

「平滑筋に発現する機械受容チャネル Piezo1 の 結腸運動調節における役割」研究経過報告

棚 橋 靖 行 *

藤 川 咲 *

齊 藤 玲 香 *

要 旨

消化管平滑筋の収縮活性は、内容物による筋組織の伸展により変化することが知られている。この伸展刺激を感知するセンサーの役割を担うのが機械刺激受容チャネルである。これまでに、消化管平滑筋細胞において機械刺激により活性化する陽イオンチャネルの存在が報告されており、筋の収縮を興奮性に調節することが示唆されている。しかしながら、同チャネルの分子実体については未だに明らかにされていない。近年、機械刺激受容性陽イオンチャネルとして、新たに Piezo1 チャネルが同定された。そこで本研究では、平滑筋に発現する Piezo1 チャネルの結腸運動調節における役割について明らかにすることを目的とし、マウス結腸平滑筋において Piezo1 チャネル作動薬である Yoda1 の収縮活性に対する効果について検討した。その結果、Piezo1 チャネルが結腸平滑筋の収縮を促進性に制御する可能性が示唆された。

キーワード：Piezo1 チャネル，機械刺激受容チャネル，平滑筋細胞， Ca^{2+} ，Yoda1

1. はじめに

結腸の運動は、外来性神経および腸管壁内に存在する内在性神経やカハール間質細胞が協調しあって調節されている [3, 5, 7]。結腸の運動を担う平滑筋の収縮活性は、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) に依存して変化し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加すると筋は収縮する。細胞内への Ca^{2+} 動員経路は、細胞外からの流入経路と細胞内 Ca^{2+} ストアからの流入経路の2つに分けられる。細胞外からの Ca^{2+} 流入経路には、細胞膜の脱分極により開口する電位依存性 Ca^{2+} チャネル ($\text{Ca}_v1.2$ チャネル) を介した経路と、膜電位に依存しない Ca^{2+} 透過性イオンチャネルを介した経路がある。このような Ca^{2+} 動員機構は興奮性の神経伝達物質やカハール間質細胞から伝播するペースメーカー電位により作動する [5, 8]。さらに、消化管平滑筋の収縮活性は、管腔内容物による筋組織の伸展によっても変化することが知られて

*京都産業大学生命科学部

いる。この伸展刺激を感知するセンサーの役割を担うのが機械刺激受容チャネルである。これまでに、消化管平滑筋細胞において機械刺激により活性化する陽イオンチャネルの存在が報告されており、筋の収縮を興奮性に調節する可能性が示唆されている [4, 9]。しかしながら、同チャネルの分子実体については未だに明らかにされていない。近年、機械刺激受容チャネルとして、新たに Piezo1 チャネルが同定された [1]。Piezo1 チャネルは Ca^{2+} 透過性を有する非選択的陽イオンチャネルであることから、結腸平滑筋において Piezo1 チャネルが機械刺激受容性陽イオンチャネルとして機能的に発現しており、糞便による腸管壁の伸展時に、筋の収縮活性を促進性に調節する可能性が考えられる。この点を明らかにする一環として、本研究では、マウス結腸において Piezo1 チャネル作動薬である Yoda1 [6] による平滑筋収縮活性に対する効果、および、Piezo1 チャネルを介した平滑筋収縮調節における Ca^{2+} 動員機構について検討した。

2. 材料と方法

本研究の動物実験に関しては、京都産業大学動物実験委員会の承認を受け、同大学動物実験規定に基づき実施した。

2.1 実験動物

実験には、ddY 系統のマウス（雄，8 週齢以上，日本 SLC）を使用した。マウスは、明期を 7:00 ～ 19:00，暗期を 19:00 ～ 7:00，室温を $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，湿度を $50 \pm 10\%$ に設定した Specific pathogen free レベルの動物実験施設において飼育した。マウスには飼育用固形飼料（DC-8; CLEA Japan, Tokyo, Japan）と水をそれぞれ自由摂取させた。

2.2 標本の作製

マウスはイソフルランによる吸入麻酔後、頸椎脱臼により安楽死させた。その後、腹部を正中切開し、胃から直腸までを腸間膜と共に摘出した。摘出した臓器は直ちに、タイロッド液（136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 2.1 mM MgCl_2 , 0.41 mM NaH_2PO_4 , 11.9 mM NaHCO_3 , 5.55 mM glucose）を満たしたシャーレに移し、盲腸より上部の消化管を切除した。得られた大腸片から長さ約 1 cm の近位結腸を摘出し、結腸片標本を作製した。同標本は縦走筋方向に発生する張力測定に使用した。輸送筋方向に発生する張力を測定する際は、得られた結腸片標本を縦幅（輸走筋方向）×横幅（縦走筋方向）＝8 mm × 3 mm の大きさの短冊状にして作成した結腸筋条片標本を使用した。

