

M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptor on mouse colonic epithelial cells

（マウス結腸上皮においてはM1がムスカリン受容体の主要なサブタイプである）

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

Khan Md. Rafiqul Islam

（ Abu Syed Md Anisuzzaman、仙葉 慎吾、馬 艶菊、  
宇和田 淳介、林 久由、鈴木 裕一、高野 智子、  
池内 浩基、内野 基、前本 篤男、牛首 文隆、  
村松 郁延、谷口 隆信 ）

## 研 究 目 的

腸管上皮は消化吸収において中心的な役割を担うと同時に、強固な物理的バリアを形成することで、腸内の細菌や抗原が腸壁内に侵入してくることを防いでいる。これらの腸管機能の調節においてアセチルコリンは最も重要な分子の一つであり、腸上皮に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) を介していると考えられている。

炎症性腸疾患 (IBD) は、潰瘍性大腸炎とクローン病の二つを代表的な疾患とする原因不明の難治性疾患であり、腸における炎症調節制御不全が発病に関与する要因の一つとして考えられている。腸における炎症調節には、免疫系によるものの他に、腸の上皮細胞によって形成されるバリアが重要な役割を果たしている。即ち、腸上皮細胞は整然と配列して相互に接着することにより、強固な物理的バリアを形成するのであるが、このバリア機能の低下や破綻が IBD の発症に繋がると考えられている。

我々はこれまで、腸上皮バリア機能において、focal adhesion kinase (FAK) が重要な役割を担っていることを報告している<sup>(2,3)</sup>。本研究においては、1) 腸上皮における mAChR の薬理的解析を通してサブタイプ構成 (M1-5) を明らかにし、2) 腸管機能調節におけるそれらの役割を解析し、3) IBD 病態との関連について追究した。

## 材 料 ・ 方 法

### 1 材料

#### (1) 実験動物

実験には雄のBALB/cマウス (9-11週令) を用いた。

#### (2) 培養細胞

ヒト大腸がん由来の腸上皮細胞株T84細胞を常法に従って使用した。

### 2 実験方法

#### (1) 腸陰窩の採取

マウスから摘出した結腸をEDTA含有緩衝液中で振盪することにより陰窩浮遊液を得、Percollで作成した密度勾配遠心分離により精製した。

#### (2) 薬理的結合実験

<sup>3</sup>[H]-N-methyl scopolamine chloride (NMS)をリガンドとして陰窩細胞に対する結合特性を常法に従って解析した。

#### (3) 腸炎誘導

肛門に挿入したカテーテルからtrinitrobenzene sulphonic acid溶液を注腸して炎症を誘導し、腸炎モデルとした。

#### (4) バリア機能

単層の細胞を介する電気抵抗 (transepithelial electrical resistance、TER) を計測し、評価した。

#### (5) 分泌機能

マウス結腸の粘膜片をUssing chamberに装着し、常法に従い粘膜を介する電流を電気生理学的に解析した。

### 3 統計学的処理

結合実験の解析には Prism (GraphPad software) を用いた。2群間の比較には、Student's t 検定を行い、危険率5%未満を有意とした。

## 成 績

### 1 腸上皮ムスカリン受容体の薬理的性質

<sup>3</sup>[H]-NMSの結合をムスカリンサブタイプに選択性のある薬剤の共存下で検討を行った所、M1特異的な muscarinic toxin 7 (MT-7) 及びM3に選択性のある darifenacin (Dar) に対して高親和性の結合が認められた。解析結果からマウス陰窩細胞においては受容体密度  $47.3 \pm 2.6$  fmol/mg of cell protein のうちM1とM3がそれぞれ80%と20%、T84細胞においては  $151.1 \pm 13.2$  fmol/mg of cell protein のうちそれぞれ35%と65%の割合で存在していると考えられた。

### 2 腸上皮細胞におけるムスカリン刺激による MAP kinase/FAK のリン酸化亢進

マウスの腸上皮細胞をカルバコール (CCh) で刺激すると、Erk 及び p38 のリン酸化が亢進し、このリン酸化はアトロピン (Atr) または MT-7 の存在化では消失した。T84 細胞においても同様の現象が観察され、Erk 及び FAK の M1 依存性のリン酸化亢進が認められた。MAP kinase と FAK の関連性についてそれぞれに選択的な阻害剤 (前者では U0126、後者では PF-228) を用いて検討した所、M1/MAP kinase/FAK の順で活性化シグナルが流れていると考えられ、このことは siRNA を用いた実験結果からも支持された。これらの結果から、MAP kinase/FAK 経路を駆動するのは M3 ではなく M1 サブタイプであると考えられた。上皮細胞によって形成されるバリアが重要な役割を果たしている。即ち、腸上皮細胞は整然と配列して相互に接着することにより、強固な物理的バリアを形成するのであるが、このバリア機能の低下や破綻が IBD の発症に繋がると考えられている。

