HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	炎症性腸疾患における腸管神経の機能変化に対するグリア細胞の関与
Author(s)	村上, 真津香
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第9046号
Issue Date	2009-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k9046
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/38246
Type	theses (doctoral)
File Information	murakami.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

炎症性腸疾患における
腸管神経の機能変化に対する
グリア細胞の関与

村上真津香

目次

	頁
略語表	1
Ⅰ 諸論	2
Ⅱ 実験方法	7
A. 新生ラット小腸の筋層間神経叢の分離法	7
B. 分離筋層間神経叢細胞の培養法	8
C. 細胞内 Ca^{2+}濃度測定法	9
D. 細胞膜電流及び膜電位測定法	10
E. 免疫細胞染色法	10
F. RT-PCR 法及び real-time PCR 法	12
G. Prostaglandin E_2測定法	14
H. Interleukin-1β測定法	15
I. 使用溶液及び試薬	15
J. 統計処理	17
Ⅲ 実験成績	18
A. 初代培養筋層間神経叢の構成細胞	18
B. 神経細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度に対する bradykinin 作用	20
1. Calbindin 染色性による差異	20
2. Bradykinin 濃度依存性	22
3. Bradykinin 受容体サブタイプ	24
4. Ca^{2+}動員機構	27
5. Cyclooxygenase-prostaglandins 系の関与	29

C. Bradykinin による prostaglandin E_2 放出 31

D. 神経細胞と腸管グリア細胞の相互作用の検討 33

1. Bradykinin 反応に対する細胞密度の影響 33

2. 腸管グリア細胞の密度と bradykinin 反応 35

E. 神経細胞膜電位に対する bradykinin 作用 37

1. 脱分極反応 37

2. 電流パルスによる活動電位発生への影響 38

F. 腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$に対する bradykinin 作用 41

G. 炎症性物質添加培養による影響 44

1. 共培養への LPS 及び炎症性サイトカイン作用 44

2. 腸管グリア細胞純培養への LPS 及び interleukin-1β作用 45

3. 腸管グリア細胞の密度と LPS 及び interleukin-1β作用の関係 47

H. LPS による interleukin-1β放出 51

I. 炎症性物質作用に関与する bradykinin 受容体サブタイプ 51

1. Interleukin-1β処置培養 51

2. LPS 処置培養 59

3. RT-PCR 及び real-time PCR 62

4. 免疫細胞染色 62

J. Bradykinin による prostaglandin E_2 放出への影響 65

1. Interleukin-1β処置による変化 65

2. 腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$反応との関与 68

K. Interleukin-1β作用への cyclooxygenase-prostaglandins 系の関与 70

1. Phospholipese A_2 抑制薬及び cyclooxygenase 抑制薬の効果 70

2. 免疫細胞染色 73

Ⅳ 考察 75

A. 新生ラット小腸筋層間神経叢の初代培養細胞の構成 75

B. 筋層間神経細胞に対する bradykinin 作用 78

C. 神経細胞の bradykinin 反応に対する腸管グリア細胞の関与 79

D. Prostaglandin E_2 による増強作用に関与する EP 受容体サブタイプ 81

E. 腸管グリア細胞を介する炎症性サイトカインの作用 82

F. 腸管グリア細胞における特異的蛋白発現による神経機能への影響 83

G. *In vitro* 炎症モデルと炎症性腸疾患病態の相同性 84

Ⅴ 総括 86

謝辞 91

参考文献 92

英文抄録 102

略語表

Ara-C	cytosine β -D-arabinofranoside
BK	bradykinin
CNS	central nervous system: 中枢神経系
COX	cyclooxygenase
ENS	enteric nervous system: 腸管神経系
GFAP	glial fibrillary acidic protein: グリア線維性酸性蛋白質
IBD	inflammatory bowel disease: 炎症性腸疾患
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist
IL-1β	interleukin-1β
IP_3	inositol 1,4,5-trisphosphate
LPS	lipopolysaccharide: リポ多糖体
NGF	nerve growth factor
NF-κB	nuclear factor- κB
NSCC	non-selective cation channel: 非選択的陽イオンチャネル
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PGE_2	prostaglandin E_2
PGP9.5	protein gene product 9.5
PKC	protein kinase C
PLA_2	phospholipase A_2
PLC	phospholipase C
TLR-4	toll-like receptor 4
TNF-α	tumor necrosis factor-α
Triton-PBS	0.3% Triton X-100 を含む 0.01 M リン酸緩衝生理食塩液
VDCC	voltage-dependent Ca^{2+} channel: 電位依存性 Ca^{2+}チャネル
$[Ca^{2+}]_i$	intercellular Ca^{2+} concentration: 細胞内 Ca^{2+}濃度
$\Delta[Ca^{2+}]_i$	$[Ca^{2+}]_i$ 反応の増加分（最大反応から刺激前の値を引いた値）

Ⅰ 諸論

腸管神経系（enteric nervous system: ENS）は胃腸管に広く分布する末梢神経組織であり、神経細胞と腸管グリア細胞から成る神経節が神経軸索により互いに連結し、網目状構造の神経叢を形成する。ENS は主に粘膜下神経叢（Meissner's plexus）と筋層間神経叢（Auerbach's plexus）の 2 種類の神経叢から成り、これらの神経叢も互いに連絡し、統合的に機能する。ENS は中枢神経系（central nervous system: CNS）からの入力を受けて蠕動運動、局所免疫、血流や分泌等の様々な腸管機能を調節するが、CNS から独立しても腸管の諸機能を制御しうる（Goyal & Hirano, 1996; Furness, 2006b）。

ENS を構成する神経細胞は、その機能から 1) 内在性一次知覚神経、2) 運動神経或いは 3) 介在神経に分類される。この機能的分類はモルモットやマウスにおいて良く研究されており、神経細胞の形態学的特徴、特異的蛋白質に対する免疫染色性或いは電気生理学的特徴により同定されている（Hu *et al.*, 2003; Furness, 2006a）。Dogiel によって行われた体系的な研究によると、腸管筋層間神経叢には大きく分類して 2 種類の形態の神経細胞が存在する。即ち、扁平な輪郭の細胞体に 4～20 の樹状突起と 1 本の長く伸長する軸索を持つ Dogiel type I 神経細胞と、卵形の細胞体に 3 つ以上の軸索を有する Dogiel type II 神経細胞である。この Dogiel type II 神経細胞は Ca^{2+}結合蛋白である calbindin に免疫陽性を示し、機能的には一次知覚神経に分類される。一方、Dogiel type I 神経細胞は calbindin を発現せず、機能的にはその 8 割が運動神経、2 割が介在神経であることが報告されている。この 3 種類の神経によって内在性反射回路が ENS 内に構成され、興奮性神経と抑制性神経が調和し、機能を発揮する（Furness, 2006a）。これらの腸管神経細胞における形態学的特徴と機能の相関は、モルモット或いはマウス以外の哺乳類でも良く保存される（Brehmer *et al.*, 1999, Peters *et al.*,

1991, Furness, 2006a）。

前述の神経細胞に加え、腸管グリア細胞も ENS の重要な構成要素の一つである。ENS は膠原線維に乏しい組織であるため、従来から腸管グリア細胞は ENS の構造支持を担う要素であると考えられていた。ENS と同様、CNS においてもグリア細胞の一つである星状膠細胞（アストロサイト）の主な役割は神経構造保持であると考えられていたが、それに加えて、神経細胞に対して栄養を供給し、イオン環境を整える機能を持つことも明らかになっている。更に最近では、神経突起伸長やシナプス伝達の制御や神経伝達物質に対する受容体の発現が確認され、より直接的に神経機能調節に関与することが示唆されている（Cabarrocas *et al.*, 2003; Rühl *et al.*, 2004; Rühl, 2005）。腸管グリア細胞はグリア線維性酸性蛋白質（glial fibllial acids protein: GFAP）の発現や細胞外陽イオンの取り込み、神経栄養因子の放出などアストロサイトに類似した特徴を有するため、ENS 機能を調節する可能性が示唆されている（Hoehner *et al.*, 1996; Bär *et al.*, 1997; Janigro *et al.*, 1997; Hanani *et al.*, 2000; Walz, 2000; Wu *et al.*, 2004; von Boyen *et al.*, 2004; 2006）。事実、遺伝子改変により腸管グリア細胞を欠損させた動物では、神経伝達物質の発現変化が起こること（Bush *et al.*, 1998; Cornet *et al.*, 2001）、腸管グリア細胞の代謝阻害により粘膜上皮からの分泌や腸管蠕動運動が抑制されることが示されている（Nasser *et al.*, 2006）。それ故 ENS において、腸管グリア細胞が腸管神経機能を調節する可能性が考えられる。

Bradykinin（BK）は強力な発痛物質のひとつであり、組織損傷に伴って活性化された血漿カリクレイン或いは組織カリクレインの作用により、キニノーゲンから産生される。産生された BK は侵害受容神経の興奮、血管内皮細胞の収縮による血管透過性の亢進、一酸化窒素産生による平滑筋の弛緩による血管拡張等を引き起こし、重要な炎症メディエーターとして作用する。これらの BK による反応は細胞膜上に存在する特異的受容体を介するが、この受容体はリガンド親和性により薬理学的に B1 と B2 のサ

ブタイプに分類されている。B2 受容体は様々な組織や細胞に遍在する一方で、B1 受容体は生理的条件下の発現は低く、病態において発現誘導される（Prado *et al.*, 2002）。近年、両受容体をコードする遺伝子が見出され、B1 受容体と B2 受容体のアミノ酸配列は互いに 36%の相同性を持つことが報告されている。両受容体は共に G 蛋白質共役型受容体ファミリーに属し、$G_{q/11}$型蛋白質に共役する。下流にはイノシトール代謝経路を有し、phospholipase C（PLC）活性化による inositol 1,4,5-trisphosphate（IP_3）産生を介して細胞内 Ca^{2+}動態変化を引き起こす。更に、B2 受容体については phospholipase A_2（PLA_2）活性化と cyclooxygenase（COX）作用を介してエイコサノイドが合成されることが知られている（Prado *et al.*, 2002）。

クローン病と潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease: IBD）において血漿及び組織カリクレインの活性化が示されている（Stadinicki *et al.*, 2003）。IBD のモデル動物においても同様なカリクレインの活性化が報告されている（Stadnicki *et al.*, 1996; 1997）。IBD の病態の一因として、炎症刺激により ENS 機能が変化した結果生じる腸管機能異常が挙げられている（Wood, 2007; Villanacci *et al.*, 2008）。腸管においては、BK は平滑筋収縮（Regoli & Barabe, 1980; Kachur *et al.*, 1987）、粘膜からの陰イオン分泌（Kachur *et al.*, 1987; Beltinger *et al.*, 1999）に加え、筋層間神経叢からの acetylcholine 放出を促すことが報告されている（Goldstein *et al.*, 1983; Yau *et al.*, 1986）。それ故、IBD 病態において BK が ENS 機能を変化させると考えられるが、ENS への BK 作用については殆んど調べられておらず、わずかに摘出モルモット腸管神経叢-縦走筋標本を用いた実験が報告されているのみである（Hu *et al.*, 2003; 2004a; 2004b）。この報告によれば、BK は腸管神経細胞を脱分極させ、この作用は COX 活性化による prostaglandins（PGs）放出を介するが、その詳細なメカニズムや PGs の由来等については殆んど明らかにされていない。更に腸管グリア細胞との相互作用も不明のままである。本研究の第一の目的は、ENS に対する BK 作用機構

とそれに対する腸管グリア細胞の関与の有無を明らかにすることである。

IBD 患者の組織中及び血清中には interleukin-1β（IL-1β）や tumor necrosis factor-α(TNF-α)を含む炎症性サイトカインの著しい増加が認められ(Ligumsky *et al.*, 1990; MacDonald *et al.*, 1990; Reinecker *et al.*, 1993; Schreiber *et al.*, 1999)、更に細菌由来リポ多糖体（lipopolysaccharide: LPS）を含む細菌性内毒素が血清中に検出される（Caradonna *et al.*, 2000)。腸管グリア細胞の純培養を用いた *in vitro* 実験により、これらの炎症性物質が腸管グリア細胞の GFAP 発現を増強させることが示されている（von Boyen *et al.*, 2004)。更に、この変化は潰瘍性大腸炎及びクローン病患者の生検腸管における腸管グリア細胞にも認められる特徴的な変化である（Cornet *et al.*, 2001, von Boyen *et al.*, 2004)。炎症性刺激による ENS における神経可塑性変化が IBD 病態の一因である可能性も報告されており、この変化への腸管グリア細胞の関与が考えられている（Bush, 2002; Lomax *et al.*, 2005; Vasina *et al.*, 2006; Neunlist *et al.*, 2008; Villanacci *et al.*, 2008)。腸管グリア細胞は炎症性サイトカインを放出し、また炎症性サイトカインに対する受容体を発現しているので、免疫反応維持や増強に関与する可能性がある（Cabarrocas *et al.*, 2003; Rühl *et al.*, 2004; Rühl, 2005)。それ故、神経機能を腸管グリア細胞が調節すると仮定すれば、炎症性刺激による腸管グリア細胞の変化が ENS 機能変化を引き起こすかも知れない。IBD 患者の生検腸管において B1 受容体発現の変化が報告されていることから、ENS への BK 作用も変化すると考えられる（Stadnicki *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2008; Marceau & Regoli; 2008)。本研究の第二の目的は、まず IBD で産生増加が報告されている LPS 及び炎症性サイトカインが ENS に与える影響を調べ、次いでそれに対する腸管グリア細胞の関与を検討することである。

細胞内 Ca^{2+}濃度は（$[Ca^{2+}]_i$）は細胞膜に存在するリガンド作動性陽イオンチャネル、電位依存性 Ca^{2+}チャネル（VDCC）やストア作動性 Ca^{2+}チャネルによる細胞外からの Ca^{2+}取り込み、または細胞内 Ca^{2+}ストアである小胞体によって調節されている。

細胞内の遊離 Ca^{2+}は Ca^{2+}依存性蛋白質機能調節による細胞内情報伝達の制御や遺伝子の発現等、細胞の様々な機能を調節しているセカンドメッセンジャーであり、更に神経細胞では伝達物質の放出にも関わる（Kennedy, 1989; Berridge, 1998）。それ故、細胞機能を理解する上で$[Ca^{2+}]_i$の解析は極めて有用である。本研究室では、新生ラット小腸の筋層間神経叢の初代培養を用いた実験系を確立している（Ohta *et al.*, 2005）。この初代培養には腸管神経細胞と腸管グリア細胞が含まれ、神経細胞は軸索を伸ばしてネットワークを形成する。筋層間神経叢を構成する個々の細胞の$[Ca^{2+}]_i$反応を調べるのにこの初代培養は非常に有用であり、同時に神経細胞の反応への腸管グリア細胞の関与を検討することが可能である。また、マウスの摘出気管において、炎症性サイトカイン存在下で器官培養することにより B1 受容体作動薬作動薬による気管収縮反応が変化し、*in vivo* における気管炎症時の収縮性の異常を再現できると報告されている（Zhang *et al.*, 2007）。それ故、様々な条件下で筋層間神経叢の培養細胞を LPS 或いは炎症性サイトカインを添加して培養することにより、*in vitro* で炎症性刺激が ENS に与える影響について検討した。

本研究では、新生ラット小腸の筋層間神経叢より得られた初代培養を用いて、神経細胞及び腸管グリア細胞機能に対する BK 作用について、蛍光色素を用いた Ca^{2+}イメージング法による$[Ca^{2+}]_i$動態変化やパッチランプ法による細胞膜電位の変化を解析した。又、特異的な作動薬或いは拮抗薬、抑制薬を用いて薬理学的に解析した。加えて、RT-PCR 法及び real-time PCR 法による遺伝子レベルの解析や免疫細胞化学法による蛋白発現の解析を行った。

なお、本論文の主要な部分は誌上公表されている（Murakami *et al.*, 2007; 2008; *in press*）。

Ⅱ　実験方法

本研究は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会に認可された（第 08-0185 号）。また、全ての実験及び実験動物の取り扱いは Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International（国際実験動物管理公認協会）の推奨する実験動物の管理と使用に関する指針（Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; 米国学術研究会議（NRC）、1996）に従って行った。

A.　新生ラット小腸の筋層間神経叢の分離法

筋層間神経叢の分離は、ラット（Wistar、1 - 5 日齢、雌雄）を用いて、Ohta ら（2005）の方法に準じて行った。新生ラットをハロタンにより麻酔した後に断頭し、腹部から他の臓器と共に小腸を摘出して分離液（後述）を満たしたシャーレに移した。この腹部臓器より腸管以外の臓器と十二指腸・盲腸・結腸を除去して空回腸のみにした。更に、実体顕微鏡下で腸間膜及び血管を取り除いた後に、眼科用ピンセットにより腸管内側の粘膜を傷つけない様に漿膜面より縦走筋層と共に筋層間神経叢を剥き取り、別のシャーレに満たした氷冷分離液に移した。この得られた筋層間神経叢‐縦走筋層のシートを 2×2 mm 以下の小片に細分し、1 ml の分離液と共にポリプロピレン遠心管に移し、collagenase type Ⅱ（1 mg/ml）と DNase（0.5 mg/ml）を添加して、37℃ 5% CO_2 インキュベーターに 1 時間静置した。この酵素処理した組織小片を分離液と共にボルテックスミキサーで 15 秒攪拌し、氷中に静置して酵素分離の不十分な組織小片を沈殿させた後、分離細胞が浮遊する上清をピペットで回収した。残った組織小片に再度 collagenase type Ⅱ（1 mg/ml）と DNase（0.5 mg/ml）を含む分離液 1 ml を加えて