2.3 張力測定

結腸片標本または結腸筋条片標本の長軸の両端にそれぞれ絹糸を結び、一方の絹糸はマグヌス管（5 ml）底部に固定した。タイロッド液にてマグヌス管を満たした後、もう一方の絹糸は等尺性張力トランスデューサー（T7-8-240; A&D, Tokyo, Japan）のフックにかけ、マグヌス管中に懸垂した。標

本には、あらかじめ 0.25 ～ 0.30 g の伸展負荷をかけ、約 50 分間タイロッド液にて平衡化させた。実験中、マグヌス管内のタイロッド液の温度は約 37 °C に維持し、エアーポンプにより空気を曝気した。なお、一部の実験では、CaCl₂ を添加せず、EGTA (0.5 mM) を添加したタイロッド液 (Ca²⁺ 除去タイロッド液) を使用した。各標本に発生する張力変化を上述の張力トランスデューサーにより検出し、検出した信号は 1 kHz のローパスフィルターを通して増幅器 (AS2203; NEC/Avio, Tokyo, Japan) により増幅した。増幅信号は、アナログ / デジタル変換器 (PowerLab 2/26 または PowerLab 16/30; ADInstruments, New South Wales, Australia) を介して 2 kHz のサンプリングレートでデジタル化し、コンピューター (HP EliteDesk 800 G2 SFF または HP ProBook 450 G3/CT Notebook; HP Inc.) に記録した。実験は高濃度 K⁺ 溶液 (70 mM) を 3 ～ 5 回繰り返し適用し、発生する収縮張力が一定の大きさになったことを確認してから実施した。適用した Yoda1 の濃度と発生した張力変化の大きさとの関係性を検討するために、統計解析ソフト (OriginPro 2019; OriginLab, Massachusetts, U.S.A.) を用いて濃度 - 反応曲線を作成し、Yoda1 の 50% 有効濃度 (EC₅₀ 値) を算出した。

2.4 使用した薬物

Yoda1 は Tocris Bioscience (Bristol, UK) から購入した。Yoda1 は使用濃度の 1,000 倍の高濃度溶液となるように DMSO に溶解し、-20°C にて保存した。Yoda1 は、必要な濃度となるようにマグヌス管内のタイロッド液中に投与した。本文中の Yoda1 の濃度はマグヌス管内の最終濃度を示す。

3. 結果および考察

3.1 マウス結腸平滑筋における Yoda1 誘発性収縮反応

結腸平滑筋の収縮調節における Piezo1 チャネルの役割を明らかにするために、マウス結腸片標本およびマウス結腸筋条片標本において Yoda1 を適用した時に発生する縦走筋および輪走筋の張力変化をそれぞれ記録した。図 1 A に示すように、マウス結腸片標本に対して Yoda1 (10 μM) を単適用すると徐々に縦走筋の張力が増加し、薬物適用約 2 ～ 3 分後に最大反応に達した。Yoda1 による収縮反応は最大に達した後、薬物が存在しているにも関わらず、徐々に低下した。マウス結腸筋条片標本において、同様の実験を行ったところ、Yoda1 (10 μM) の適用により、結腸片標本と同様、一過性の収縮反応が生じた (図 1 B)。次に、Yoda1 の EC₅₀ 値を決定するために、各標本において Yoda1 (0.1 ～ 30 μM) を累積的に適用した時の収縮反応を記録した。結腸片標本および結腸筋条片標本ともに、適用した Yoda1 の濃度に依存して収縮反応が生じた。それぞれの標本において算出された EC₅₀ 値は、結腸片標本では約 2 μM、結腸筋条片標本では約 1 μM であった。これらの値は、Piezo1 を強制発現させた細胞における Yoda1 誘発性 Ca²⁺ 反応の EC₅₀ 値とほぼ同等の値であった [2]。これらの結果は、マウス結腸において Piezo1 チャネルが縦走筋および輪走筋の収縮を興奮性に制御する可能性を示唆している。

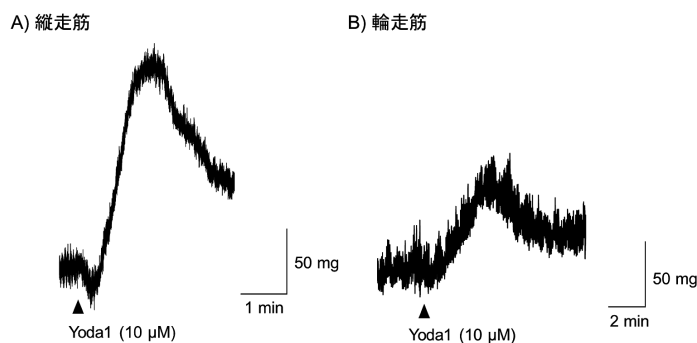


図1. マウス結腸標本における Yoda1 誘発性収縮反応

マウス結腸片標本および結腸筋条片標本に発生する張力変化をマグヌス法により記録した。バス溶液には、タイロード液を用いた。(A) および (B) は Yoda1 (10 μ M) の適用により縦走筋および輪走筋において発生した張力変化の典型例をそれぞれ示す。

