

称号及び氏名	博士（獣医学）向井 和則
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 3 1 日
論文名	「マウス胃底部の神経性反応とそのメディエータに関する研究」
論文審査委員	主査 竹内 正吉 副査 松尾 三郎 副査 中村 洋一

論文要旨

結論

食物を摂取すると胃は弛緩する。まず食物により咽頭と食道の伸展受容器 (mechanoreceptor) が刺激されることにより、迷走-迷走神経反射 (vago-vagal reflex) が起こり胃は受け入れ弛緩(receptive relaxation)を生じる。次に、食物が胃に届くと胃壁にある伸展受容器が刺激を受け、その興奮が抑制性運動神経へと伝わり適応性弛緩(adaptive relaxation)が生じる。これらの弛緩により、胃は内圧の変化を最小限に抑えて食物をより多く貯留することが可能となる。この現象は、胃の生理機能として非常に重要であるが、詳細な機構は明らかになっていない。

消化管の弛緩には多くの非アドレナリン非コリン性 (non-adrenergic non-cholinergic: NANC) の抑制性神経伝達物質が関与していることが報告されている。胃においても、低頻度 (1 - 3 Hz) の電気刺激 (Electrical Field Stimulation : EFS) を与えると、速い一過性の弛緩が生じ、刺激終了後すぐに元のレベルに戻る。ところが、高頻度 (10 Hz) のEFSを与えると、刺激と同時に速い一過性の弛緩が見られた後、更に刺激終了後も持続する弛緩が見られる。この高頻度のEFSによる速い一過性弛緩のメディエータは、一酸化窒素 (nitric oxide : NO) であることがウサギ、モルモット、ブタ、ラット、マウスなど種々な動物に共通して報告されている。一方、高頻度のEFSによる持続性弛緩にはvasoactive intestinal polypeptide (VIP) やpeptide histidine isoleucine (PHI)、あるいは、pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) などのpeptidesの関与がマウス、モルモットやラット胃底部標本で示唆された。しかしながら、これら研究で用いられたPACAPやVIP受容体のantagonistの受容体に対する特異性が胃標本では低いことが明らかとなってきた。例えば、PACAP₆₋₃₈はPACAPの弛緩を抑制するだけでなくVIPの弛緩も抑制することがマウス胃底部縦走筋にお

いて報告された。したがって、持続性弛緩のメディエータ、特にPACAP関連ペプチドの関与については再検討する必要がある。

本研究では、まず、報告が少ないマウス胃底部輪走筋における抑制性神経伝達物質の同定を行った。次に、最近、PACAP knockout マウスが作製されたことから、NANC の抑制性反応における PACAP の関与を PACAP knockout マウスの胃底部輪走筋標本を用いて wild type マウス標本の結果と比較することにより明らかとした。また、ラット胃底部で抑制性反応への関与が報告されている PHI の関与についても、抗 PHI 血清 (anti-PHI serum) を用いて明らかとした。

第1章 マウス胃底部輪走筋の電気刺激による神経性反応とそのメディエータ

第1節 神経性反応

PACAP wild type マウスの胃底部輪走筋標本を用いて、1 - 10 Hz、0.5 msec、20V で 30 秒間の EFS を与えた時の反応について検討した。低頻度 (1 - 3 Hz) では、刺激と同時に速い一過性の弛緩が見られ、刺激終了後はわずかな弛緩を生じただけであった。高頻度 (10 Hz) では、3相の反応が確認できた。すなわち、EFS と同時に一過性に生じた弛緩反応 (一過性弛緩)、この弛緩反応に続いて EFS 終了時に一過性に生じた収縮反応 (一過性収縮)、そして、収縮反応に引き続いて EFS 終了後に生じた数分以上持続する弛緩反応 (持続性弛緩) から成っていた。これらの反応は、いずれも神経遮断薬である tetrodotoxin (TTX) により完全に消失した。従って、これら 3相の反応はいずれも神経性の反応であると考えられた。そこで、このマウス胃底部輪走筋における神経性反応のメディエータについて検討を行った。

第2節 神経性反応のメディエータ

1. 一過性弛緩のメディエータ

EFS 直後に一過性に見られる速い弛緩反応は、NO 合成酵素の inhibitor である N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG) 処置により消失した。そして、この消失は、L-arginine 処置により回復した。また、この一過性弛緩は PACAP₆₋₃₈ により影響を受けなかったことから一過性弛緩への PACAP 関連ペプチドの関与はないと思われる。このことから、EFS 直後の速い一過性弛緩のメディエータは NO であると言える。