37℃ 5% CO_2 インキュベーターに 30 分静置した後に、同様の処理により機械的に筋層間神経叢の分離細胞を回収した。この過程は更にもう一回行った。これら 3 回の酵素処理でも組織小片が残ったときには、1 ml の分離液を加えて穏やかに 30 回ピペッティングし、機械的に分離した。

B. 分離筋層間神経叢細胞の培養法

筋層間神経叢の分離細胞が含まれる細胞浮遊液を 200×g、4℃、2 分間で遠心して上清を除去し、得られた沈殿に培養液（後述）1 ml を加えて更に同条件で遠心した。この遠心上清を除去し、培養液を 2 ml 加えて得られた沈殿を懸濁し、φ100 μm メッシュを用いて濾過した。この細胞浮遊液をシャーレ上に置いた poly-D-lysine 処理カバーグラスに 80 μl ずつ滴下し、37℃ 5% CO_2 インキュベーター内で静置することにより分離細胞をカバーガラスに接着させた。この静置時間は、筋層間神経細胞と腸管グリア細胞から成る共培養を作製する場合には 1 時間、腸管グリア細胞のみの純培養を作製する場合には 5 分間とした。低密度培養を作製するときには、メッシュで濾過した細胞浮遊液を 1000 倍希釈し、80 μl ずつカバーガラスに滴下し、その後インキュベーター内に 1 時間静置した。それぞれ静置後、シャーレに培養液を加えて接着しなかった細胞を洗浄し、更に 3 ml の培養液を加えて 37℃ 5% CO_2 インキュベーターで 48 時間培養した。培養液は 24 時間毎に交換した。なお、腸管グリア細胞は分裂細胞であるが、神経細胞は非分裂細胞であることから、共培養において腸管グリア細胞の数を減らすときには、培養液に核酸合成阻害薬である cytosine β-D-arabinofranoside（Ara-C、10 μM）を添加した。LPS 或いは炎症性サイトカインの培養筋層間神経叢細胞への作用を調べるためには、培養液に何も添加せずに 24 時間培養した後に、LPS、IL-1β或いは TNF-α

を添加して更に 24 時間培養した。

C.　細胞内 Ca^{2+}濃度測定法

細胞内 Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_i$）測定は、Ca^{2+}蛍光指示薬である fura-2 を用いて行った。細胞内への fura-2 の負荷は、膜透過性の高い fura-2 acetoxymethyl ester（10 μM）と cremophor EL（0.004%）を含む栄養液（後述）を細胞が培養されたカバーガラス上に滴下し、室温で 1.5 時間静置することで行った。Fura-2 処置した細胞は、$[Ca^{2+}]_i$ 測定に供するまで栄養液中に氷冷保存した。このカバーグラスを蛍光画像解析装置（Aqua Cosmos, Hamamatsu Photonics, Japan）を取り付けた倒立顕微鏡（Diaphoto 300, Nicon, Japan）のステージ上の実験槽に固定し、細胞近傍に置いたマイクロチューブから栄養液を 1 ml/min の速さで常に灌流した。薬物投与もこのチューブを介して行った。実験は全て室温で行った。蛍光画像解析装置は、CCD カメラ、波長切替装置光源、これらをコンピューター上で操作するためのソフトウェアから構成され、150 W キセノンランプから得た 340 nm と 380 nm の 2 波長の励起光により交互に 0.354 秒間ずつ細胞を照射した。340 nm 及び 380 nm の 2 波長により励起された 500 nm の蛍光量を 1.5 秒間隔で CCD カメラにより検出し、蛍光比（F340 / F380）をコンピューターにより算出した。

Grynkiewicz ら（1985）の式：$[Ca^{2+}]_i = Kd\beta(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を推定した。この式において、R は 340 nm と 380 nm の励起光により励起された fura-2 の蛍光比（F340 / F380）、R_{min} は Ca^{2+}非存在下での蛍光比、R_{max} は Ca^{2+}飽和状態での蛍光比、Kdβは見かけの解離定数を表す。細胞内における R_{min} と R_{max} は、細胞質が有する粘性により 15%低いと報告されている（Poenie *et al.*, 1986）。このことを考慮し

て計算された値はそれぞれ R_{min}=0.153、R_{max}=3.66 及び Kdβ=1.265 であり、本実験においてはこれらの値を用いて$[Ca^{2+}]_i$を算出した。

D.　細胞膜電流及び膜電位測定法

細胞膜全体の膜電流及び膜電位変化をホールセルボルテージクランプ法及びホールセルカレントクランプ法（Hamill *et al.*, 1981）により測定した。パッチクランプ用電極には、芯入りガラス管（GD-15, 1.5×90 mm, Narishige Scientific Instrument Lab., Japan）を用いて電気抵抗が 3-5 MΩになるように作製したものを用いた。倒立顕微鏡（Diaphoto 300, Nicon）のステージ上に設置した実験槽に細胞が付着したカバーガラスを載せて栄養液を常時灌流し、膜電流はパッチクランプ用増幅器（AXOPATCH200B, Axon, USA）を用いて 5 kHz でサンプリングし、AD コンバーター（PowerLab System, AD instruments, Australia）を介してコンピューター上の専用ソフトウェア（Scope 6.1, AD instruments）によって記録し、解析した。

E.　免疫細胞染色法

免疫細胞染色は、培養筋層間神経叢細胞或いは筋層間神経叢‐縦走筋シート標本について、それぞれ固定、ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応、封入の順で行った。なお免疫細胞染色において、目的とする蛋白、使用したブロッキング用血清、一次抗体とその希釈率の組み合わせは以下の表に示した。また、二次抗体は、一次抗体がマウス由来及びウサギ由来の組み合わせであるときは Alexa Flour 456 goat anti-mouse IgG と Alexa Flour 488 goat anti-rabbit IgG（それぞれ 10 μg/ml、Molcular

Probes、USA）を、マウス由来及びヤギ由来の組み合わせであるときは Alexa Flour 456 donkey anti-mouse Ig と Alexa Flour 488 donkey anti-goat IgG（それぞれ 10 μg/ml、Molcular Probes）を組み合わせて用いた。

目的蛋白	一次抗体（希釈率）		製造元
PGP9.5	rabbit antiserum to PGP9.5	(1：1000)	Chemicon International, USA
	mouse monoclonal anti-PGP9.5	(1：50)	Abcam, UK
S100	rabbit antiserum to S100	(1：2000)	Sigma, USA
	mouse monoclonal anti-S100	(1：100)	Chemicon International
calbindin	mouse monoclonal anti-calbindin	(1：200)	Sigma
B1 receptor	goat antiserum to B1 receptor	(1：50)	Santa Cruz Biotechnology,USA
B2 receptor	mouse monoclonal anti-B2 receptor	(1：200)	BD Transduction Laboratories, USA
COX-2	rabbit antiserum to COX-2	(1：500)	NeoMarkers, USA

筋層間神経叢細胞についての免疫細胞染色は、カバーグラスに付着した細胞を用いて行った。まず、4% paraformaldehyde（PFA）を含む 0.1 M リン酸緩衝液にカバーガラスを 4℃で 12 時間浸漬することで筋層間神経叢細胞を固定した。以下の過程では、0.3% Triton X-100 を含む 0.01 M リン酸緩衝生理食塩液（Triton-PBS）を溶媒或いは洗浄液として用いた。固定後、まず洗浄液中で 5 分間振盪して洗浄液を交換する工程を 1 回としたとき、3 回の洗浄を行った。その後、使用する一次抗体がヤギ以外の由来であるときは 10%ヤギ血清を、ヤギ由来の一次抗体を用いるときは 10%ロバ血清をカバーガラス上に滴下し、室温の湿潤容器内に 1 時間静置することでブロッキングした。次いで、ブロッキング溶液をカバーガラスから除去後、目的とする蛋白に応じてそれぞれの希釈率の一次抗体を滴下し、室温の湿潤容器内で 1.5 時間静置した。各一次抗体の希釈には、ブロッキングに用いた血清 2%を含む Triton-PBS を使用した。一次抗体反応後、Triton-PBS で 5 分間の洗浄を 4 回行い、それぞれの一次抗体に応じた二次抗体溶液を滴下して室温の湿潤容器内で 1 時間静置した。核染色を行う場合には、二次

抗体の希釈液中に 10 μg/ml Hoechst33542 を添加した。二次抗体反応後、Triton-PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、蒸留水で更に洗浄し、蛍光染色用封入剤によりスライドガラス上に封入した。

筋層間神経叢‐縦走筋シート標本の固定は、虫ピンを用いてシリコンラバー上に十分にシート標本を伸展させた上で、4% PFA を含む 0.1 M リン酸緩衝液に室温で 24 時間浸漬して行った。固定後、組織片から虫ピンを外し、以降の工程を培養細胞についての免疫細胞染色と同様に行った。但し 1 回の洗浄時間は 15 分とし、ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応は 24 時間、振盪させながら行った。二次抗体反応後に洗浄したシート標本は、カバーガラスと蛍光染色用封入剤によりスライドガラス上に封入した。

これらの免疫細胞染色標本は作製後 6 時間以内に、共焦点顕微鏡（IX70, Olympus）を用いて、Ar/UV レーザー、He/Ne レーザーを照射して観察した。

F. RT-PCR 法及び real-time PCR 法

RNA 抽出用試薬は RNase の混入を避けるため、全て 0.1%ジエチルカーボネイト処理した蒸留水を用いて調整した。新生ラット筋層間神経叢の培養細胞からの全 RNA 抽出は、フェノール／チオアシン酸グアニジンを含む ISOGEN™ 試薬（Nippongene, Japan）を用いて行った。次にこの全 RNA 溶液に 20 mM Tris‐HCl（pH 8.4）、2 mM $MgCl_2$、50 mM KCl、1 mM DTT、0.02 unit DNase（Promega, USA）、0.2 unit RNase inhibitor（Promega）を添加し、37℃で 30 分間 DNase 処理を行った。等量のフェノール／クロロフォルムを加え、攪拌、遠心（300×g、10 分間、室温）した後、水層に等量の 5 N 酢酸アンモニウムと 5 倍容のエタノールを加え、－80℃でエ

タノール沈殿させた。融解後、遠心（2000×g、10 分間、4℃）により得た沈殿を 75%エタノールにより洗浄、乾燥後、蒸留水で溶解し、全 RNA を調製した。全 RNA 量は 260 nm の吸光測定により算定した。次にこの全 RNA より oligo（dT）プライマーを用いて cDNA 合成を行った。即ち、全 RNA（5 μg）に oligo（dT）12-18（25 ng）を加えて 70℃で 10 分間加熱後、直ちに氷冷し、次いで dNTP 混合液（0.5 mM）、DDT（10 mM）、RNase inhibitor（0.5 unit）、Tris-HCl（pH 8.3, 50 mM）、KCl（75 mM）、$MgCl_2$（3 mM）、逆転写酵素（200 unit, Invitrogen）を加えて 42℃で 55 分間、及び 70℃で 15 分間処理することにより、RNA に相補的な 1 本鎖 DNA（cDNA）を合成した。B1、B2 受容体遺伝子に対する PCR プライマーとして B1 受容体（Gene bank accession No. NM030851, forward: 5'-TCACCTGGCTAACTTGGCGGC-3'; reverse: 5'-CGTTCAACTCTCCACCATCCTT-3'）、B2 受容体（No. M59967, forward: 5'-TGAGATCTACCTGGGCAACC-3'; reverse: 5'-CATCTCGTTTTCCTCAGC-3'）を、ポジティブコントロールとしてラット β-actin（No. J00691, forward: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'; reverse: 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'）を用いた。RT-PCR 反応は cDNA を鋳型として Taq DNA polymerase（2.5 unit, Promega）、$MgCl_2$（1.5 mM）、dNTP 混合液（0.2 mM）、各 forward と reverse のプライマー（25 pM）を混合し、Gene Amp サーマルサイクラー（Applied Biosystems, USA）を用いて行った。PCR 反応として 94℃で 30 秒間（熱変性）、55℃で 30 秒間（アニーリング）、72℃で 30 秒間（伸長反応）の処理を 30 サイクル行った。PCR 産物は ethidium bromide を含む 2%ゲルに電気泳動後、トランスイルミネーター（Vilber Lourmat, Germany）によりバンドを検出した。PCR 産物は T-vector（Promega）によるサブクローニング後、プラスミド調整し、DNA シークエンス（CEQ8000, Beckman Coulter, USA）により目的遺伝子であることを確認した。

Real-time PCR は無処置及びサイトカイン処置した培養筋層間神経叢細胞について、SYBR® Green PCR Master Mix（Applied Biosystems, USA）と前述した B1 受容体、B2 受容体、β-actin それぞれのプライマーを用いて、ABI7300 Real-time PCR System（Applied Biosystems）により行った。このとき、PCR 反応として 95℃で 10 秒間（熱変性）、60℃で 15 秒間（アニーリング）、72℃で 30 秒間（伸長反応）の処理を 40 サイクル行い、各サンプルについてサイクル数に対する増幅率を経時的に測定した。それぞれのβ-actin 発現レベルに対する B1 受容体或いは B2 受容体の発現レベルを $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method により算出した。

G. Prostaglandin E_2 測定法

カバーガラス上に培養した筋層間神経叢細胞を培養液から取り出し、栄養液（後述）により洗浄した。水分を十分に取り除いたカバーグラスをパラフィルム上に置き、栄養液のみ或いは各阻害薬を含む栄養液をそれぞれ 250 μl をカバーガラス上に滴下した。室温で 10 分間静置した後に、カバーガラスのみを別のパラフィルム上に置いた。コントロール群には再度栄養液のみを、BK 投与群には BK を含む溶液を、阻害薬群には阻害薬と BK を含む栄養液をそれぞれ 250 μl 滴下し、室温で 10 分間静置した。次いでパラフィルム上よりカバーガラスのみを取り除き、パラフィルム上に残された栄養液を回収してサンプルとした。これらのサンプルは 2000×g で 5 分間遠心することで含まれる不純物を除いた後、測定まで氷中に保存した。サンプル中の PGE_2 量は prostaglandin E_2 量測定キット（R&D system, Switzerland）を用いて測定した。

H.　Interleukin-1β測定法

カバーガラス上に培養した筋層間神経叢細胞を培養液から取り出し、水分を十分に取り除いた。このカバーガラスをシャーレに静置し、培養液のみ或いはLPS（0.1 μg/ml或いは10 μg/ml）を含む培養液を250 μlをカバーガラス上に滴下した。このカバーガラスを静置したシャーレを37℃ 5% CO_2インキュベーター内で6時間培養した後、各カバーガラスより培養液のみ回収してサンプルとした。これらのサンプルは速やかに2000×gで5分間遠心して不純物を除去し、測定まで氷中に保存した。サンプルに含まれるIL-1β量はinterleukin-1β測定キット（Invitrogen）を用いて測定した。

I.　使用溶液及び試薬

使用した溶液及び試薬は以下の通りである。

細胞分離・培養

分離液：Dulbecco's Modified Eagle's Medium 粉末を約 900 ml の超純水に溶かし、$NaHCO_3$を 3.7 g 添加した後に NaOH を用いて pH7.3 に調整し、1000 ml に秤量してフィルターにより濾過滅菌した。濾過滅菌後、penicillin（100 unit/ml）と streptomycin（100 μg/ml）を添加した。

培養液：M199 に 56℃、30 分間の処理により非働化した fetal bovine serum（10%）、penicillin（100 unit/ml）と streptomycin（100 μg/ml）を添加した。

細胞内 Ca^{2+}濃度測定及び膜電位測定

細胞内 Ca^{2+}及び膜電位測定に用いた細胞外液の組成を以下の表に示した。単位は mM **である。**pH **は** NaOH **により** 7.3 **に調整した。**

	NaCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	KCl	HEPES	gulcose	EGTA
栄養液・細胞外液	137	2.5	1.2	6	10	11	0
高濃度 K^+**溶液**	103	2.5	1.2	40	10	11	0
Ca^{2+}-free **溶液**	137	0	1.2	6	10	11	0.5

膜電位測定に用いた細胞内液の組成は、KCl; 140、$MgCl_2$; 1.2、ATP; 1、EGTA; 10（mM）**であり、**pH **は** KOH **で** 7.3 **に調整した。**

免疫細胞化学

リン酸緩衝液（PB）**：**Na_2HPO_4・$12H_2O$ **と** NaH_2PO_4・$2H_20$ **を** 77**：**23 **の割合で混合してストック用** PB（0.2 M）**を作製し、使用する際に** 2 **倍に希釈して用いた。**

リン酸緩衝生理食塩水（PBS）**：ストック用** PB（0.2 M）**を蒸留水で** 2 **倍希釈し、**1000 ml **に対して** 9.0 g **の** NaCl **を溶かして** PBS（0.1 M）**を作製した。またこれを蒸留水で** 10 **倍に希釈し、**PBS（0.01 M）**として使用した。**

試薬

A23187、BK fragment1-8、Dulbecco's modified Eagle's Medium（DMEM）、HOE140、M199、SC19220、Lys-des-Arg^9-BK、Lys-des-Arg^9-HOE140、U73122、aristolochic acid、bradykinin、cremophor EL、cytosine β-D-arabinofranoside（Ara-C）、indomethacin、interleukin-1β（IL-1β）、interleukin-1 receptor antagonist （IL-1ra）、lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 026:B6（LPS）、nimesulide、poly-D-lysine、prostaglandin E_2（PGE_2）、prostaglandin I_2（PGI_2）、sulprostone **は** Sigma **より購入**