3.2 Yoda1 誘発性収縮反応における Ca^{2+} 動員機構

Yoda1 誘発性収縮反応における細胞外 Ca^{2+} 流入に対する依存性を検討するために、タイロード液の代わりに Ca^{2+} 除去タイロード液にて標本を平衡化し、Yoda1 を累積的に適用した時の収縮反応を記録した。結腸片標本および結腸筋条片標本ともに、 Ca^{2+} 除去タイロード液を用いた場合には、Yoda1 (0.1 ~ 30 μ M) を累積的に適用しても、全く収縮反応は生じなかった。これらの結果は、Yoda1 誘発性収縮反応が細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存していることを示している。

4. まとめと今後の展開

本年度の研究により、Piezo1 チャネルが結腸平滑筋の収縮を促進性に制御する可能性が示唆された。また、Piezo1 チャネルを介した収縮は細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存することが示唆された。今後は、平滑筋特異的 Piezo1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、Piezo1 チャネルの結腸運動調節における役割について検討していく予定である。また、Piezo1 チャネル以降の細胞内情報伝達機構についても詳細に検討していく予定である。

5. 謝辞

本研究は、京都産業大学特定研究課題（課題番号 E1904）の支援を受けて行った。

6. 参考文献

- [1]Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* **330**: 55-60, 2010. doi: 10.1126/science.1193270.
- [2]Evans EL, Cuthbertson K, Endesh N, Rode B, Blythe NM, Hyman AJ, Hall SJ, Gaunt HJ, Ludlow MJ, Foster R, Beech DJ. Yodal analogue (Dooku1) which antagonises Yodal-evoked activation of Piezo1 and aortic relaxation. *British Journal of Pharmacology* **175**: 1744-1759, 2018. doi: 10.1111/bph.14188.
- [3]Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Neurobiology* **72**: 143-164, 2004. doi: 10.1016/j.pneurobio. 2003.12.004.
- [4]Kirber MT, Walsh JV Jr, Singer JJ. Stretch-activated ion channels in smooth muscle: a mechanism for the initiation of stretch-induced contraction. *Pflügers archiv: European Journal of Physiology* **412**: 339-345, 1988. doi: 10.1007/bf01907549.
- [5]Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **111**: 492-515, 1996. doi: 10.1053/gast.1996.v111.pm8690216.
- [6]Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, Matzen J, Lao J, Tully DC, Engels IH, Petrassi HM, Schumacher AM, Montal M, Bandell M, Patapoutian A. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *eLife* 07369, 2015. doi:10.7554/eLife.07369.
- [7]Venkova K, Meerveld BG, Krier J. Neural control of the large intestine. In Brookes S and Costa M (Eds.) *Innervation of the gastrointestinal tract*. London, United Kingdom; Taylor & Francis, 2002.
- [8]Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education* **27**: 201-206, 2003. doi: 10.1152/advan.00025.2003.
- [9]Zou H, Lifshitz LM, Tuft RA, Fogarty KE, Singer JJ. Visualization of Ca^{2+} entry through single stretch-activated cation channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:6404-6409, 2002. doi: 10.1073/pnas.092 654999

Research progress report: Roles of Piezo1 channels expressed on smooth muscle for regulation of colonic motility

Yasuyuki TANAHASHI *

Saki FUJIKAWA *

Reika SAITO *

Abstract

The contractility of smooth muscle changes in response to mechanical stretching caused by luminal contents in the gastrointestinal tract. Mechanical stimulation is sensed by mechanosensitive ion channels. Mechanosensitive cationic channels are expressed on the gastrointestinal smooth muscle cells and may contribute to contractions in response to muscle stretch. However, the molecular identity of cationic channels remains unclear. In this study, we aimed to elucidate the roles of Piezo1 channels in smooth muscle cells, which have been identified as a new class of mechanosensitive ion channels and have been reported as Ca^{2+} -permeable nonselective cationic channels, on the regulation of colonic motility. This year, we investigated the effects of Yoda1, a Piezo1 selective agonist, on contractile activity in murine colonic smooth muscles. Our results suggest that Piezo1 channels are involved in the contraction of smooth muscles in murine colon.

Keywords : Piezo1 channels, mechanosensitive ion channels, smooth muscle cells, Ca^{2+} , Yoda1