L-NOARG 処置により NO を介した一過性弛緩を消失させると、EFS 開始直後から収縮反応が顕著に現れた。

2. 一過性収縮のメディエータ

EFS 終了直後に一過性に見られる速い収縮反応は、ムスカリン受容体の antagonist である atropine 処置により消失した。このことから、速い一過性収縮のメディエータは acetylcholine であると言える。

Atropine 処置により acetylcholine を介した収縮を抑制すると、EFS により一過性弛緩が顕著に現れた。また先にも述べたが、L-NOARG 処置により一過性弛緩を消失させると、収縮反応が大きく現れた。また、atropine と L-NOARG を同時処置すると、EFS による速い両反応は完全に消失した。このことから、EFS の初期には、興奮性に働く cholinergic な神経と抑制性に働く nitroergic な神経の両方が刺激されることにより、acetylcholine と NO がほぼ同時に遊離し相反する反応を生じていると思われる。

3. 持続性弛緩のメディエータ

EFS 終了後数分以上持続する弛緩反応は、atropine と L-NOARG 処置下において PACAP₆₋₃₈ を与えることにより完全に消失したことから、この持続性弛緩には PACAP あるいは PACAP 類似物質が関与していることが示唆された。しかし、PACAP₆₋₃₈ は PACAP 受容体の選択的 antagonist ではなく VIP 受容体にも作用することが報告されたことから、PACAP₆₋₃₈ により持続性弛緩が消失したという結果のみでは持続性弛緩のメディエータが PACAP であると結論できない。

持続性弛緩は L-NOARG によりほとんど影響を受けず、また、一過性弛緩も PACAP₆₋₃₈ により影響を受けなかったことから、一過性弛緩をメディエートしている NO と持続性弛緩をメディエートしている PACAP あるいは PACAP 類似物質はそれぞれ独立して作用していると考えられる。また、PACAP₆₋₃₈ を添加することにより静止長が短くなったことから、PACAP あるいは PACAP 類似物質がマウス胃底部輪走筋に絶えず抑制的に作用していると思われる。

第2章 PACAP knockout マウスを用いての、PACAP の働きの確認

第1章第2節において、持続性弛緩への PACAP あるいは PACAP 類似物質の関与が示唆されたので、本章では PACAP knockout マウス胃底部輪走筋標本を用いてさらに検討した。

10 Hz の EFS を与えたところ、wild type マウスにおいて EFS 直後に現れた一過性の弛緩が見られず、EFS と同時に大きな一過性の収縮が現れた。一過性の収縮は atropine 処置により消失し、その代わりに一過性の弛緩が現れた。その後、wild type マウスの場合と同様に、数分以上持続する弛緩が認められた。この持続性の弛緩は、PACAP₆₋₃₈ により完全に消失した。しかしながら、atropine 処置下で EFS を与えた時に見られる持続性弛緩の大きさに wild type マウスと PACAP knockout マウスの間で違いが見られた。つまり、持続性弛緩の面積を papaverine による最大弛緩の大きさと割り規準化した値と比較すると、wild type マウスでは 361.3 ± 27.7 (n=11) であるのに対して、PACAP knockout マウスでは 110.6 ± 27.7 (n=9) となった。すなわち、PACAP knockout マウスの持続性弛緩は wild type マウスのおよそ 1/3 であった。言い換えれば、PACAP が持続性弛緩の約 2/3 に関与していると言える。また、残り約 1/3 に関与している抑制性神経伝達物質は、PACAP₆₋₃₈ により抑制されたことから PACAP 以外の PACAP 類似物質であることが予想される。

PACAP knockout マウスにおいて、EFS と同時に現れた収縮は atropine 処置により消失したため、acetylcholine によりメディエートされていると考えられる。また、atropine 処置下

での EFS 直後の一過性に現れた弛緩は、L-NOARG により消失したことからメディエータは NO であると言える。

第3章 持続性弛緩における PACAP 以外の神経伝達物質の検索

本章では PACAP 以外の抑制性神経伝達物質の関与を明らかにするために、PACAP と同様に VIP/glucagon/secretin family に属し、ラット胃底部輪走筋において持続性弛緩のメディエータとして報告された PHI の関与について、anti-PHI serum を用いて遊離される PHI との中和反応により検索を試みた。

Atropine と L-NOARG 処置下で、anti-PHI serum を添加して EFS による持続性弛緩は、anti-PHI serum を添加していない場合と比較して、wild type マウスでは約 1/2 (47.8 ± 5.4%(n=5)) 抑制され、PACAP knockout マウスでは約 3/4 (73.3 ± 4.8%(n=5)) 抑制された。コントロールの normal rabbit serum は、持続性弛緩にはほとんど影響を与えなかった。したがって、持続性弛緩に関与している PACAP 以外の神経伝達物質の一つは PHI であることが示唆された。