した。Tumor necrosis factor-α（TNF-α）、DNase、adenosine 5'-triphoshate（ATP、Boeringer Ingelheim GmbH, Germany）、N-2-hydroxyethyl-piperazine-2-ethanonesulfonic acid（HEPES）、ethylene glycol bis（2-amino-ethyl-ester）tetraacetic acid（EGTA）は Dojindo（Japan）より購入した。Thapsigargin は Wako Pure Chemical Industories（Japan）より、fura-2 acetoxymethyl ester は Molucular probes より、fetal bovine serum（FBS）は Invitrogen（USA）より、collagenase type II は Worthington（USA）より、nicotine bitartrate は Nacalai tesque（Japan）より、streptomycin は Banyu（Japan）より、penicillin は Meiji Seika（Japan）よりそれぞれ購入した。

J．統計処理

データは平均値±標準誤差（mean ± S.E.M.）、*n* =例数で表示した。有意差検定は student *t* 検定により、多重比較検定は one-way ANOVA を用いた Tukey-Kramer 検定により行い、5%を統計的有意水準とした。

Ⅲ　実験成績

A.　初代培養筋層間神経叢の構成細胞

筋層間神経叢は神経細胞と腸管グリア細胞のみにより構成される叢神経節が神経軸索により連絡して形成される（Goyal & Hirano, 1996; Furness, 2006b）。本実験で用いた筋層間神経叢の初代培養細胞は、新生ラット小腸より縦走筋に付着した状態で筋層間神経叢を採取し、酵素処理により分離して作製したため、この両細胞以外が混在する可能性がある。そこで、この初代培養において筋層間神経細胞と腸管グリア細胞がどのような割合で存在するか、また、その他の細胞がどの程度含まれるかを検討するために、神経細胞特異的蛋白である protein gene product 9.5（PGP9.5）とグリアに特異的な Ca^{2+}結合蛋白である S100 に対する抗体と核染色色素である Hoechst33342 を用いて、筋層間神経叢の初代培養細胞を免疫染色した。図 1 は分離後、2 日間培養した細胞についての免疫染色像である。PGP9.5 に免疫陽性を示した細胞の割合は Hoechst33342 で核が染色された細胞（n=388）の 30%を占めた。これらの細胞は軸索を伸ばして他の細胞と連絡し、ネットワークを形成していた。免疫染色像において、この軸索の一部も PGP9.5 免疫陽性を示した。一方、透過像において扁平な細胞体を有する細胞の殆んどは S100 に免疫陽性を示し、核染色された細胞中の 68%であった。また、PGP9.5 と S100 の両方に免疫陽性を示す細胞もごくわずかではあるが存在した（1%未満）。さらに一部 PGP9.5 と S100 の両方に対して免疫陰性であった細胞も存在し（2%）、これらの細胞は線維芽細胞或いは平滑筋細胞であると考えられた。

以上の結果から、本実験に用いた筋層間神経叢の初代培養細胞はほぼ神経細胞と腸管グリア細胞により構成されることが分かった。なお、これより以降は便宜上、この筋層間神経叢より得られた初代培養を培養筋層間神経叢細胞と表現した。

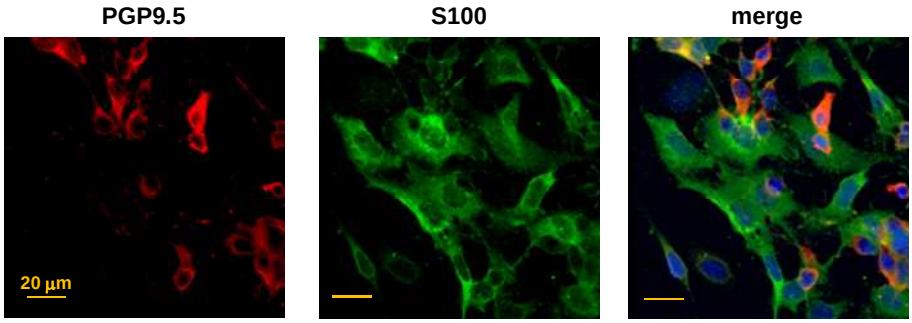

図 1.　筋層間神経叢の初代培養細胞における抗 PGP9.5 抗体（赤）、抗 S100 抗体（緑）と核染色色素 Hoechst33342（青）を用いた免疫染色。右にマージ像を示した。

B.　神経細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度に対する bradykinin 作用

1. Calbindin 染色性による差異

腸管神経細胞は、その機能から内在性一次知覚神経、運動神経或いは介在神経に分類され、これらの神経は細胞の形態学的特徴や特異的蛋白の発現などによって同定が可能である。Calbindin は一次知覚神経の特異的 Ca^{2+}結合蛋白であるために、そのマーカーとして多用される（Liu *et al.*, 1998）。本実験において、カバーガラス上に培養された神経細胞の形態に顕著な差異は認められなかった。それ故、一次知覚神経と運動神経或いは介在神経の間で BK に対する反応性に差があるか否かを検討するために、BK 反応を観察した後の培養筋層間神経叢細胞について、calbindin に対する免疫染色性を調べた。同時に、筋層間神経叢‐縦走筋シート標本についても免疫染色を行った。

培養筋層間神経叢細胞について、PGP9.5 と calbindin それぞれに対する抗体を用いて二重染色した像を図 2A に示した。この染色結果より、calbindin 免疫陽性は PGP9.5 免疫陽性細胞のみにおいて示され、PGP9.5 免疫陽性細胞中で calbindin 免疫陽性を示した細胞は 108 細胞中 7 細胞であり、全神経細胞中の 7.4%であることが分かった。また、染色像において丸印で示した calbindin 免疫陽性、陰性神経細胞に BK（100 nM）を 60 秒間投与した時の$[Ca^{2+}]_i$変化を図 2B に示した。Calbindin 免疫陽性と陰性の両方の神経細胞において BK により$[Ca^{2+}]_i$増加反応が起こり、加えてこの$[Ca^{2+}]_i$反応の大きさは同程度であった。これらの結果から、一次知覚神経と運動神経・介在神経において、BK に対する反応性に差は無いと考えられた。図 2C には筋層間神経叢‐縦走筋シートのホールマウント標本について、PGP9.5 と calbindin それぞれに対する抗体を用いて免疫染色した結果を示した。分離前の筋層間神経叢において、PGP9.5 免疫陽性細胞中で calbindin 陽性を示したのは 106 細胞中 3 細胞であった。

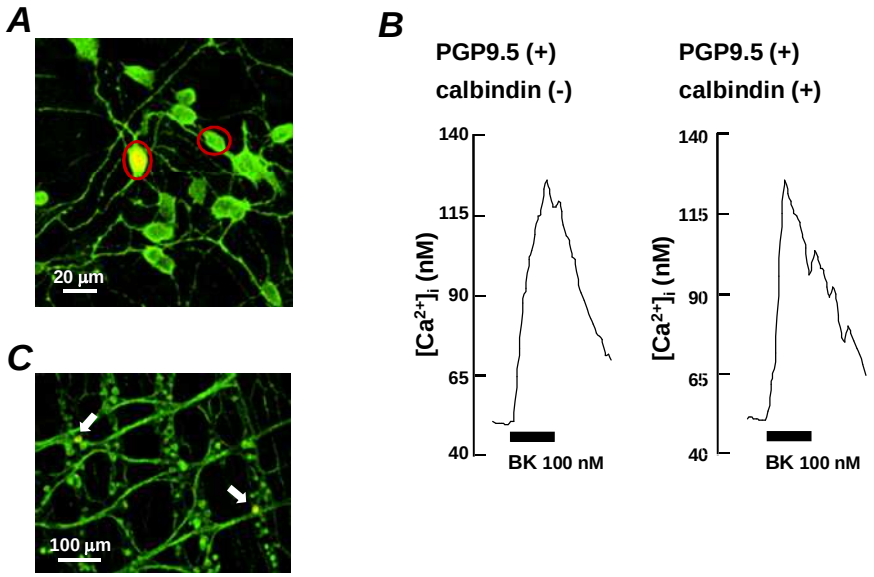

図 2.　ラット筋層間神経叢の神経細胞の同定

A：培養筋層間神経叢細胞における抗 PGP9.5 抗体と抗 calbindin 抗体を用いた免疫染色像。PGP9.5 免疫陽性は緑、PGP9.5 免疫陽性かつ calbindin 免疫陽性は黄で示されている。B：A における丸印の calbindin 免疫陽性及び免疫陰性神経細胞に対し、BK（100 nM、60 秒間）を投与したときの$[Ca^{2+}]_i$変化。両神経細胞とも、BK により同程度の$[Ca^{2+}]_i$上昇が認められた。C：筋層間神経叢‐縦走筋ホールマウント標本における抗 PGP9.5 抗体と抗 calbindin 抗体を用いた免疫染色像。矢印は calbindin 免疫陽性神経細胞を示す。

2. Bradykinin 濃度依存性

本研究室では、新生ラット小腸の培養筋層間神経叢細胞を用いた実験により、PGP9.5 への免疫染色性の有無と薬物反応の関係を報告している（Ohta *et al.*, 2005）。即ち、PGP9.5 免疫陽性細胞は nicotine 刺激により $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を生じるが、PGP9.5 免疫陰性細胞ではこの反応は観察されない。従って、nicotine により $[Ca^{2+}]_i$ 増加が認められた細胞を神経細胞と判定し、以下の実験を行った。

培養筋層間神経叢細胞において、様々な濃度の BK（100 pM~10 μM）を 60 秒間投与すると BK 濃度依存性に神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が増加し、1 μM で最大反応に達した（図 3A、B）。この濃度反応関係より算出された EC_{50} は 3.0 ± 0.9 nM であった。また、BK により $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を生じる神経細胞の割合も BK 濃度依存性に増加した（図 3C）。神経細胞に 100 nM BK を投与すると、投与直後に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、灌流液中から BK を除いてもこの $[Ca^{2+}]_i$ 増加は維持され、緩徐に静止レベルまで戻った。なお、非刺激時の神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は 48.2 ± 0.5 nM（n=322）であった。BK 受容体は G 蛋白共役型であり、この種の受容体は繰り返し刺激により脱感作され易いことが知られている（Gainetdinov *et al.*, 2004）。そこで次に、BK を繰り返し投与したときの $[Ca^{2+}]_i$ 変化について調べるため、神経細胞に BK（100 nM）を 15 分間隔で 2 回投与した。2 回目の刺激で生じた $[Ca^{2+}]_i$ 増加の大きさは初回刺激で生じた反応の 31.3%であり、神経細胞における BK 反応は著しく脱感作されることが分かった（データは示していない）。それ故、以降の実験では 90%以上の神経細胞が $[Ca^{2+}]_i$ 増加を示す濃度である 100 nM BK を単回適用したときの反応を解析した。

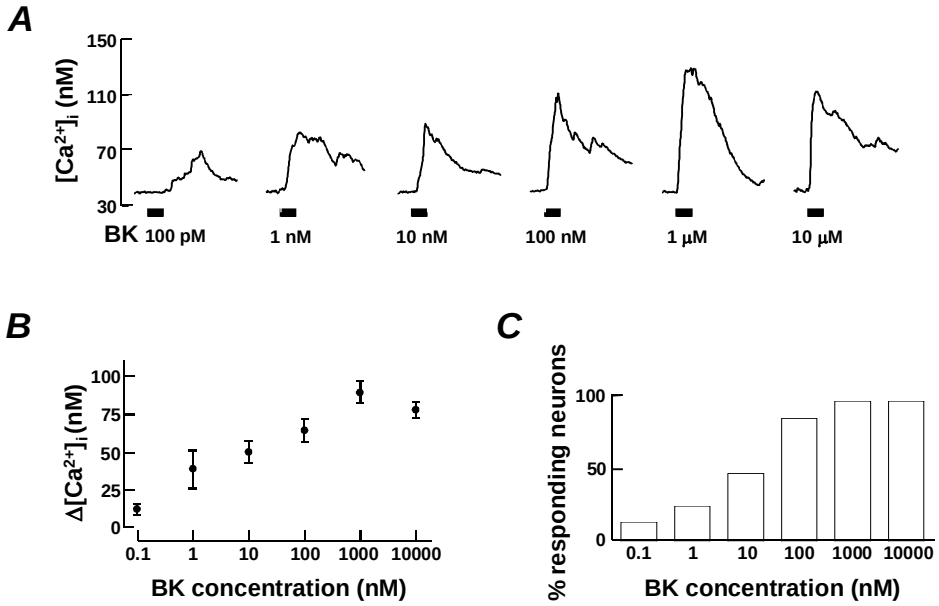

図 3.　神経細胞における bradykinin による濃度依存性$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応

A：100 pM～10 μM の BK（60 秒間）を投与したときのそれぞれの典型的な$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応。B：それぞれの濃度の BK 刺激による$[Ca^{2+}]_i$ 反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。C：それぞれの濃度の BK により$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を生じた神経細胞の割合。100 pM; *n*=65、1 nM; *n*=51、10 nM; *n*=45、100 nM; *n*=50、1 μM; *n*=54、10 μM; *n*=43。シンボルは mean ± S.E.M.を示す。

3. Bradykinin 受容体サブタイプ

BK 受容体には B1 と B2 のサブタイプが存在する。ラット小腸の筋層間神経叢に発現する受容体サブタイプを調べるために、培養筋層間神経叢細胞から RNA を抽出し、各受容体サブタイプに特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。このときβ-actin の発現を陽性コントロールとした。その結果、図 4A に示すように B1 受容体、B2 受容体両方の発現を示すバンドが検出された。なお、これらの PCR 産物はラット B1 受容体、B2 受容体の遺伝子産物を増幅していることをシークエンスにより確認した。

RT-PCR により培養筋層間神経叢細胞において両方の BK 受容体サブタイプ mRNA が検出されたので、神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応にはどちらの受容体サブタイプが関与しているのかを各受容体サブタイプの拮抗薬を用いて薬理学的に検討した。まず B1 受容体拮抗薬（Lys-des-Arg^9-HOE140、1 μM）を 30 秒間投与し、この存在下で神経細胞を 60 秒間 BK 刺激（100 nM）した。同様にして B2 受容体拮抗薬（HOE140、1 μM）についても調べた。拮抗薬非存在下及び存在下での BK による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応を図 4B に、$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）を図 4C に示した。この結果、BK 反応は B1 受容体拮抗薬存在下では変化しなかったが、B2 受容体拮抗薬存在下では消失した。また、B1 受容体作動薬（des-Arg^9-BK、1 μM）を投与しても神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$は変化しなかった。以上のことから、神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応は B2 受容体を介していることが示された。

次に、培養筋層間神経叢細胞における B2 受容体蛋白の発現を確認するために免疫染色を行った。まず、PGP9.5 に対する抗体と B2 受容体に対する抗体を用いて、培養筋層間神経叢細胞を二重染色した（図 5A）。その結果、全ての PGP9.5 免疫陽性細胞が B2 受容体免疫陽性を示し、また PGP9.5 免疫陰性細胞においても B2 受容体免疫陽性が認められた。そこで次に、グリアマーカーである S100 に対する抗体と B2 受容

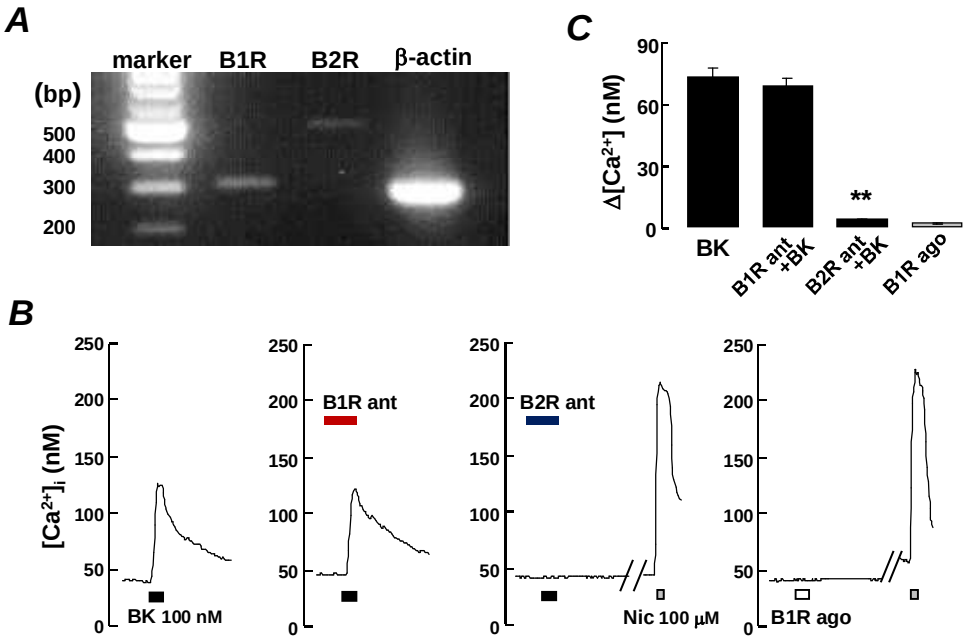

図 4.　神経細胞における bradykinin 反応に関与する受容体サブタイプの検討

A：培養筋層間神経叢細胞についての RT-PCR による BK 受容体サブタイプ mRNA の検出。培養細胞から抽出した全 RNA を用いて各 BK 受容体サブタイプに特異的なプライマーによる RT-PCR を行った。レーン左端に DNA マーカーとそのサイズを、右端に陽性コントロールとしてのβ-actin の PCR 産物のバンドを示した。B：神経細胞の BK 反応に対する各 BK 受容体サブタイプの拮抗薬を用いた薬理学的検討。BK 単独（100 nM、60 秒間）、B1 受容体拮抗薬（B1R ant、Lys-des^{9}-HOE140、1 μM）存在下での BK、B2 受容体拮抗薬（B2R ant、HOE140、1 μM）存在下での BK、B1 受容体作動薬（B1R ago、des-Arg^{9}-BK、1 μM、60 秒間）による典型的な $[Ca^{2+}]_i$ 反応。これらの刺激により顕著な $[Ca^{2+}]_i$ 変化が起こらなかった神経細胞については、nicotine（Nic、100 μM、30 秒間）による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応も併せて示した。C：各条件での $[Ca^{2+}]_i$ 反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。BK 単独; n=39、B1 受容体拮抗薬存在下; n=25、B2 受容体拮抗薬存在下; n=22、B1 受容体作動薬; n=44。カラムは mean ± S.E.M.を示す。

