

イヌ小腸単離上皮細胞を用いたモチリン分泌 刺激因子に関する研究

(研究課題番号 06670520)

平成6、7年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 坂井 貴文
(埼玉大学理学部助教授)

はじめに

消化管粘膜から種々の刺激に応じて多数の消化管ホルモンが分泌され、消化管運動、消化液分泌を調節していることは良く知られている。

消化管ホルモンの一種であるモチリンは22残基のアミノ酸よりなる分子量約2700のペプチドであり、空腹期に約90分の間隔で上部消化管に存在する産生細胞より血中に放出される。血中モチリン濃度の上昇に伴って空腹期収縮 (IMC) と呼ばれる蠕動収縮波群が胃より肛門側へ向かって起こること、及び外因性モチリンにより IMC が惹起されることより、モチリンは生理的にIMCを起こすと考えられている。モチリンの消化管及び平滑筋に対する作用はin vitro, in vivo とも多くの発表がなされているのに比べ、モチリン産生細胞からのモチリン放出機序については、主にin vivoでの結果が報告されているが、その解明は進んでいない。現在までに行われているモチリンの放出刺激に関する研究をまとめると、

- (1) atropin, hexamethoniumなどの自律神経遮断剤がモチリンの周期的上昇を抑えること及び迷走神経を刺激するとモチリンが血中に放出されることより迷走神経を介したcholinergicな刺激による調節。
- (2) 外因性モチリンを投与すると内因性モチリンが上昇することより、モチリン自身のpositive feedbackによる調節、または十二指腸収縮による機械的刺激による調節。
- (3) 管腔内容物（脂肪、pHなど）による刺激調節。
- (4) 胆汁、膵外分泌液、または中に含まれる未知物質による刺激調節。

などが考えられているが、迷走神経を介する放出刺激に対しては否定的な報告もあり詳細は不明である。一方、in vitroの報告では、消化管上皮細胞を単離しアセチルコリンと反応させ上清中のモチリンを測定した報告があるが、静置系を用いているため反応に数時間を要するなど刺激・放出を調べるのには必ずしも良い系とはいえない。これは他の消化管ホルモン産生細胞同様、モチリン産生細胞も吸収上皮細胞中に散在性に存在するため、ホルモン放出機序や放出刺激、特に細胞に対する直接作用を調べるのが困難であることに起因している。

以上のことを踏まえて、我々はモチリン産生細胞に直接作用し、ホルモンを放出させる因子・条件を調べるために以下のin vitro 実験を計画した。

- (1) モチリン細胞灌流実験系を確立する。
- (2) アセチルコリンのモチリン放出刺激効果について検討する。
- (3) ムスカリニックレセプターサブタイプの検討を行う。

特に一般的に消化管ホルモン放出に対し神経の関与が言われていることからアセチルコリンの効果を中心にし、抑制性に作用すると言われるソマトスタチン等のペプチドの効果も合わせて調べた。

研究組織

研究代表者 坂井貴文（埼玉大学理学部生体制御学科助教授）

研究分担者 伊藤 漸（群馬大学生体調節研究所教授）

補助金額

平成6年度 1400千円

平成7年度 700千円

計 2100千円

研究結果および考察

1. 消化管単離上皮細胞を用いた、細胞灌流実験系の確立

コラゲナーゼ、パーコールを用いて単離した細胞を、バイオゲルP-2と共にカラムに入れ、BSAを含む生理的食塩水にて灌流した。灌流液は37度Cで100%酸素を吹き込み酸素化した。灌流液中のモチリン濃度はRIA法にて測定し、刺激に対して再現性の良いモチリン分泌が見られた。このモチリン分泌は、二つのピークより成り、高濃度のアセチルコリン刺激により、二つ目のピークが顕著に現れた。この分泌様式は向下垂体因子による下垂体前葉細胞からのホルモン分泌と一致しており、消化管ホルモン分泌の灌流実験系が確立できた。

2. カルバコールに対する反応とムスカリニックレセプターのサブタイプの決定

カルバコール投与により、 10^{-4} Mにピークを持つ容量依存性のモチリン分泌反応が得られた。この反応は、アトピン同時投与により 10^{-9} Mより有意に抑制され、 10^{-5} Mで完全に消失した。ムスカリニックレセプターのサブタイプを調べるため、M1,M2,M3のアンタゴニストとしてそれぞれピレンゼピン、AF-DX116BS、4-DAMPを用いて、カルバコール 10^{-4} M刺激によるモチリン分泌抑制を検討した。その結果 10^{-6} Mの4-DAMPによってモチリン分泌は完全に消失した。

3. ソマトスタチン、ボンベシンによる分泌反応

今までにモチリンを分泌を調節するとin vivo実験にて報告されていたソマトスタチン、ボンベシンは、モチリン分泌を変化させなかった。従って、これらのホルモンによるモチリン分泌調節はモチリン産生細胞への直接作用とは考えられないことが明らかになった。

以上の結果より、モチリン細胞は、細胞上に存在するM3レセプターを介しアセチルコリン刺激によって分泌が制御されている事が明らかになり、神経による消化管ホルモン分泌調節の新たな機序が想定された。

研究発表

Autoradiographic study of motilin binding sites in the rabbit gastrointestinal tract.

T. Sakai, M. Satoh, K. Sonobe, M. Nakajima, Y. Shiba, Z. Itoh

Regulatory Peptides 53:249-257, 1994

Biotinyl C-terminal-extended motilin as a biologically active receptor probe.

T. Sakai, M. Satoh, H. Hayashi, K. Fujikura, I. Sano, H. Koyama, K. Tatemoto,

Z. Itoh

Peptides 15:257-262, 1994

EM574, an Erythromycine Derivative, is a potent motilin receptor agonist in human gastric antrum.

M. Satoh, T. Sakai, I. Sano, K. Fujikura, H. Koyama, K. Ohshima, Z. Itoh, S. Omura

J. Pharmacol. Exp. Ther. 272:574-579, 1994

Localization of motilin immunopositive cells in the rat intestine by light microscopic immunocytochemistry.

T. Sakai, M. Satoh, H. Koyama, K. Iesaki, M. Umahara, K. Fujikura, Z. Itoh

Peptides 15:987-991, 1994

Immunocytochemical localization of motilin-containing cells in the rabbit gastrointestinal tract.

M. Satoh, T. Sakai, H. Koyama, Y. Shiba, Z. Itoh

Peptides 16:883-887, 1995

Control of gallbladder contractions by cholecystokinin through cholecystokinin-A receptors in the vagal pathway and gallbladder in the dog.

K. Sonobe, T. Sakai, M. Satoh, N. Haga, Z. Itoh

Regulatory Peptides 60:33-46, 1995

Distribution of enteric neural peptide YY in the dog gastrointestinal tract.

K. Iesaki, T. Sakai, M. Satoh, N. Haga, H. Koyama, Z. Itoh

Peptides 16:1395-1402, 1995

Motilin Release in perfused isolated canine duodenal epithelial cells.

T. Sakai, M. Kato, H. Koyama, I. Sano, M. Satoh, M. Nakajima, Z. Itoh

Gastroenterology 106:A562, 1994

モチリン

坂井貴文、伊藤 漸

臨床検査 38:207-209, 1994

イヌ胆嚢におけるCCK受容体の局在とその性質

園部光一、坂井貴文、佐藤 稔、田村達也、伊藤 漸、佐埜 勇

J. Smooth Muscle Res. 30:354-357, 1994