第2章の結果を合わせて考えると、マウス胃底部輪走筋の持続性弛緩には PACAP が約 55-65%、PHI が約 35-45% 関与していることが示唆された。そして、これらの peptides は持続性弛緩にそれぞれ相加的に作用していると思われる。

第4章 添加した PACAP および PHI の反応

次に、外から添加した PACAP および PHI による弛緩反応について検討した。PACAP には、アミノ酸配列の異なる PACAP27 と PACAP38 の2つのサブタイプがあるが、今回は、外から添加した時により大きな弛緩を引き起こした PACAP27 を利用した。

PACAP27 および PHI は、いずれも濃度依存的に wild type マウス胃底部輪走筋を弛緩させた。50% effective concentration 値で比較すると、PACAP27 では 2.33 ± 0.23 nM (n=3)、PHI では 7.11 ± 0.54 nM (n=4, $p < 0.05$) となり、PACAP27 の方がより低濃度において弛緩させた。

次に、PACAP27 および PHI の弛緩に対する PACAP₆₋₃₈ の効果を調べたところ、いずれの peptide による弛緩も PACAP₆₋₃₈ により抑制された。PACAP₆₋₃₈ の抑制作用については、PACAP₆₋₃₈ が PACAP 受容体の選択的 antagonist ではなく、PACAP 受容体と PHI 受容体の両方に作用して PACAP および PHI の弛緩を抑制するか、あるいは、PACAP および PHI の両方が PACAP 受容体に作用し弛緩を引き起こしており、この弛緩に対して PACAP₆₋₃₈ が拮抗作用を示すという2つの可能性が考えられる。

第5章 PACAP knockout マウスにおける収縮増強機構

第2章で示したが、PACAP knockout マウス胃底部輪走筋標本に EFS を与えると、wild type マウス標本とは異なり、EFS 直後に acetylcholine を介した速い大きな一過性の収縮が認め

られた。そこで、この収縮増強機構に関してさらに検討を加えた。その結果、1) knockout マウスにおいて外からの PACAP の添加は、acetylcholine を介した収縮反応に影響を与えなかった。2) knockout マウスにおいて acetylcholine に対する平滑筋の感受性は増大していなかった。3) knockout マウスにおいても NO を介する弛緩反応は減弱していなかった。

以上、PACAP knockout マウスにおける収縮増強機構に関しては明確な結論を得ることができなかった。

まとめ

今回の結果から、マウス胃底部輪走筋における神経性反応とそのメディエータについて、以下の事柄が明らかとなった。

- 1 高頻度の EFS により 3 相の神経性反応（一過性弛緩、一過性収縮、持続性弛緩）が生じる。
- 2 一過性弛緩のメディエータは NO である。
- 3 一過性収縮のメディエータは acetylcholine である。
- 4 持続性弛緩には PACAP が約 55-65%、PHI が約 35-45% 関与している。そして、これらの peptides はそれぞれ相加的に作用している。
- 5 NO と peptides は独立して弛緩を生じている。
- 6 外から加えた PACAP27 と PHI はともにマウス胃底部輪走筋を濃度依存的に弛緩させる。そして、PACAP27 の方が PHI よりも低濃度で弛緩させることができる。
- 7 外から加えた PACAP27 および PHI の弛緩は PACAP₆₋₃₈ により抑制される。
- 8 PACAP₆₋₃₈ を添加することにより静止長が短くなることから、PACAP あるいは PACAP 類似物質が絶えず抑制的に作用している。

胃標本における持続性弛緩への PACAP の関与に関する研究では、これまで antagonist である PACAP₆₋₃₈ が使われていたが、PACAP₆₋₃₈ の受容体に対する特異性が低いことが報告され、再検討を要する課題となっていた。本研究では、PACAP knockout マウス胃底部輪走筋を用いて、持続性弛緩への PACAP と PHI の関与の程度を初めて明らかにした。

審査結果の要旨

胃の生理的運動の一つに、摂取した食物を一時貯留する機能がある。そのため、胃は、食物による咽頭と食道の伸展受容器の刺激、迷走-迷走神経反射を介した受け入れ弛緩、次に食物による胃壁にある伸展受容器の刺激、抑制性運動神経を介した適応性弛緩を生じる。しかしながら、この現象における詳細な機構は明らかになっていない。消化管の弛緩には多くの非アドレナリン非コリン性 (non-adrenergic non-cholinergic: NANC) の抑制性神経伝達物質が関与していることが報告されている。胃での弛緩に関わる抑制性神経伝達物質として、一酸化窒素 (nitric oxide : NO)、