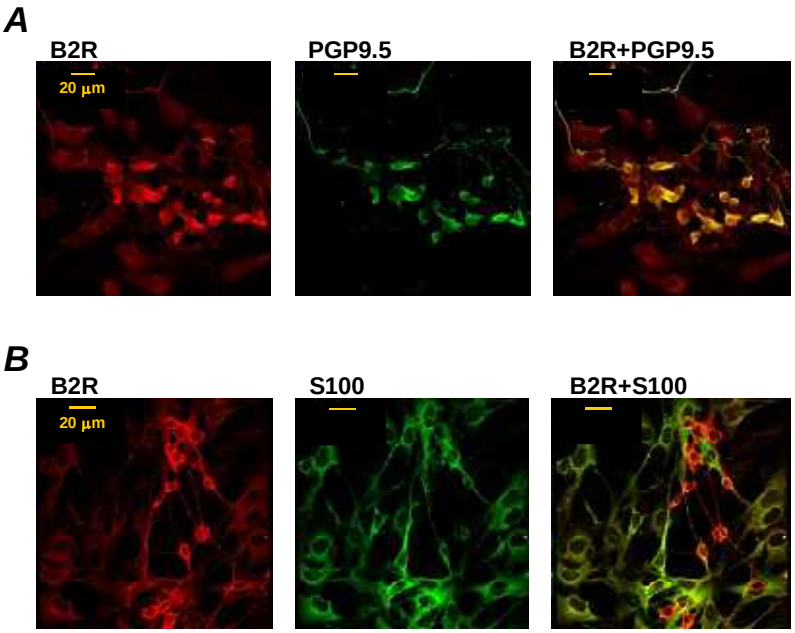

図 5.　培養筋層間神経叢細胞における抗 B2 受容体抗体を用いた免疫染色像

培養細胞における抗 B2 受容体（B2R）抗体（赤）と抗 PGP9.5 抗体（緑）を用いた免疫染色像（A）と抗 B2 受容体抗体（赤）と抗 S100 抗体（緑）を用いた免疫染色像（B）。それぞれ右にマージ像を示した。全ての PGP9.5 免疫陽性細胞或いは全ての S100 免疫陽性細胞において、B2 受容体免疫陽性が示された。

体に対する抗体を用いて二重染色を行うと、S100 免疫陽性を示した全ての細胞も B2 受容体免疫陽性であった（図 5B）。

4. Ca^{2+}動員機構

$[Ca^{2+}]_i$増加に関与する主な機構として、細胞外からの Ca^{2+}流入と細胞内 Ca^{2+}ストアからの Ca^{2+}放出の二つが挙げられる。そこで、神経細胞における BK による $[Ca^{2+}]_i$上昇について検討した（図 6A、B）。

まず、BK を外液 Ca^{2+}非存在下で適用することで、細胞外からの Ca^{2+}流入の関与を無くした条件下での BK 作用を調べた。即ち、外液を通常の灌流液から EGTA（0.5 mM）を含む Ca^{2+}-free 溶液に置換し、30 秒後に BK（100 nM）を 60 秒間適用した。このとき BK による$[Ca^{2+}]_i$増加は持続相を持たずに一過性となり、反応の増加分も顕著に小さくなった。このことから神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$増加は主に外液 Ca^{2+}依存性であり、一部は細胞内 Ca^{2+}ストアからの Ca^{2+}放出を介していることが明らかとなった。次に、細胞内 Ca^{2+}ストアを涸渇させることによりストアの関与を排除した条件下での BK 作用を検討した。まず、細胞内 Ca^{2+}ストアを涸渇させる条件を決定するために、EGTA（0.5 mM）を含む Ca^{2+}-free 溶液下で小胞体 Ca^{2+}ポンプ阻害薬である thapsigargin（0.5 μM）を様々な時間処置した細胞に対し、外液 Ca^{2+}非存在下で BK 刺激を行った。その結果、210 秒間の thapsigargin 処置により BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応が消失したことから、この条件で神経細胞の細胞内 Ca^{2+}ストアが涸渇することが分かった（データは示していない）。Thapsigargin により細胞内 Ca^{2+}ストアを涸渇させた細胞に通常の灌流液下で BK を適用すると、持続相を持つ$[Ca^{2+}]_i$増加反応が生じたが、反応の大きさはコントロールよりも有意に減少した。

神経細胞における細胞外からの Ca^{2+}流入機構として、電位依存性 Ca^{2+}チャネ

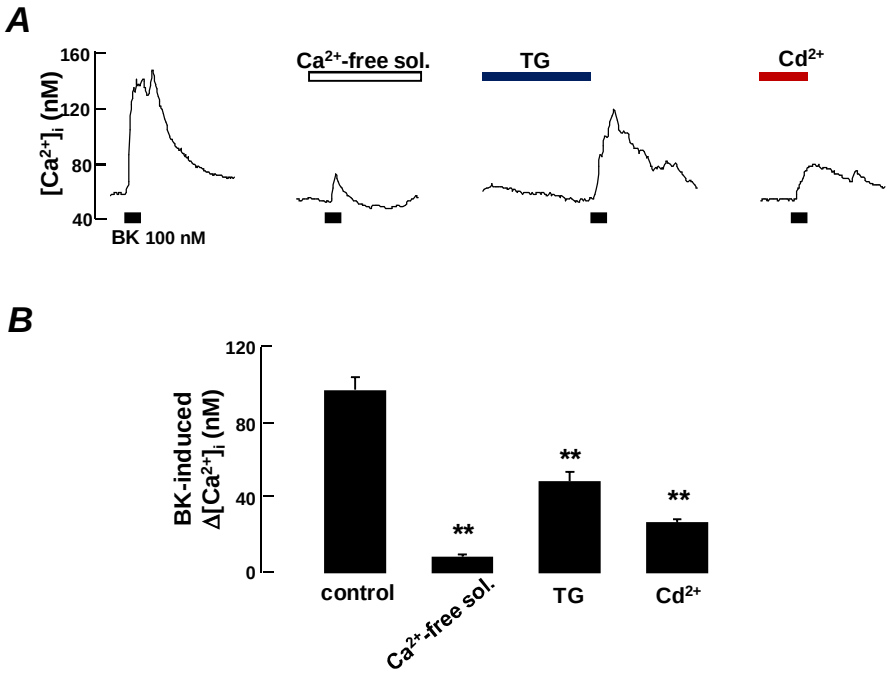

図 6.　神経細胞における bradykinin 反応に対する外液 Ca^{2+}除去、細胞内 Ca^{2+}ストア涸渇、電位依存性 Ca^{2+}チャネル遮断の影響

A：それぞれ BK 単独（100 nM、60 秒間）による$[Ca^{2+}]_i$反応、外液を EGTA 0.5 mM を含む Ca^{2+}-free 溶液（Ca^{2+}-free sol.）に置換したときの BK 反応、Ca^{2+}-ATPase 阻害薬である thapsigargin（TG、0.5 μM、210 秒間）処置後の BK 反応、電位依存性 Ca^{2+}チャネル遮断効果を有する Cd^{2+}（300 μM）存在下での BK 反応の典型例。B：それぞれの条件下での BK 刺激による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。BK 単独; n=52、Ca^{2+}-free 溶液条件下; n=58、TG 処置後; n=64、Cd^{2+}存在下; n=117。カラムは mean ± S.E.M.を示す。

ル（voltage-dependent Ca^{2+} channel: VDCC）が第一候補として挙げられる。そこで、BK 反応による$[Ca^{2+}]_i$増加に対して VDCC 阻害作用を持つ Cd^{2+}の効果を調べた。Cd^{2+}（300 μM）を BK 刺激 30 秒前より適用し、この存在下で BK 刺激すると、BK 反応は有意に抑制したが消失しなかった。この$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の様式は、外液 Ca^{2+}非存在下で観察された BK による細胞内 Ca^{2+}ストアからの Ca^{2+}放出のみの反応と明らかに異なったので、BK による細胞外からの Ca^{2+}流入反応には VDCC と VDCC 以外の Ca^{2+}流入機構が関与していると考えられた。

5. Cyclooxygenase-prostaglandins 系の関与

様々な組織において、BK 作用には COX 活性化を介して産生された PGs が関与することが知られている（Rodgers et *al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2003; Kubota *et al.*, 2003; Hernanz e*t al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004）。そこで、培養筋層間神経叢細胞における神経細胞での BK による$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応への COX の関与の有無を検討した。非選択的 COX 抑制薬である indomethacin（1 μM）を 30 秒間前処置し、その存在下で BK（100 nM）を 60 秒間投与したところ、BK 刺激による$\Delta[Ca^{2+}]_i$は有意に減少した。それ故、BK による$[Ca^{2+}]_i$上昇反応に対する COX の関与が示唆された。モルモット腸管神経細胞では BK 作用には COX 活性化による代謝産物である PGE_2 と PGI_2が関与していることが示唆されている（Hu *et al.*, 2003; 2004a; 2004b）。そこでこれらを外因性に投与したときの反応を調べた。新生ラット培養筋層間神経叢細胞において、PGE_2（1 μM）及び PGI_2（1 μM）はそれ自身で神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$を変化させなかったが、PGE_2 存在下では BK による$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応が有意に増大した。一方、PGI_2 は BK 反応に影響を与えなかった。図 7A にそれぞれの条件での典型的な$[Ca^{2+}]_i$増加反応を、図 7B に$\Delta[Ca^{2+}]_i$を表すカラムを示した。

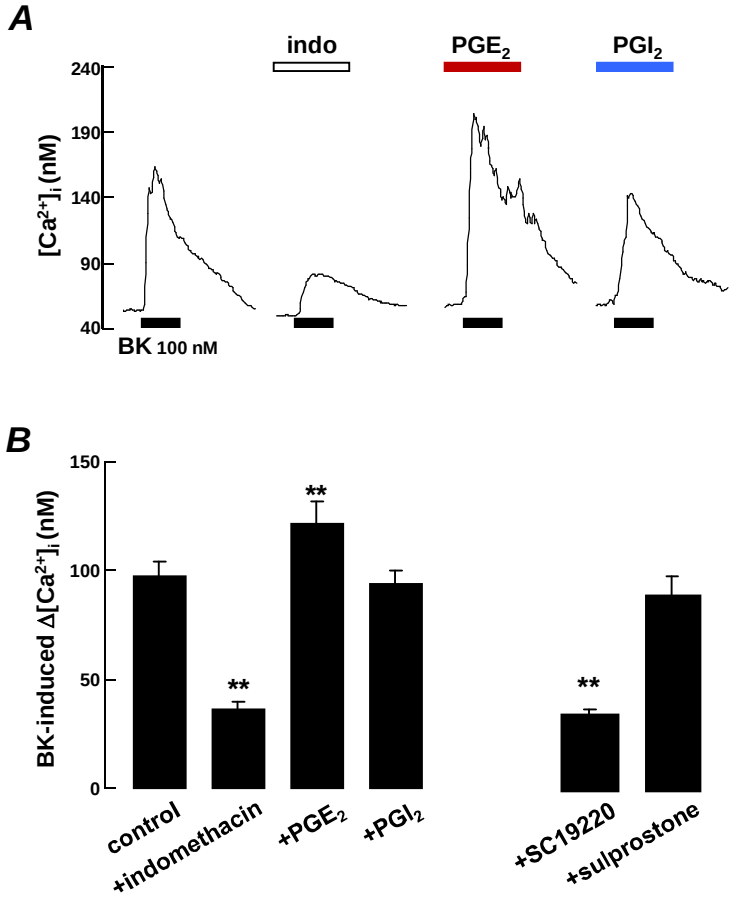

図 7.　神経細胞の bradykinin 反応に対する COX 抑制薬、prostaglandins、EP 受容体拮抗薬の影響

A：それぞれ BK 単独（100 nM、60 秒間）或いは非選択的 COX 抑制薬である indomethacin（indo、1 μM）存在下、PGE_2（1 μM）存在下、PGI_2（1 μM）存在下での BK による典型的な $[Ca^{2+}]_i$ 反応。B：BK 単独（*n*=52）或いは indomethacin 存在下（*n*=54）、PGE_2 存在下（*n*=43）、PGI_2 存在下（*n*=96）、SC19220（1 μM、EP_1 受容体拮抗薬）存在下、sulprostone（1 μM、EP_3 受容体作動薬）存在下（*n*=79）での BK による $[Ca^{2+}]_i$ 反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。カラムは mean ± S.E.M.を示す。**は BK 単独による $\Delta[Ca^{2+}]_i$ との有意差（$p<0.01$）を示す。

ラット筋層間神経叢の神経節には、PGE_2受容体のうちEP_1、EP_3受容体 mRNA が発現することが in situ hybridization により示されている（Northey *et al.*, 2000）。本実験において、腸管神経細胞における BK 反応はPGE_2によって増強されることが分かったため、この作用がどちらの EP 受容体サブタイプを介しているかを薬理学的に検討した。EP_3受容体作動薬（sulprostone、1 μM）或いはEP_1受容体拮抗薬（SC19220、1 μM）をそれぞれ 30 秒間前投与し、それぞれの存在下で BK（100 nM）を 60 秒間適用した。その結果、sulprostone は BK 反応を増強せず、SC19220 は BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応を有意に抑制した（図 7B）。このことから、PGE_2による BK 反応増大にEP_1受容体が関与することが示唆された。

C. Bradykinin による prostaglandin E_2放出

神経細胞における BK 反応が非選択的 COX 抑制薬或いはEP_1受容体拮抗薬により抑制されたという実験結果から、この反応には内因性PGE_2が関与すると考えられる。そこで、実際に BK により培養筋層間神経叢細胞からのPGE_2放出が起こるか否かを調べた。コントロール群では培養筋層間神経叢細胞に栄養液のみを、BK 投与群では BK（10 nM 或いは 100 nM）を含む栄養液を適用して室温で 10 分間静置した後、それぞれの栄養液中のPGE_2量を ELISA により測定した。PGE_2放出に対する BK 作用への COX の関与を検討する際には、BK（100 nM）に加えて indomethacin（1 μM）を含む栄養液を適用した。それぞれの群におけるPGE_2放出量を図 8 に示した。培養筋層間神経叢細胞からの PGE_2 放出は BK により濃度依存性に増加し、この放出は indomethacin により消失した。なお、indomethacin 単独ではPGE_2放出量は変化しなかった。以上のことから、BK は COX 活性化を介して培養筋層間神経叢細胞からPGE_2を放出させることが明らかとなった。

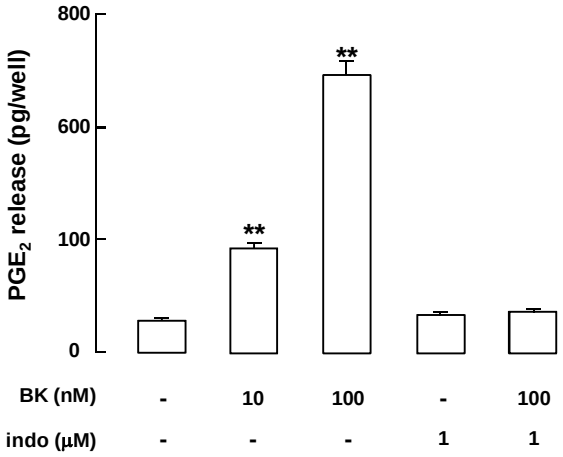

図 8. 培養筋層間神経叢細胞からの bradykinin による prostaglandin E_2 放出

培養細胞に栄養液のみ、BK（10 nM **或いは** 100 nM）**を含む栄養液、**indomethacin（indo、1 μM）**を含む栄養液、**BK **と** indomethacin **を含む栄養液で** 10 **分間インキュベーションしたときの** PGE_2 **放出量。カラムは** mean ± S.E.M.**を示す（***n***=4）。******はコントロール**（BK-, indo-）**における** PGE_2 **放出量との有意差（***p***<0.01）を示す。**

