャネル）である。

次いで、ムスカリン受容体の M_2 あるいは M_3 サブタイプあるいはその両方をノックアウトしたマウス膀胱の標本間で、カルバコール誘発イオンチャネル電流を比較分析し、Ca 活性化陽イオンチャネルの開口は M_3 受容体の刺激によって惹起され、受容体作動性陽イオンチャネルの開口は M_2 受容体あるいは M_2 と M_3 の両受容体の刺激により惹起されることを実証した。

これらの結果は、副交感神経による膀胱平滑筋の収縮調節メカニズムをイオンチャネル・レベルで理解する上で重要な情報である。また、近年問題となっている高齢者の尿漏れや尿失禁について、その発現機構の解明や治療薬の開発にとっても有為な基礎知識となり得るものである。

以上、審査委員会では、本論文が全員一致をもって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 : Two types of cation channel activated by stimulation of muscarinic receptors in guinea-pig urinary bladder smooth muscle
著 者 名 : Yamamoto, M., Unno, T., Matsuyama, H., Kohda, M., Masuda, N., Nishimura, M., Ishii, T. and Komori, S.
学 術 雑 誌 : Journal of Pharmacological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 108 (3) : 248-257, 2008

既発表学術論文

- 1) 題 目 : A non-selective cationic channel activated by diacylglycerol in mouse intestinal myocytes
著 者 名 : Sakamoto, T., Matsuyama, H., Yamamoto, M., Tanahashi, Y., Kitazawa, T., Taneike, T., Komori, S. and Unno, T.
学 術 雑 誌 : European Journal of Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 599 : 54-57, 2008

その他の学術論文

- 1) 題 目 : Muscarinic cationic current in gastrointestinal smooth muscles:
signal transduction and role in contraction
- 著 者 名 : Unno, T., Matsuyama, H., Okamoto, H., Sakamoto, T., Yamamoto, M.,
Tanahashi, Y., Yan, H. D. and Komori, S.
- 学 術 雑 誌 : Autonomic and Autacoid Pharmacology
- 巻・号・頁・発行年 : 26 (3) : 203-217, 2006