vasoactive intestinal polypeptide(VIP)や peptide histidine isoleucine(PHI)、あるいは、pituitary adenylate cyclase activating polypeptide(PACAP)などの peptides の関与が種々の動物の胃底部標本で示唆された。しかしながら、これら研究で用いられた PACAP や VIP 受容体拮抗薬のそれぞれの受容体に対する特異性が胃標本では低いことが明らかとなったことから、胃での弛緩のメディエータ、特に PACAP 関連ペプチドの関与については再検討する必要がある。また、胃における抑制性神経伝達物質の同定は多くの場合、縦走筋標本を用いて検討されている。本研究では、まず、マウス胃底部輪走筋における抑制性神経伝達物質の同定を行い、次に、NANC の抑制性反応における PACAP の関与を、PACAP knockout マウスを用いて wild type マウス標本の結果と比較することにより明らかにし、また、PHI の関与についても、抗 PHI 血清(anti-PHI serum)を用いて検討した。

第1章では、PACAP wild typeマウスの胃底部輪走筋標本を電気刺激(EFS)したときに生じる3相性の反応、EFSと同時に一過性に生じる弛緩反応(一過性弛緩)、この弛緩反応に続いてEFS終了時に一過性に生じる収縮反応(一過性収縮)、そして、収縮反応に引き続いてEFS終了後に生じた数分以上持続する弛緩反応(持続性弛緩)、のメディエータについて検討を行った。EFS直後に一過性に見られる速い弛緩反応は、NO合成酵素阻害薬であるN^G-nitro-L-arginine(L-NOARG)処置により消失したが、非特異的なPACAP受容体拮抗薬により影響を受けなかったことから、EFS直後の速い一過性弛緩のメディエータはNOであった。EFS終了直後に一過性に見られる速い収縮反応は、ムスカリン受容体拮抗薬であるatropine処置により消失したことから、速い一過性収縮のメディエータはacetylcholineであった。EFS終了後数分以上持続する弛緩反応は、atropineとL-NOARG処置により影響されず、PACAP受容体拮抗薬により完全に消失したことから、この持続性弛緩にはPACAPあるいはPACAP類似物質が関与していることが示唆された。

第2章では、PACAP knockout マウス胃底部輪走筋標本を用いてさらに検討した。EFSにより、atropine 感受性の一過性の収縮、その後、wild type マウスの場合と同様に、数分以上持続する弛緩が認められた。この持続性の弛緩は PACAP 受容体拮抗薬により完全に消失した。しかしながら、持続性弛緩の大きさを wild type マウスと比較したところ、PACAP knockout マウスの持続性弛緩は wild type マウスのおよそ 1/3 であった。つまり、PACAP が持続性弛緩の約 2/3 に関与していること、また、残り約 1/3 に関与している抑制性神経伝達物質は PACAP 以外の PACAP 類似物質であることが示唆された。

第3章では、PACAP 以外の抑制性神経伝達物質を明らかにするために、anti-PHI serum を用いて遊離される PHI との中和反応により PHI の関与について検索を試みた。EFS による持続性弛緩は、anti-PHI serum により wild type マウスでは約 1/2 抑制され、PACAP knockout マウスでは約 3/4 抑制された。したがって、持続性弛緩に関与している PACAP 以外の神経伝達物質の一つは PHI であることが示唆された。第2章の結果を合わせて考えると、マウス胃底部輪走筋の持続性弛緩には PACAP が約 55-65%、PHI が約 35-45%関与していることが示唆された。

第4章では、外から添加した PACAP および PHI による弛緩反応について検討した。PACAP27 および PHI は、いずれも濃度依存的に wild type マウス胃底部輪走筋を弛緩させたが、PACAP27

の方がより低濃度において弛緩させた。PACAP 受容体拮抗薬は、いずれの peptide による弛緩も抑制したことから、PACAP 受容体拮抗薬は PACAP の反応だけではなく、PHI の作用も抑制することを初めて明らかにした。

第5章では、第2章で示した PACAP knockout マウス胃底部輪走筋標本における EFS 直後の acetylcholine を介した速い大きな一過性の収縮の増強機構に関して、胃輪走平滑筋の acetylcholine や NO に対する反応性などについて検討を加えたが、明確な結論を得ることができなかった。

以上の結果は、マウス胃底部輪走筋における抑制性神経伝達物質の性状を明らかとし、特に、食物の胃内貯留と密接に関連する持続性弛緩を生じる神経伝達物質の一つが PACAP であることを PACAP knockout マウスを用いて実証し、さらに持続性弛緩への PHI の関与を初めて明らかにした。これらの成果は胃の生理的運動機構の解明の基礎となるものであり、医学、動物医学に貢献するところが大きく、本論文の審査および最終試験の結果から博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。