D.　神経細胞と腸管グリア細胞の相互作用の検討

1. Bradykinin 反応に対する細胞密度の影響

前述した様に、神経細胞の BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応は外因性 PGE_2 により増強されることに加えて、BK 刺激は培養筋層間神経叢細胞からの PGE_2 放出を促すことが分かった。それ故、培養筋層間神経叢細胞に BK を投与した場合に生じる神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$増加反応には、BK 刺激による直接作用と、放出された PGE_2 を介した間接作用（BK 反応の増強）が関与すると考えられる。そこで、PGE_2 放出が BK 反応を観察している神経細胞自身に由来するのか（自己分泌）、或いはその神経細胞以外の隣接した細胞に由来するのか（傍分泌）を、BK 反応を観察する神経細胞の周囲に他の細胞が存在する高密度培養条件（high density）と存在しない低密度培養条件（low density）で調べた（図 9A）。筋層間神経叢の分離細胞をカバーグラスに低密度で播種しても、2 日間培養すると腸管グリア細胞が分裂増殖するために細胞密度が高くなる。そのため、この実験では密度を変えて分離細胞をカバーグラスに接着させて 4 時間後の培養筋層間神経叢細胞を用いて high density、low density とした。これらの培養細胞に BK（100 nM）を 60 秒間投与し、神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$増加反応を観察した。High density では low density に比べて神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）は有意に大きかった。次に、BK 反応への PGE_2 の関与を調べるために、それぞれの培養において indomethacin 存在下と非存在下における神経細胞の BK による$\Delta[Ca^{2+}]_i$を比較した（図 9B）。その結果、indomethacin により high density での神経細胞の BK 反応は有意に抑制されたが、low density での神経細胞の BK 反応は影響を受けなかった。なお、高濃度 K^+溶液による神経細胞の$\Delta[Ca^{2+}]_i$は細胞密度の違いにより影響を受けなかった（$\Delta[Ca^{2+}]_i$[nM]: low density;　218.5 ± 49.2, n=34、high density; 248.8 ± 12.5,

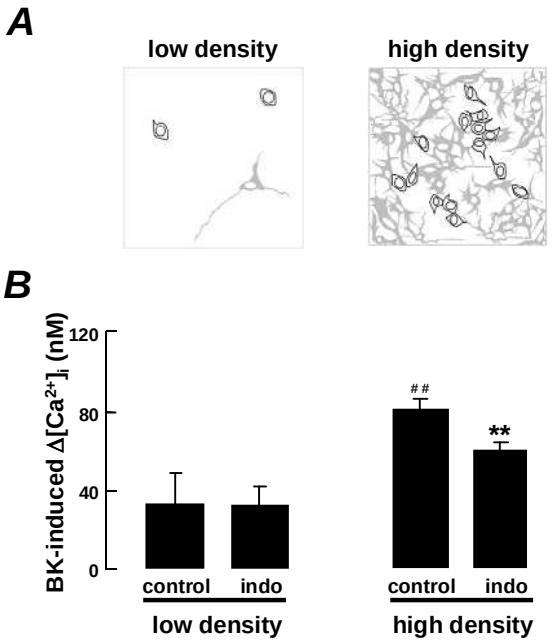

図 9.　培養筋層間神経叢細胞の密度の違いによる神経細胞における bradykinin 反応の差異

A：4 時間培養した低密度（low density）或いは高密度（high density）の筋層間神経叢細胞のイラスト。Nictoine に対する反応性により、神経細胞を白、腸管グリア細胞をグレーで示した。B：低密度或いは高密度培養での神経細胞における BK 単独（control、100 nM、60 秒間）、indomethacin（indo、1 μM）存在下での BK による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）を mean ± S.E.M.のカラムで示した。Low density: control; *n*=119、indo; *n*=146、high density: control と indo; *n*=17。**は high density における control との有意差（$p<0.01$）を、##は low density における control との有意差（$p<0.01$）を示す。

n=265）。これらの結果により、PGE_2 が BK 反応を観察している神経細胞自身からではなく、周囲の細胞から分泌されて作用していることが示された。

2.　腸管グリア細胞の密度と bradykinin 反応

本実験で用いた筋層間神経叢の初代培養には神経細胞（30%）に加え、腸管グリア細胞（68%）が含まれる。BK 刺激によりウサギ大脳皮質アストロサイトとヒトアストロサイトから PGE_2 放出が起こることが報告されている（Ishimoto *et al.*, 1996）。それ故、培養筋層間神経叢細胞において、BK 刺激によって放出された PGE_2 の由来が腸管グリア細胞である可能性について検討した。まず、分離細胞を培養する際に Ara-C（10 μM）を培養液中に添加することで腸管グリア細胞の分裂を抑制し、腸管グリア細胞のみの密度が低い培養を作製した。無処置の培養（control culture）と Ara-C を添加した培養（Ara-C culture）それぞれについて、B2 受容体に対する抗体とグリアマーカーである S100 に対する抗体を用いて二重染色した（図 10A）。このとき染色強度は様々であったが、両培養共に神経細胞と腸管グリア細胞の両方に B2 受容体免疫陽性が示された。また、Ara-C culture において腸管グリア細胞数は著しく減少したが、神経細胞数に有意差は無かった（神経細胞数：control culture; 0.55 ± 10^3 /mm^2、Ara-C culture; 0.51 ± 10^3 /mm^2、*n*=6）。Control culture と Ara-C culture それぞれにおいて、indometacin（1 μM）非存在下及び存在下で BK（100 nM）を投与したときの神経細胞における $\Delta[Ca^{2+}]_i$ を図 10B に示した。Control culture における神経細胞の $\Delta[Ca^{2+}]_i$ は Ara-C culture における反応と比較して有意に大きかった。また、control culture では、神経細胞の BK 反応は indomethacin により有意に抑制されたが、Ara-C culture では indomethacin による抑制を受けなかった。更に、indomethacin 存在下の control culture における BK 反応と、Ara-C culture における BK 反応は同程度の大きさであ

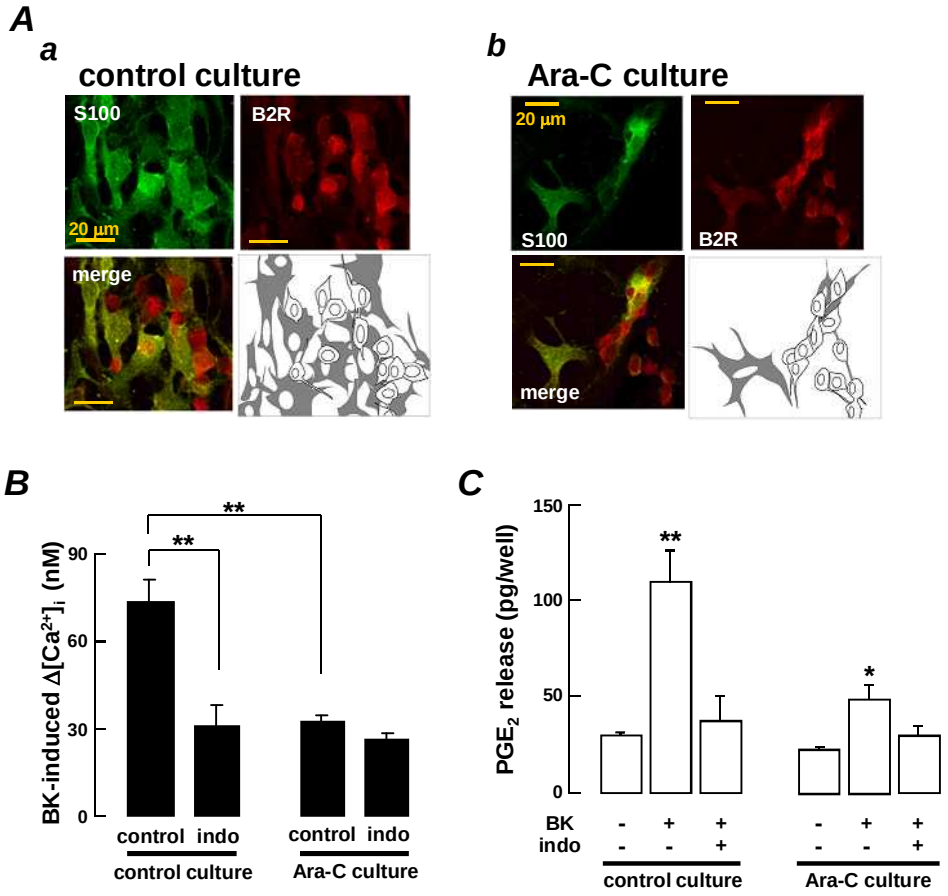

図 10.　腸管グリア細胞の培養密度の違いによる神経細胞における bradykinin 反応の差異

A：Ara-C（10 μM）非存在下（a、control culture）或いは存在下（b、Ara-C culture）で培養した分離筋層間神経叢細胞の抗 S100 抗体による免疫染色像（緑）、抗 B2 受容体による免疫染色像（赤）、マージ像及びイラスト。イラスト中では、神経細胞は白、腸管グリア細胞はグレーで示した。B：control culture 或いは Ara-C culture での神経細胞における BK 単独（control、100 nM、60 秒間）、indomethacin（indo、1 μM）存在下での BK による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）を mean ± S.E.M.のカラムで示した。Control culture: control; *n*=57、indo; *n*=30、Ara-C culture: control; *n*=178、indo; *n*=121。**は有意差（$p<0.01$）を示す。C：control culture 或いは Ara-C culture に栄養液のみ、BK（100 nM）を含む栄養液、BK と indomethacin（1 μM）を含む栄養液で 10 分間インキュベーションしたときの PGE_2 放出量。カラムは mean ± S.E.M. を示す（*n*=4）。各々の培養におけるコントロール（BK-, indo-）での PGE_2 放出量との有意差を**（$p<0.01$）或いは*（$p<0.05$）で示す。

った。それ故、control culture の神経細胞の BK 反応において、indomethacin によって抑制された成分は腸管グリア細胞に由来することが示唆された。そこで次に、BK による両培養からの PGE_2 放出と、この PGE_2 放出に対する indomethacin 作用について検討した（図 10C）。両培養において、静止状態での PGE_2 放出量は同じであったが、BK 刺激による control culture からの PGE_2 放出量は Ara-C culture からの放出量よりも有意に大きかった。以上の結果より、BK 刺激による PGE_2 放出は腸管グリア細胞に由来し、この PGE_2 は神経細胞の BK による$[Ca^{2+}]_i$ 反応を増大することが示唆された。

E. 神経細胞膜電位に対する bradykinin 作用

1. 脱分極反応

モルモットの筋層間神経細胞を用いた実験において、BK 投与により神経細胞の非選択的陽イオンチャネル（non-selective cation channel: NSCC）の活性化を介した持続的な脱分極が生じることが報告されている（Hu *et al.,* 2004a）。ラット筋層間神経叢の初代培養においても、Cd^{2+}により神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制されたことから、BK が神経細胞の脱分極を引き起こすか否かについて調べた。

筋層間神経叢において、神経細胞には電位依存性 Na^+チャネルが存在するが、腸管グリア細胞には存在しない（Ohta *et al.,* 2005）。そこで、まずボルテージクランプした細胞が神経細胞であることを確認した。即ち、保持電位-80 mV から 0 mV への短い脱分極パルス（50 ms）を与えたときに、早い内向き Na^+電流が生じた細胞を神経細胞と同定した。引き続き、カレントクランプモードにして膜電位測定した結果、神経細胞の静止膜電位は–44.5 ± 0.5 mV （n=63）であった。神経細胞に BK（100 nM）を 30 秒間投与すると、持続的な脱分極を生じ、BK 除去後も多くの細胞で静止膜電位まで

完全に再分極をしなかった（*n*=38）。また、BK 刺激によって脱分極を示した細胞のうち、この脱分極に伴って複数の活動電位を生じた細胞も存在した（*n*=9、図 11A）。Indomethacin（1 μM）存在下で BK を投与すると、BK による膜電位の増加反応は有意に抑制され（図 11B）、この条件下で活動電位を生じる細胞は無かった（*n*=25）。また BK 刺激により脱分極し、それに伴って活動電位を発生した神経細胞に indomethacin を投与すると、活動電位発生の頻度は緩徐に減少し、膜電位は過分極方向に変化した。Indomethacin を除去すると膜電位は再び増加し、発生する活動電位の頻度が増加した（図 11C）。以上の結果より、BK は筋層間神経細胞に持続的な脱分極を引き起こし、この膜電位変化にも COX により生成される PGs が関与していることが分かった。

2. 電流パルスによる活動電位発生への影響

次に、BK（100 nM）非存在下或いは存在下で神経細胞に 0.5 秒毎に 2 pA ずつ増加するパルスを与えて活動電位を発生させ、その時の電流量を求めた。図 12A の神経細胞においては、BK 非存在下では活動電位を発生するためには 46 pA のパルスを必要とした。同神経細胞に BK を適用し、BK 存在下で同様に順次増加するパルスを与えると、26 pA のパルスで活動電位が発生した。なお、BK 非存在下或いは存在下での活動電位の振幅に変化はなかった。この神経細胞から得られた電流パルスと膜電位変化の関係を図 12B に示した。また、同様に他の神経細胞についても活動電位発生に必要とされる電流パルスの大きさを BK 存在下及び非存在下で調べた結果を図 12C に示した。神経細胞に活動電位を発生させるために必要な平均電流量は BK により有意に小さくなったが、活動電位を発生するのに必要な膜電位の閾値は変化しなかった。

これまでの結果から、培養筋層間神経叢細胞に BK を投与すると、BK は B2

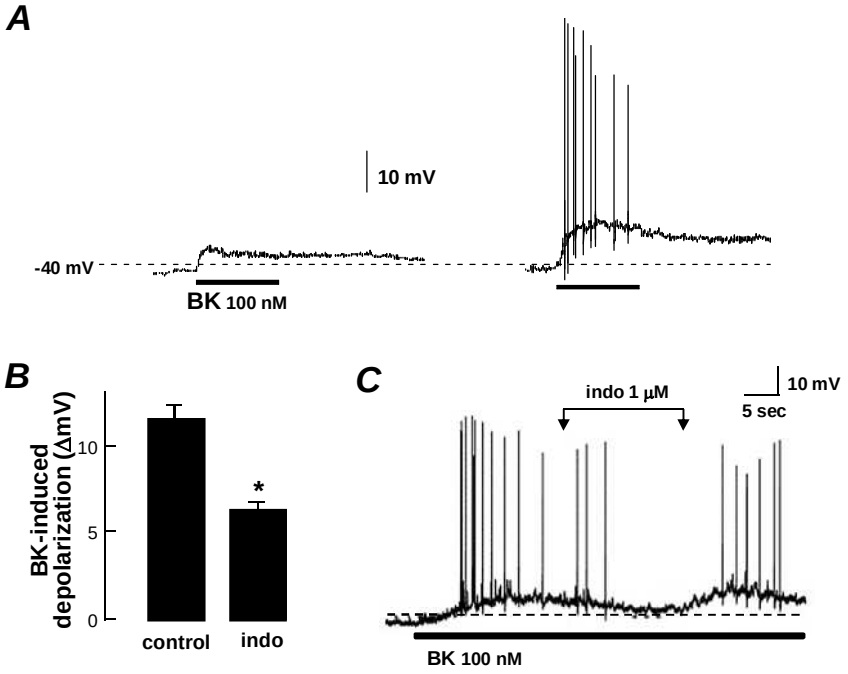

図 11.　筋層間神経細胞における bradykinin による膜電位の変化

A.　カレントクランプ条件下で BK（100 nM、30 秒間）を与えたときの神経細胞の膜電位変化の典型例。多くの細胞は左の例の様に小さな脱分極を生じるのみであったが（*n*=38）、右の例の様に脱分極に活動電位の発生を伴う細胞も存在した（*n*=9）。B：神経細胞において、BK 単独（control）、indomethacin（indo、1 μM）存在下での BK による脱分極反応を mean ± S.E.M. のカラムで示した。Control; *n*=25、indo; *n*=38。*は control との有意差（$p<0.05$）を示す。C：BK 投与による脱分極に伴って活動電位を発生した神経細胞に、indomethacin を投与した際の典型的な電位変化。Indomethacin は BK 反応を可逆的に抑制した。

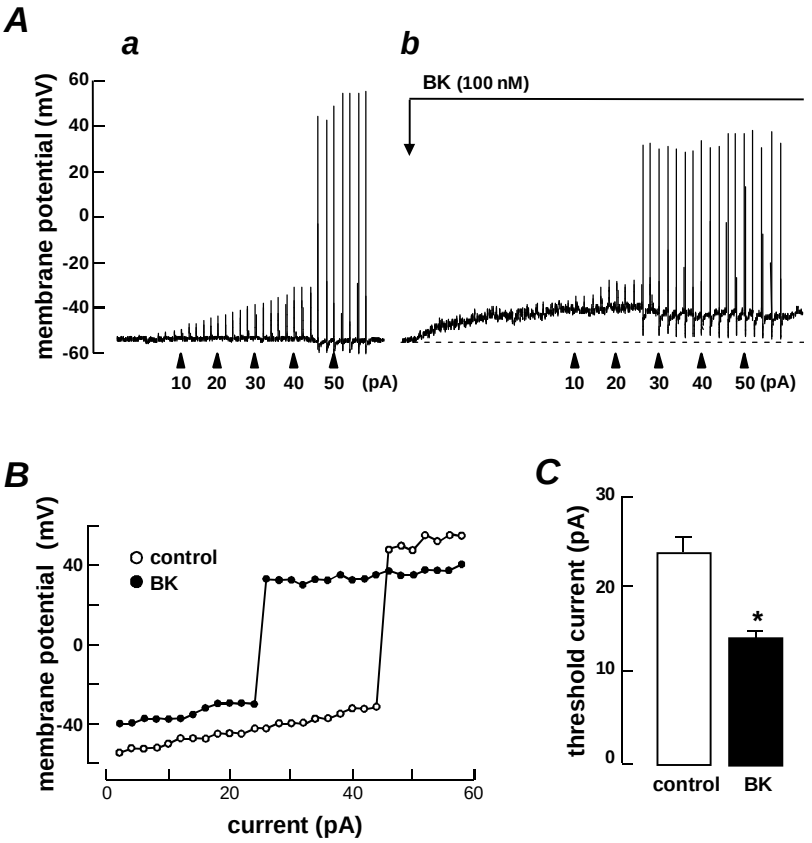

図 12.　筋層間神経細胞における電流パルスによる活動電位発生に対する bradykinin 作用

A：カレントクランプした条件下において、BK（100 nM）非存在下（a）或いは存在下（b）で培養筋層間神経細胞に 2 pA ずつ増加する電流パルスを与えたときの膜電位変化の一例。BK 存在下では BK 非存在下に比べて活動電位の発生に要するパルス電流は小さくなった。B：BK 非存在下（control、○）及び BK 存在下（●）において、神経細胞に与えた電流パルスと細胞膜電位の関係。C：BK 非存在下（control）或いは存在下において、神経細胞が活動電位を発生する電流パルス閾値を mean ± S.E.M.のカラムで示した。Control & BK; n=10。*は有意差（p<0.05）を示す。