我々はこれまで、腸上皮バリア機能において、focal adhesion kinase (FAK) が重要な役割を担っていることを報告している<sup>(2,3)</sup>。本研究においては、1) 腸上皮における mAChR の薬理的解析を通してサブタイプ構成 (M1-5) を明らかにし、2) 腸管機能調節におけるそれらの役割を解析し、3) IBD 病態との関連について追究した。

### 3 腸上皮分泌機能

Ussing chamberにおいてムスカリン刺激によるCl<sup>-</sup>電流の増加が観察され、この電流はAtrやDarの存在化では減弱/消失したが、MT-7存在化ではさらに増加した。これらの結果から、ムスカリン刺激によって生じるCl<sup>-</sup>分泌はM3によって正に、M1によって負に制御されていると考えられた。

### 4 腸上皮バリア機能

腸上皮単層培養系において、U0126やPF-228の添加によってTERが低下し、MAP kinase/FAK経路はバリア機能の維持に必要であると考えられた。エタノール処理によって一過性にバリア機能を減弱させるバリア障害モデルにおいて、CChはTERの回復を促進した。この促進はMT-7やU0126、PF-228存在化では消失し、バリア機能の回復においてもM1/MAP kinase/FAK経路が機能していると考えられた。

### 5 炎症との関連

マウス腸炎モデルあるいはサイトカイン添加培養細胞系において、mAChR密度を検討した所、受容体密度は減少した。この減少の大部分はM1の減少によるものであり、M1は炎症に対する感受性が高いのに対しM3は抵抗性であると考えられた。このことは炎症惹起マウス及びヒト炎症性腸疾患患者から摘出された腸管の免疫組織学的検討からも支持された。炎症状態におけるM1密度の減少に呼応して、ムスカリン刺激によるMAP kinaseリン酸化亢進の程度は減弱した。これらの結果から、炎症時のM1受容体密度の減少と炎症腸管においてしばしば観察される低応答性との関連が示唆された。

## 考 案

腸上皮細胞上にはmAChRが発現しており、M1とM3が主要なサブタイプであった。M1はMAP kinase経路を活性化させると同時に、腸上皮の分泌機能を負に制御していた。Keelyらは腸上皮分泌機能がMAP kinase経路によって負に制御されていることを報告しており<sup>(4)</sup>、我々の実験結果と矛盾しない。

我々はこれまで、腸上皮バリア機能において、focal adhesion kinase (FAK)が重要な役割を担っていることを報告している<sup>(2,3)</sup>。本研究においては更にmAChR/MAP kinase/FAK経路の関与を明らかにし、腸管機能調節における最も基本的な分子の一つであるアセチルコリンが、腸上皮の分泌やバリア機能においても重要な役割を担っていることを示している。

炎症を生じた腸管においてはアセチルコリンを含む様々な刺激物質に対する応答性が低下することが知られているが<sup>(5)</sup>、本研究結果から炎症によるM1の減少とそれに引き続くMAP kinase活性化の減弱という現象によってこの低応答性メカニズムの少なくとも一部を説明することが出来ると考えている。

## 結 論

- 1、腸上皮にはmAChRが存在し、M1とM3が主要なサブタイプであった。
- 2、腸上皮Cl<sup>-</sup>分泌はM3によって正に、M1によって負に制御されていると考えられた。また、腸上皮バリア機能においてはM1/MAP kinase/FAK経路がその維持と修復において重要であると考えられた。
- 3、M1はM3に比べて炎症に対する感受性が高く、炎症時には受容体密度が大きく減少した。このことと炎症腸管における低応答性との関連が示唆された。

## 引 用 文 献

1. C.L. Hirota, D.M. McKay, Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine, , Br. J. Pharmacol. 149 (2006) 463-479.
2. Y. Ma, S. Semba, A. Maemoto, M. Takeuchi, I. Kameshita, A. Ishida, S. Kato, T. Katoh, Y. Liu, T. Taniguchi, Oxazolone-induced over-expression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model,, FEBS lett. 584 (2010) 3949-3954.
3. Y. Ma, S. Semba, M.R. Khan, H. Bochimoto, T. Watanabe, M. Fujiya, Y. Kohgo, Y. Liu, T. Taniguchi, Focal adhesion kinase regulates intestinal epithelial barrier function via redistribution of tight junction,, Biochim. Biophys. Acta 1832 (2013) 151–159.
4. S.J. Keely, J.M. Uribe, K.E. Barrett, Carbachol Stimulates Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor and Mitogen-activated Protein Kinase in T84 Cells: IMPLICATIONS FOR CARBACHOL-STIMULATED CHLORIDE SECRETION, J. Biol. Chem. 273 (1998) 27111-27117.
5. C.L. Hirota, D.M. McKay, Loss of Ca-mediated ion transport during colitis correlates with reduced ion transport responses to a Ca-activated K channel opener, , Br. J.Pharmacol. 156 (2009) 1085-1097.