受容体を介して筋層間神経細胞を活性化することが分かった。このとき BK はおそらく B2 受容体を介して腸管グリア細胞より PGE_2 放出を促し、この PGE_2 は神経細胞上の EP_1 受容体に作用して神経細胞の BK 反応を増大することが示された。また、BK は神経細胞を脱分極させ、膜電位を閾値にまで上昇させて活動電位を発生させることが示唆された。

F.　腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$に対する bradykinin 作用

免疫細胞染色の結果から腸管グリア細胞に B2 受容体が発現すること（図 5）、また、BK が腸管グリア細胞から PGE_2 を放出させることが示唆されており、これらの結果より BK は B2 受容体を介して腸管グリア細胞を活性化させている可能性が考えられる。そこで、腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$に対する BK の作用を調べた。

培養筋層間神経叢細胞に BK（10 nM）を 120 秒間投与すると、腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$は一過性に上昇し、この増加した$[Ca^{2+}]_i$は BK 刺激中に静止レベルまで下降した。腸管グリア細胞の静止レベルの$[Ca^{2+}]_i$は 54.1 ± 0.5 nM （n=271）であった。BK の繰り返し適用による影響を検討するために、BK（10 nM、60 秒間）を 15 分間隔で 2 回投与した。2 回目の BK 投与による反応の大きさは、初回の BK 投与による反応の大きさの 36.9%となり（n=65）、神経細胞における BK 反応と同様に著しく脱感作を示した（データは示していない）。そのため BK を単回適用して、腸管グリア細胞における BK による濃度依存性反応を調べた。様々な濃度の BK（100 pM~10 μM）を 150 秒間投与すると、 腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$は BK 濃度依存性に増加し、1 μM BK でほぼ最大反応に達した（図 13A、B）。この濃度反応曲線により算出された EC_{50} は 3.0 ± 0.7 nM であった。また、低濃度の BK では BK 投与から$[Ca^{2+}]_i$反応が起こるまでに潜時が認められ、BK 濃度が増加するに従ってこの潜時は短縮した。図 13C に BK による$[Ca^{2+}]_i$

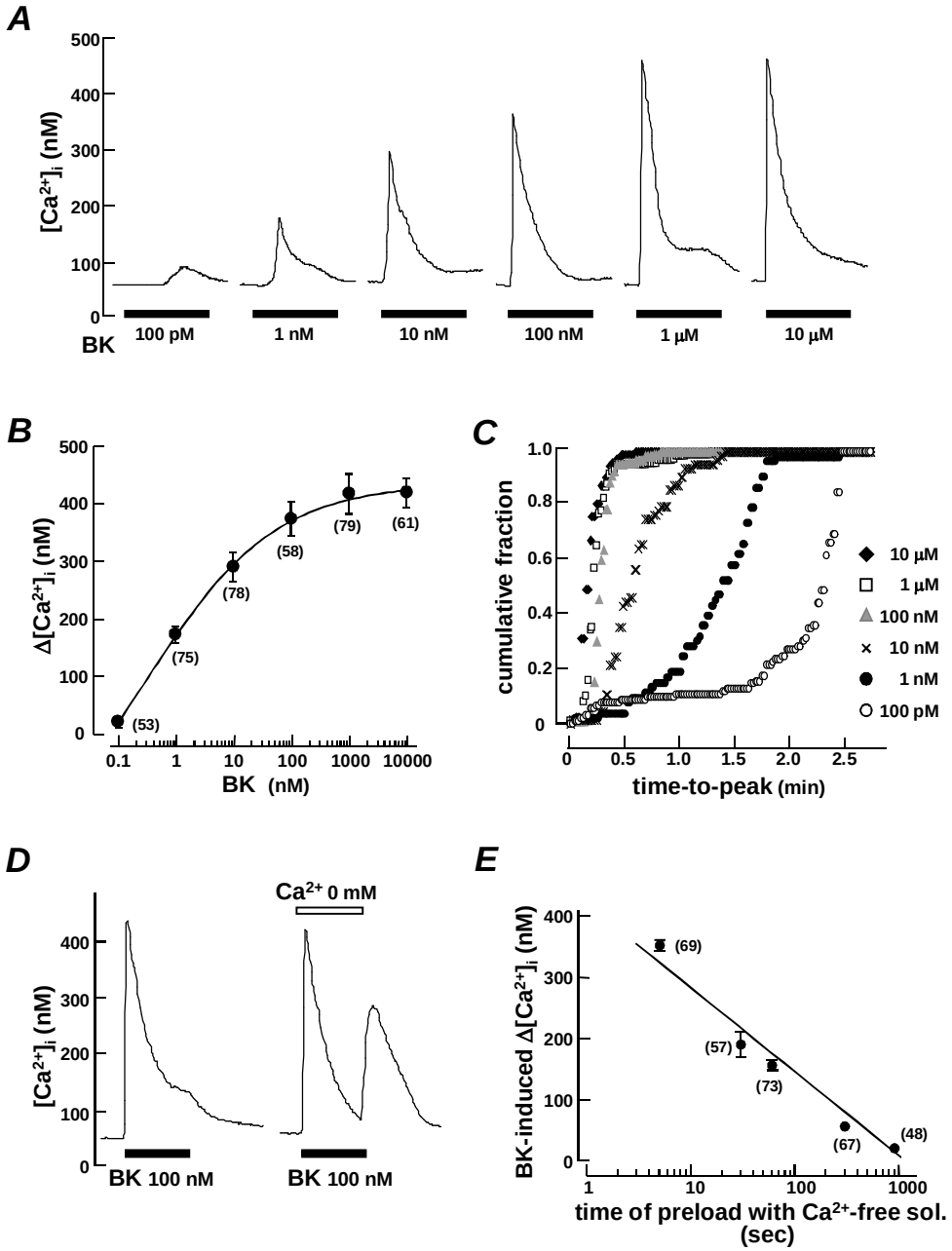
A
500
400
300
200
100
0
[Ca2+]i (nM)
BK
100 pM
1 nM
10 nM
100 nM
1 µM
10 µM
B
Δ[Ca2+]i (nM)
(53)
(75)
(78)
(58)
(79)
(61)
0.1
1
10
100
1000
10000
BK (nM)
C
cumulative fraction
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
time-to-peak (min)
10 µM
1 µM
100 nM
10 nM
1 nM
100 pM
D
Ca2+ 0 mM
[Ca2+]i (nM)
BK 100 nM
BK 100 nM
E
BK-induced Δ[Ca2+]i (nM)
(69)
(57)
(73)
(67)
(48)
1
10
100
1000
time of preload with Ca2+-free sol. (sec)

図 13.　腸管グリア細胞における bradykinin による濃度依存性$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応

A：100 pM～10 μM の BK（150 秒間）を投与したときの腸管グリア細胞における典型的な$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応。B：各濃度の BK 刺激による$[Ca^{2+}]_i$ 反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）を mean ± S.E.M.のシンボル（●）で示した。C：B における BK 反応について、BK 刺激時から$[Ca^{2+}]_i$ 増加が最大に達するまでの時間を濃度毎に累積細胞数割合（cumulative fraction）で示した。100 pM; *n*=53、1 nM; *n*=75、10 nM; *n*=78、100 nM; *n*=58、1 μM; *n*=79、10 μM; *n*=61。D：BK 単独（100 nM、120 秒間）による$[Ca^{2+}]_i$ 反応、外液を EGTA 0.5 mM を含む Ca^{2+}-free 溶液に置換し、5 秒後に BK を投与したときの $[Ca^{2+}]_i$ 反応の典型例。E：外液を Ca^{2+}-free 溶液に置換してから BK を投与するまでの時間（time of preload with Ca^{2+}-free sol.）を変化させたときの、BK 投与するまでの時間と$\Delta[Ca^{2+}]_i$ の関係を mean ± S.E.M.のシンボルで示した（5 sec; *n*=69、30 sec; *n*=57、60 sec; *n*=73、120 sec; *n*=67、900 sec; *n*=48）。

反応が最大に達するまでに要した時間を、それぞれの BK 濃度について累積細胞数割合（cumulative fraction）で示した。

次に、BK による腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$増加に関与する Ca^{2+}動員機構を検討するために、細胞外 Ca^{2+}除去の影響を調べた。EGTA（0.5 mM）を含む Ca^{2+}-free 溶液に細胞外液を置換し、5 秒後に BK（100 nM、120 秒間）を適用しても BK は腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$を一過性に上昇させ、その$\Delta[Ca^{2+}]_i$は外液 Ca^{2+}存在下における値と同程度であった（図 13D）。また BK 投与終了と同時に Ca^{2+}-free 溶液を通常の灌流液と置換すると顕著な$[Ca^{2+}]_i$増加が認められた。図 13E に Ca^{2+}非存在下で BK を投与する際の Ca^{2+}-free 溶液による前処置時間と BK による$\Delta[Ca^{2+}]_i$の関係を示した。この結果から、BK 反応の大きさは Ca^{2+}-free 溶液への曝露時間に対して指数関数的に減衰することが示され（R^2=0.99）、細胞内 Ca^{2+}ストアからの Ca^{2+}の漏出が示唆された。また、腸管グリア細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応は、thapsigargin（0.5 μM）による細胞内 Ca^{2+}ストアの涸渇或いは PLC 阻害薬である U73122（300 nM）の前処置によりほぼ消失した（$\Delta[Ca^{2+}]_i$; control: 352.0 ± 5.3 nM, n=55, thapsigargin: 0.6 ± 0.1 nM, n=56, $p<0.01$, U73122; 4.4 ± 0.3 nM, n=71, $p<0.01$）。以上の結果から、腸管グリア細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$ 増加は、PLC 活性化を介した細胞内 Ca^{2+}ストアからの Ca^{2+}放出によることが示唆された。

G. 炎症性物質添加培養による影響

1. 共培養への LPS 及び炎症性サイトカイン作用

IBD 患者の血清中には細菌性内毒素が検出され（Caradonna *et al.*, 2000）、更に炎症性サイトカイン増加が血清中と組織中において認められる（Ligumsky *et al.*,

1990; MacDonald *et al.*, 1990; Reinecker *et al.*, 1993; Schreiber *et al.*, 1999）。また、IBD 病態には ENS の機能変化が関与する可能性が示されている（Villanacci *et al.*, 2008）。そこで、筋層間神経叢の分離細胞を 24 時間培養した後に、LPS（100 ng/ml）、IL-1β（10 ng/ml）或いは TNF-α（10 ng/ml）をそれぞれ培養液に添加して 24 時間培養することにより処置し、これらを添加せずに培養した細胞（untreated）の BK（10 nM、120 秒間）に対する$[Ca^{2+}]_i$反応と比較した。それぞれの培養での腸管グリア細胞或いは神経細胞における BK による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応を図 14A、B に、$\Delta[Ca^{2+}]_i$を図 14C、D に示した。両細胞における BK 反応は共に LPS 或いは IL-1βによる処置により増強されたが、TNF-α処置では変化しなかった。腸管において、LPS は IL-1β等の炎症性サイトカインの放出を介して免疫反応を惹起することが報告されている（Ogawa *et al.*, 2003; Sartor, 2006; Bhattacharyya, 2007; Dambacher *et al.*, 2007, Mizutani *et al.*, 2007）。LPS 処置及び IL-1β処置により BK 反応が増強されたことから、培養筋層間神経叢細胞における LPS 作用が IL-1βにより媒介されている可能性が考えられる。そこで LPS の増強作用への IL-1 受容体遮断薬（IL-1ra）の影響を調べた（図 14）。IL-1ra（200 ng/ml）を 1 時間前処置し、その存在下で培養筋層間神経叢細胞に LPS を 24 時間処置しても、腸管グリア細胞と神経細胞共に BK 反応に対する増強は顕れなかった。なお、神経細胞における nicotine による$[Ca^{2+}]_i$増加反応は LPS 処置により有意に増強したが、IL-1β処置或いは TNF-α処置では変化しなかった（データは示していない）。

2. 腸管グリア細胞純培養への LPS 及び interleukin-1β作用

本実験に用いた培養筋層間神経叢細胞の初代培養には腸管グリア細胞と神経細胞が混在するため、LPS 及び IL-1βによる作用が腸管グリア細胞と神経細胞のどちらの細胞に作用しているのかは明らかに出来ない。そこで次に、腸管グリア細胞の純培養

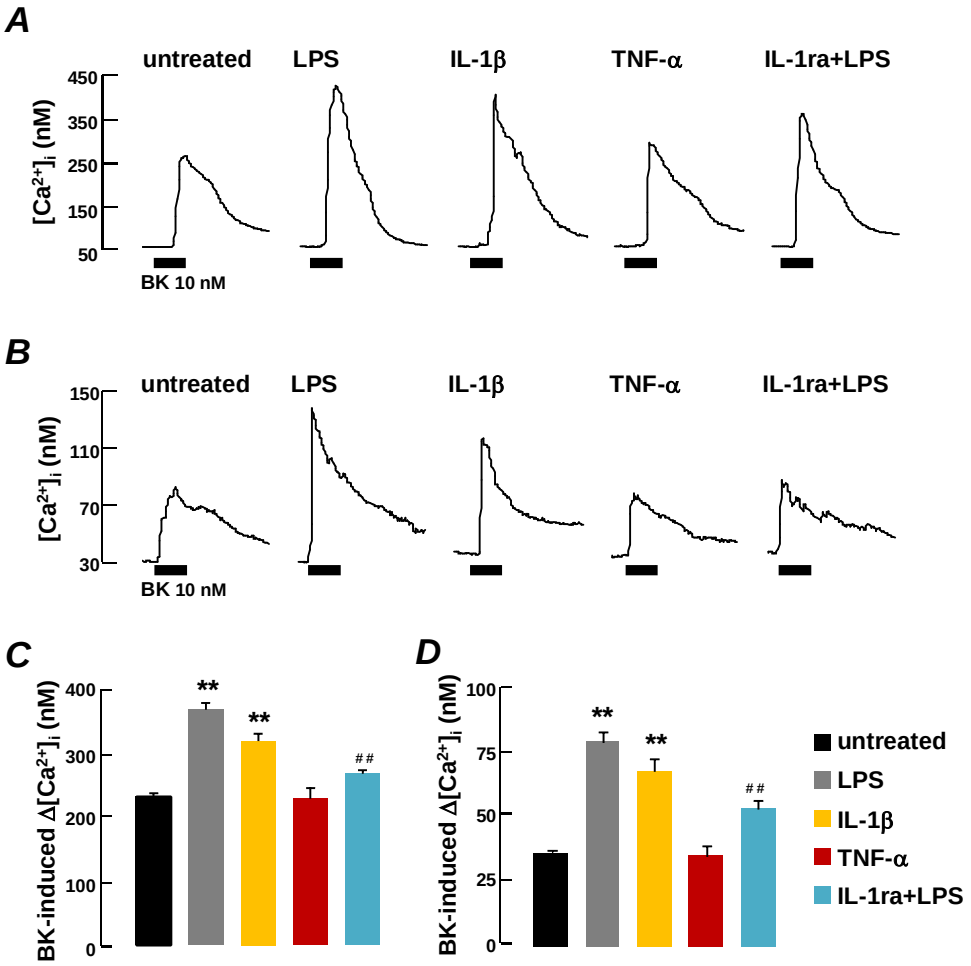

図 14.　Lipopolysaccharide 或いは炎症性サイトカインを 24 時間曝露したときの神経細胞と腸管グリア細胞における bradykinin 反応の変化

A、B：無処置（untreated）或いは LPS（100 ng/ml）、IL-1β（10 ng/ml）、TNF-α（10 ng/ml）を添加して 24 時間処置、または IL-1ra（200 ng/ml）を 1 時間前処置し、その存在下で LPS により 24 時間処置（IL-1ra＋LPS）した培養筋層間神経叢細胞において、BK（10 nM、120 秒間）を投与したときの腸管グリア細胞（A）或いは神経細胞（B）での典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応。C、D：各条件の培養筋層間神経叢細胞における腸管グリア細胞（C: untreated; *n*=53、LPS; *n*=50、IL-1β; *n*=56、TNF-α; *n*=56、IL-1ra+LPS; *n*=60）及び神経細胞（D: untreated; *n*=26、LPS; *n*=40、IL-1β; *n*=34、TNF-α; *n*=29、IL-1ra+LPS; *n*=32）での BK による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）を mean ± S.E.M.のカラムで示した。**は untreated における BK 反応に対する有意差（$p<0.01$）を、##は LPS 処置における BK 反応に対する有意差（$p<0.01$）を示す。

を作製し、LPS 及び IL-1βが腸管グリア細胞の BK 作用を増強させるか否かを検討した。培養腸管グリア細胞をグリアマーカーの S100 に対する抗体と核色素である Hoechst33342 を用いて免疫染色した結果、Hoechst33342 で核染色された細胞の 98%が S100 免疫陽性を示し（図 15A）、ほぼ腸管グリア細胞のみの純培養であることが示された。この純培養に LPS（100 ng/ml）或いは IL-1β（10 ng/ml）を処置すると、腸管グリア細胞における BK による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は無処置培養における反応と比較して有意に増強され、LPS による増強作用は IL-1ra（200 ng/ml）の前処置により抑制された（図 15B）。

3. 腸管グリア細胞の密度と LPS 及び interleukin-1β作用の関係

筋層間神経叢の初代培養において、LPS 及び IL-1βは神経細胞における BK 反応も増強した（図 14）。この増強作用が神経細胞への直接作用によるものなのか、或いは腸管グリア細胞を介した間接作用であるのかを検討するために、腸管グリア細胞の密度を変化させ、LPS 及び IL-1βのBK反応増強作用に与える影響について調べた。

Ara-C 添加により腸管グリア細胞密度が低い条件で筋層間神経叢細胞を培養した（Ara-C culture）。Ara-C culture における腸管グリア細胞数は control culture と比較して約 3 分の 1 に減ったが、神経細胞数については有意な変化は無かった（図 16A、B）。それぞれの培養を LPS（100 ng/ml）或いは IL-1β（10 ng/ml）処置すると、両培養条件とも腸管グリア細胞における BK（10 nM）による$[Ca^{2+}]_i$ 増加が増強された（図 16C）。しかしながら、Ara-C culture での神経細胞における BK 反応は、LPS 処置と IL-1β処置のいずれも増強作用を示さなかった（図 16D）。共培養において腸管グリア細胞の密度を小さくすると神経細胞に対する LPS 及び IL-1βの増強作用が顕れなかったことから、この増強作用は腸管グリア細胞を介して起こることが示唆された。

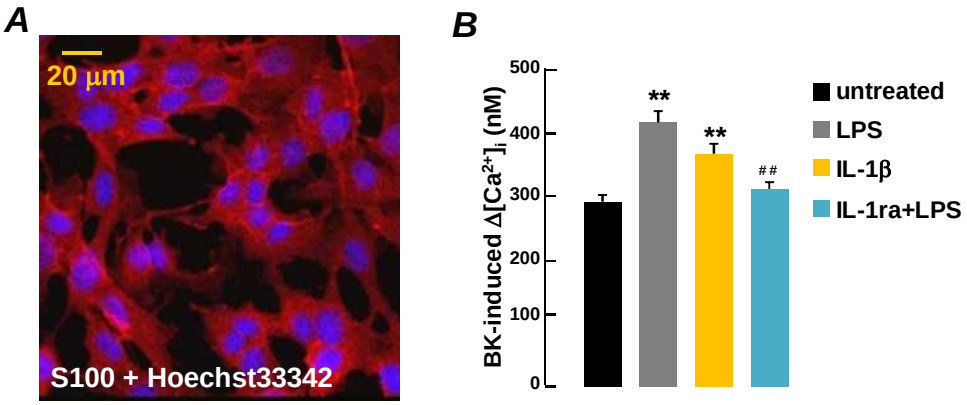

図 15. 純培養した腸管グリア細胞の bradykinin 反応に対する lipopolysaccharide 及び interleukin-1β曝露の影響

A：実験に用いた腸管グリア細胞の抗 S100 抗体を用いた免疫染色像。Hoechst33342 により核染色（青）された細胞の殆んどが S100 免疫陽性（赤）を示した。B：無処置（untreated, *n*=63）或いは LPS（100 ng/ml, *n*=63）、IL-1β（10 ng/ml, *n*=62）処置した培養、LPS 添加 1 時間前より IL-1ra（200 ng/ml）を処置してその存在下で LPS 処置した培養（IL-1ra+LPS, *n*=70）の腸管グリア細胞における BK（10 nM）による$[Ca^{2+}]_i$ 反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。カラムは mean ± S.E.M.で示す。**は untreated における BK 反応に対する有意差（$p<0.01$）を、##は LPS 処置における BK 反応に対する有意差（$p<0.01$）を示す。

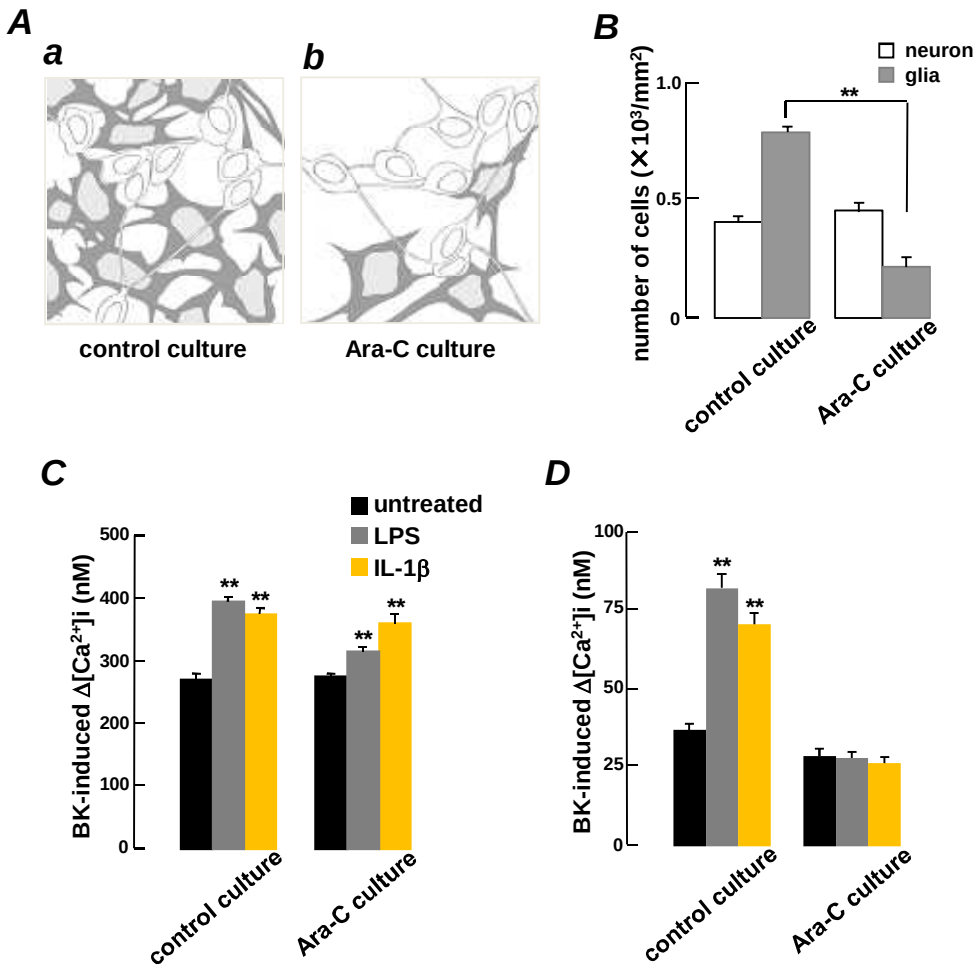
A
a
b
control culture
Ara-C culture
B
neuron
glia
number of cells (X10³/mm²)
1.0
0.5
0
**
control culture
Ara-C culture
C
untreated
LPS
IL-1β
BK-induced Δ[Ca²⁺]i (nM)
500
400
300
200
100
0
**
control culture
Ara-C culture
D
BK-induced Δ[Ca²⁺]i (nM)
100
75
50
25
0
**
control culture
Ara-C culture

図16.　腸管グリア細胞の密度の違いによるlipopolysaccharide及びinterleukin-1β作用の差異

A：Ara-C（10 μM）非存在下（a、control culture）或いは存在下（b、Ara-C culture）で培養した筋層間神経叢細胞のイラスト。神経細胞は白、腸管グリア細胞はグレーで示した。B：両培養における単位面積当たりの神経細胞と腸管グリア細胞の数をmean ± S.E.M.のカラムで示した（*n*=5）。**は有意差（*p*<0.01）を示す。C：両培養におけるLPS（100 ng/ml）或いはIL-1β（10 ng/ml）処置したときの腸管グリア細胞におけるBK（10 nM）による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）を無処置（untreated）腸管グリア細胞のBK反応と共にmean ± S.E.M.のカラムで示した。Control culture; *n*=62-68、Ara-C culture; *n*=64-74。**はそれぞれの培養におけるuntreatedでのBK反応に対する有意差（*p*<0.01）を示す。D：両培養条件下でLPS或いはIL-1β処置した時の神経細胞におけるBKによる$\Delta[Ca^{2+}]_i$を無処置の神経細胞のBK反応と共にmean ± S.E.M.のカラムで示した。Control cultur; *n*=70-78、Ara-C culture; *n*=69-74。**はそれぞれの培養におけるuntreatedのBK反応に対する有意差（*p*<0.01）を示す。

H.　LPS による interleukin-1β放出

筋層間神経叢の初代培養及び腸管グリア細胞の純培養において、LPS の増強作用が IL-1ra の前処置により抑制されたことから、LPS が腸管グリア細胞から IL-1βを放出させている可能性が考えられる（図 15）。そこで、腸管グリア細胞と神経細胞から成る培養筋層間神経叢細胞（共培養）と腸管グリア細胞のみ（純培養）のそれぞれの培養液中に LPS（100 ng/ml、10 μg/ml）を添加し、6 時間処置後の培養液中の IL-1β量を ELISA により測定した。その結果、共培養と純培養の両方において LPS により IL-1β量が有意に増加し、また、両培養からの放出量は同程度であった（図 17A）。なお、S100 に対する抗体を用いた免疫染色による単位面積当たりの腸管グリア細胞数は両培養間で有意差が無かった（図 17B）。これらのことから、LPS 作用は腸管グリア細胞から放出される IL-1βを介していることが示唆された。そこで次に IL-1β処置した培養筋層間神経叢細胞を用いて BK 反応を解析した。

I.　炎症性物質作用に関与する bradykinin 受容体サブタイプ

1.　Interleukin-1β処置培養

培養筋層間神経叢細胞を IL-1β（10 ng/ml）で様々な期間（0~24 時間）処置すると神経細胞と腸管グリア細胞の両方における BK 反応が時間依存性に増大した（図 18A、B）。IL-1β処置による BK 反応の増強は腸管グリア細胞で早く顕れ、処置 2 時間後から増強作用が生じたのに対し、神経細胞では 4 時間後から生じた。加えて、両細胞における低濃度 BK（100 pM、10 nM）による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は IL-1β処置（24 時間）により増強されたが（図 18C、D）、最大反応を引き起こす 1 μM BK による反応は増強

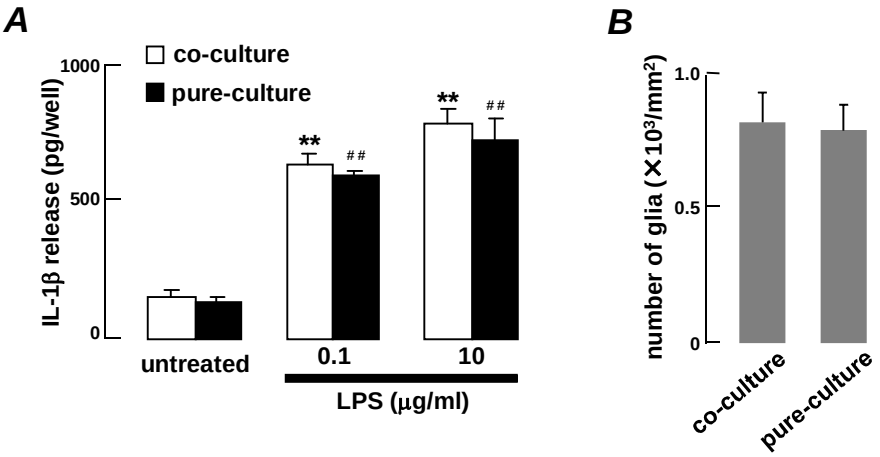

図 17.　Lipopolysaccharide による培養筋層間神経叢細胞からの interleukin-1β放出

A：腸管グリア細胞と神経細胞を含む筋層間神経叢の初代培養（co-culture）と腸管グリア細胞の純培養（pure-culture）の培養液に LPS（0.1 μg/ml 或いは 10 μg/ml）を添加し、6 時間インキュベーションしたときの培養液中の IL-1β量。カラムは mean ± S.E.M.を示す（n=4）。**は co-culture の untreated からの IL-1β放出量との有意差（p<0.01）を、##は pure-culture の untreated からの IL-1β放出量との有意差（p<0.01）を示す。B：co-culture と pure-culture において、単位面積当たりの腸管グリア細胞数を mean ± S.E.M.のカラムで示した（n=12）。両培養において、腸管グリア細胞密度に有意差は無かった。

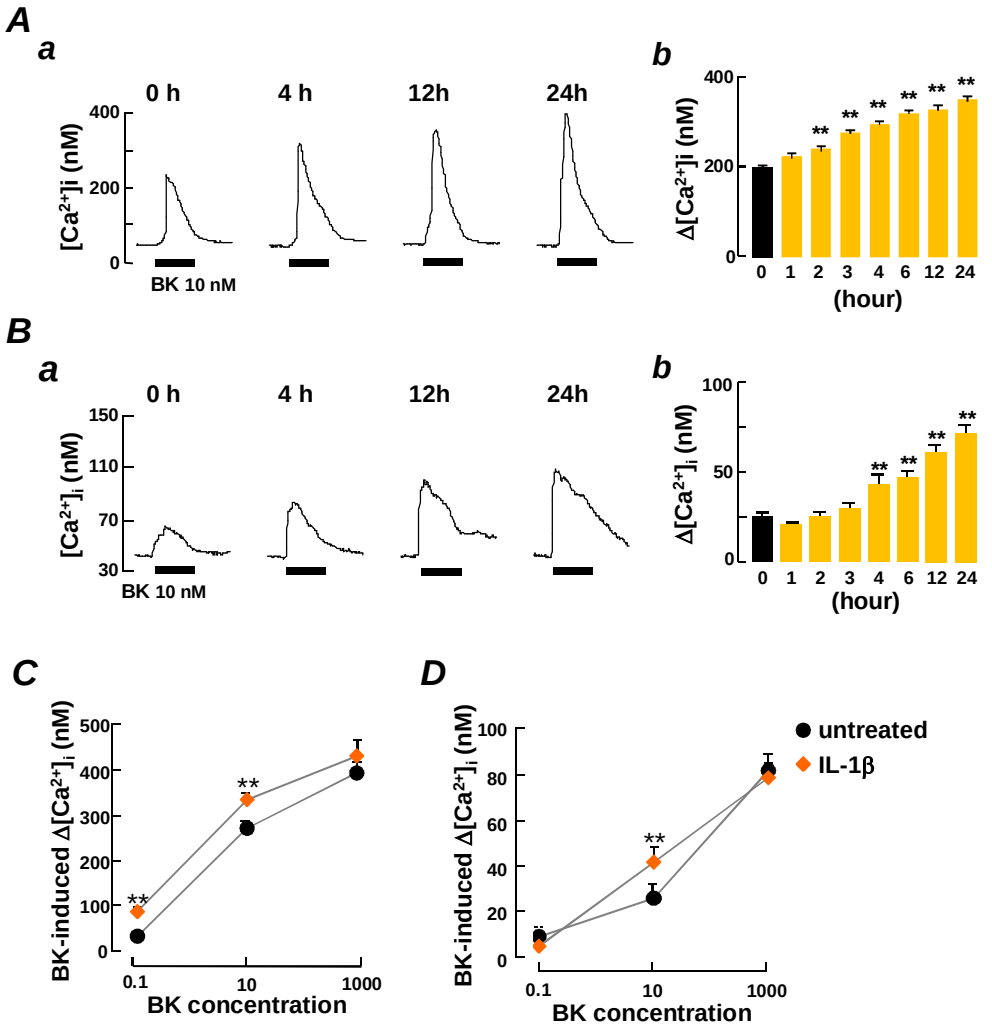

図18.　培養筋層間神経叢細胞におけるbradykinin反応に対するinterleukin-1β作用

A、B：培養筋層間神経叢細胞における BK 反応に対する IL-1β処置の時間依存性効果。培養筋層間神経叢細胞における腸管グリア細胞（A）或いは神経細胞（B）を様々な時間（0~24 時間）で IL-1β（10 ng/ml）処置した培養筋層間神経叢細胞における BK（10 nM、120 秒間）による典型的な$[Ca^{2+}]_i$増加反応（a）と$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）（b）。カラムは mean ± S.E.M. を示す。Ab; *n*=63-84、Bb; *n*=60-85。C、D：IL-1β処置細胞における BK 濃度依存性の$[Ca^{2+}]_i$増加反応。無処置（untreated）或いは IL-1β（10 ng/ml）を 24 時間処置した培養筋層間神経叢細胞を様々な濃度の BK（100 pM~1 μM）で刺激したときの腸管グリア細胞（C、untreated; *n*=53-59、IL-1β; *n*=47-56）或いは神経細胞（D、untreated; *n*=20-26、IL-1β; *n*=31-34）における$\Delta[Ca^{2+}]_i$を mean ± S.E.M.のシンボルで示す。**は untreated における同濃度 BK 刺激による反応に対する有意差（$p<0.01$）を示す。

されなかった。

BK 受容体において、B2 受容体は恒常的に発現しているのに対して、B1 受容体は炎症性サイトカインにより発現が誘導されることが様々な組織において報告されている（Marceau *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2004）。培養筋層間神経叢細胞を用いた RT-PCR の結果、B1 及び B2 受容体の発現が確認されたことから（図 4A）、IL-1β処置による BK 反応の増強にどちらの受容体サブタイプが関与するかを各受容体サブタイプの拮抗薬により検討した。無処置或いは IL-1β（10 ng/ml）処置した培養筋層間神経叢細胞において、B1 受容体拮抗薬（Lys-des-Arg^9-HOE140、1 μM）を 30 秒間前投与し、この存在下で BK（10 nM）により 120 秒間刺激した。B2 受容体拮抗薬である HOE140（1 μM）についても、同様に BK 反応に対する作用を調べた。腸管グリア細胞（A）或いは神経細胞（B）におけるこれらの拮抗薬非存在下（control）及び存在下での BK による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応を図 19a、b に、$\Delta[Ca^{2+}]_i$を図 19c に示した。無処置培養では、BK 反応は腸管グリア細胞と神経細胞の両方で B1 受容体拮抗薬による影響を受けず、B2 受容体拮抗薬により消失した。一方、IL-1β処置により増強された両細胞におけるBK反応は B1 受容体拮抗薬によって有意に抑制された。加えて、B2 受容体拮抗薬は腸管グリア細胞における BK 反応を完全には消失させず、一方、神経細胞の BK 反応については完全に消失させた。IL-1β処置により、腸管グリア細胞と神経細胞の両方における BK 反応が B1 受容体拮抗薬により抑制されたので、次に両細胞の$[Ca^{2+}]_i$への選択的 B1 受容体作動薬の作用を調べた。二種類の異なった B1 受容体作動薬（des-Arg^9-BK、BK fragment 1-8、それぞれ 1 μM、210 秒間）は、無処置腸管グリア細胞においては小さな$[Ca^{2+}]_i$増加を引き起こしたのみであったが、IL-1β処置すると有意に大きな$[Ca^{2+}]_i$増加を生じるようになり（図 20Aa、Ba）、この反応は B1 受容体作動薬濃度依存性に増大した（図 20Ab、Bb）。また、IL-1β処置した腸管グリア細胞において、B1 受容体作動薬投与から$[Ca^{2+}]_i$増加の最大反応までの時間は B1 受容体作

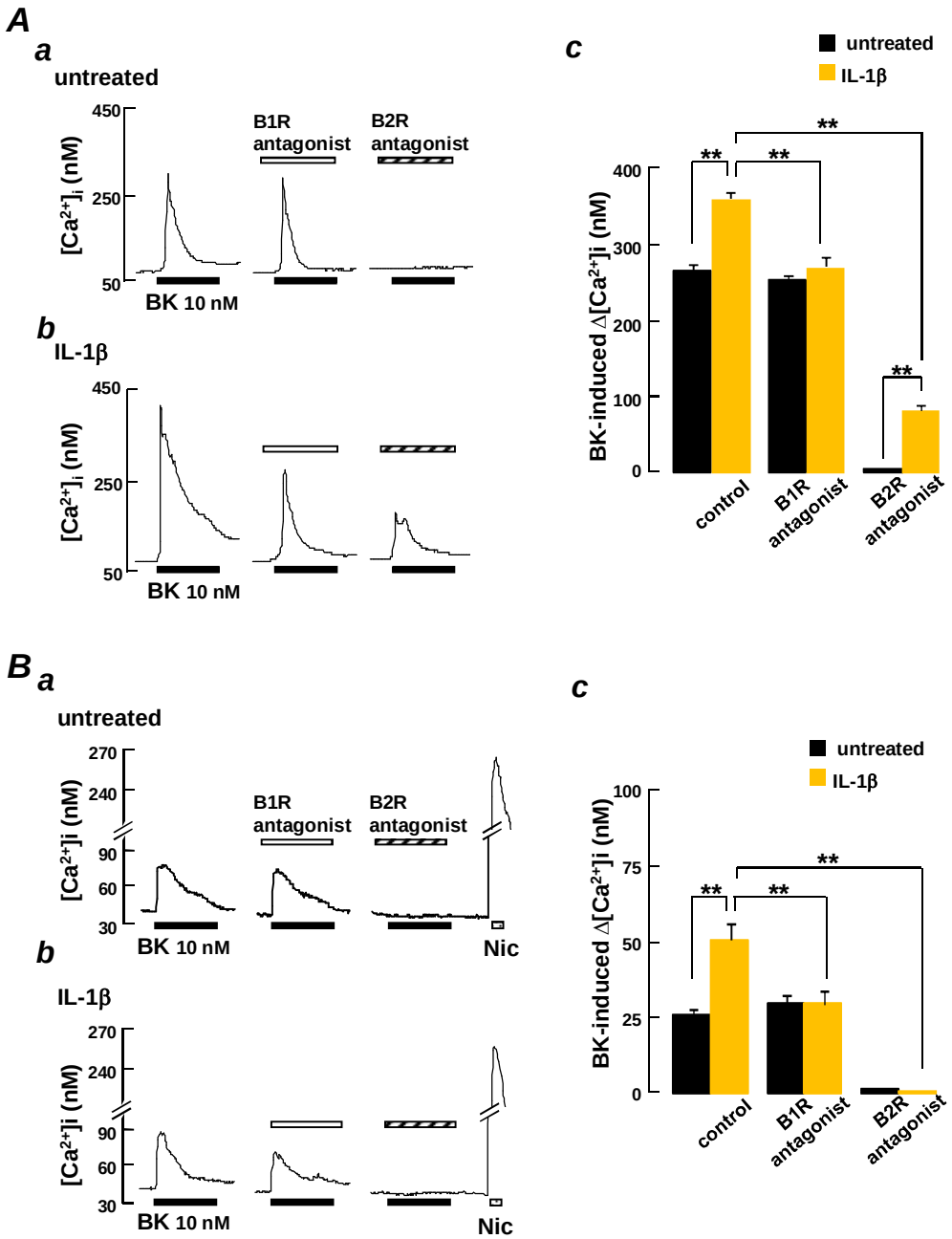
A
a
untreated
450
250
50
[Ca2+]i (nM)
B1R antagonist
B2R antagonist
BK 10 nM
b
IL-1β
450
250
50
[Ca2+]i (nM)
BK 10 nM
c
untreated
IL-1β
BK-induced Δ[Ca2+]i (nM)
400
300
200
100
0
**
**
**
**
control
B1R antagonist
B2R antagonist
B
a
untreated
270
240
90
60
30
[Ca2+]i (nM)
B1R antagonist
B2R antagonist
BK 10 nM
Nic
b
IL-1β
270
240
90
60
30
[Ca2+]i (nM)
BK 10 nM
Nic
c
untreated
IL-1β
BK-induced Δ[Ca2+]i (nM)
100
75
50
25
0
**
**
**
control
B1R antagonist
B2R antagonist

図19.　Interleukin-1β**処置した培養筋層間神経叢細胞におけるbradykinin反応に対するbradykinin受容体拮抗薬の効果**

無処置（a、untreated）**或いはIL-1β処置**（b、10 ng/ml）**した腸管グリア細胞**（A）**及び神経細胞**（B）**におけるBK単独**（10 nM、120**秒間**）、B1**受容体拮抗薬**（Lys-des^{9}-HOE140、1 μM）**存在下**、B2**受容体拮抗薬**（HOE140、1 μM）**存在下でのBKによる典型的な**$[Ca^{2+}]_i$**反応と**$[Ca^{2+}]_i$**反応の増加分**（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）（c）。**カラムは**mean ± S.E.M.**を示す**。**神経細胞については**、nicotine（Nic、100 μM、30**秒間**）**による**$[Ca^{2+}]_i$**増加反応も併せて示した**。A: untreated; *n*=48-66、IL-1β; *n*=38-60、B: untreated; *n*=38-60、IL-1β; *n*=69-97。

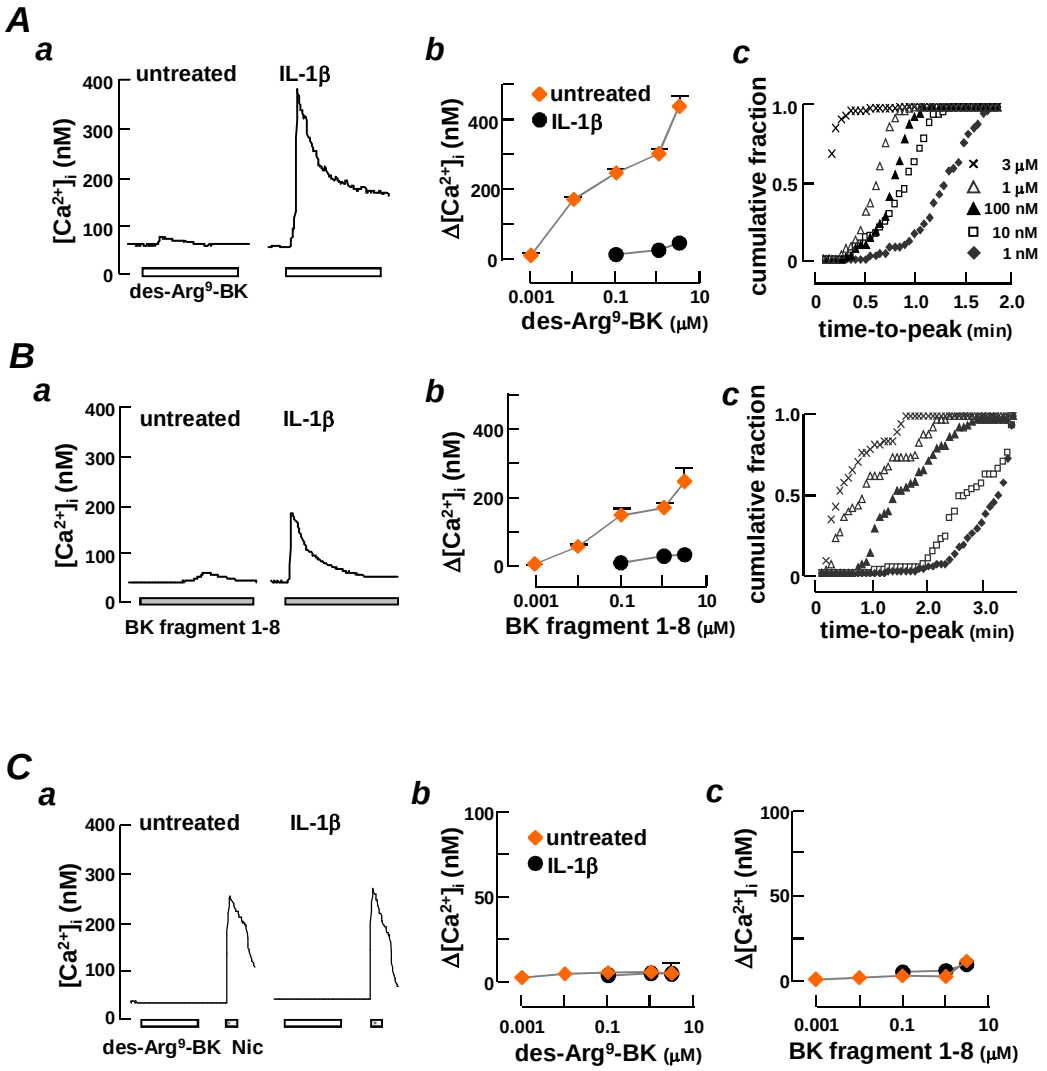
A
a
untreated
IL-1β
[Ca2+]i (nM)
des-Arg9-BK
b
untreated
IL-1β
Δ[Ca2+]i (nM)
des-Arg9-BK (μM)
c
cumulative fraction
3 μM
1 μM
100 nM
10 nM
1 nM
time-to-peak (min)
B
a
untreated
IL-1β
[Ca2+]i (nM)
BK fragment 1-8
b
Δ[Ca2+]i (nM)
BK fragment 1-8 (μM)
c
cumulative fraction
time-to-peak (min)
C
a
untreated
IL-1β
[Ca2+]i (nM)
des-Arg9-BK
Nic
b
untreated
IL-1β
Δ[Ca2+]i (nM)
des-Arg9-BK (μM)
c
Δ[Ca2+]i (nM)
BK fragment 1-8 (μM)

図20.　Interleukin-1β処置した培養筋層間神経叢細胞におけるB1受容体作動薬の作用

A、B：（a）無処置（untreated）或いはIL-1β処置（10 ng/ml）した腸管グリア細胞においてのB1受容体作動薬（A：des-Arg^9-BK、1 μM、B：BK fragment 1-8、1 μM、120秒間）による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応。（b）無処置或いはIL-1β処置腸管グリア細胞における様々な濃度のB1受容体作動薬刺激による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。シンボルはmean ± S.E.M.を示す。A: untreated; *n*=60-88、IL-1β; *n*=81-96、B: untreated; *n*=30-47、IL-1β; *n*=53-65。（c）bで示したIL-1β処置細胞おけるB1受容体作動薬による$[Ca^{2+}]$反応において、刺激から最大反応までの時間を累積細胞数割合（cumulative fraction）で示した。C：（a）無処置或いはIL-1β処置した神経細胞におけるB1受容体作動薬（des-Arg^9-BK、1 μM、120秒間）及びnicotine（100 μM、30秒間）による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応。（b、c）無処置或いはIL-1β処置神経細胞における様々な濃度のB1受容体作動薬刺激（b：des-Arg^9-BK、c：BK fragment 1-8）による$\Delta[Ca^{2+}]_i$。シンボルはmean ± S.E.M.を示す。des-Arg^9-BK: untreated; *n*=56-93、IL-1β; *n*=62-93、BK fragment 1-8: untreated; *n*=36-54、IL-1β; *n*=30-45。

動薬濃度依存性に短縮した（図 20Ac、Bc）。一方、神経細胞においては、IL-1β処置の有無に拘らず、いずれの B1 受容体作動薬とも$[Ca^{2+}]_i$を変化させなかった（図 20C）。

2. LPS 処置培養

IL-1βによる BK 反応の増強に B1 受容体が関与していることが示唆されたので、IL-1β放出を引き起こす LPS によっても同様のことが起こるか否かを調べた。腸管グリア細胞において、LPS 無処置の BK 単独効果（10 nM、120 秒間）、LPS 処置（100 ng/ml、24 時間）の BK 単独効果或いは B1 受容体拮抗薬（Lys-des-Arg^9-HOE140、1 μM）存在下、B2 受容体拮抗薬（HOE140、1 μM）存在下での BK による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応を図 21A に示した。腸管グリア細胞における BK 反応は LPS 処置により増強され、B1 受容体拮抗薬により抑制されたのに加えて、B2 受容体拮抗薬存在下でも完全には消失せずに小さな$[Ca^{2+}]_i$増加反応が残存した。無処置、LPS 処置、IL-1ra 前処置後に LPS 処置した培養について、各受容体拮抗薬非存在下或いは存在下での腸管グリア細胞における BK による$\Delta[Ca^{2+}]_i$を図 21B に示した。LPS による増強作用は IL-1ra により抑制され、このとき BK 反応は B1 受容体拮抗薬による抑制は受けず、また B2 受容体拮抗薬により消失した。次に、LPS を様々な濃度（10 ng~10 μg/ml）で処置したときの B1 受容体作動薬に対する反応性の変化を調べた。それぞれの培養において、B1 受容体作動薬（des-Arg^9-BK、100 nM、240 秒間）による腸管グリア細胞における $[Ca^{2+}]_i$反応を重ね描きした結果を図 22A に、B1 受容体作動薬投与から$[Ca^{2+}]_i$反応が最大に達するまでの時間を LPS 濃度毎に累積細胞数割合（cumulative fraction）にまとめた結果を図 22B に示した。この結果より、腸管グリア細胞において B1 受容体作動薬による$[Ca^{2+}]_i$増加反応は LPS 濃度依存性に増強されることが分かった。また、これらの培養において、様々な濃度の B1 受容体作動薬（10 nM~1 μM）を投与したときの腸管グリア細胞における平均$\Delta[Ca^{2+}]_i$を図 22C に示した。LPS による B1 受容体作動薬による腸管グリ

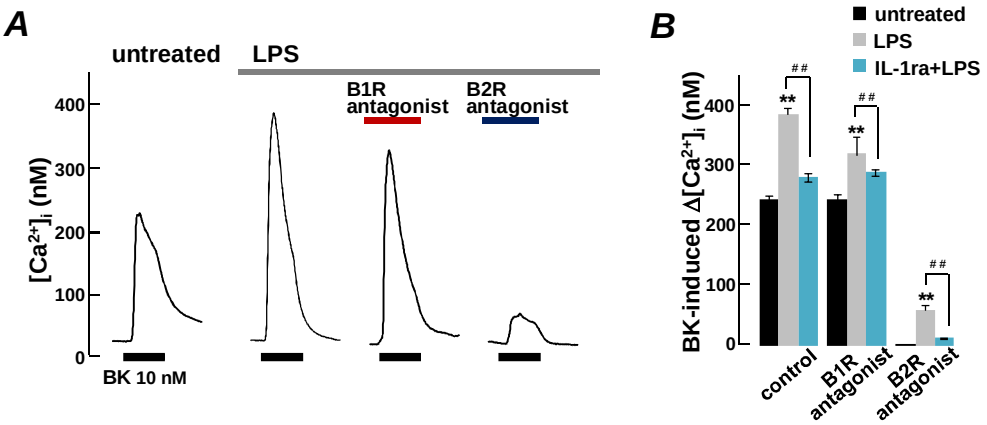

図21.　Lipopolysaccharide処置した腸管グリア細胞におけるbradykinin反応への受容体拮抗薬効果

A：無処置（untreated）腸管グリア細胞におけるBK単独（10 nM、120秒間）による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応とLPS処置（100 ng/ml、24時間）腸管グリア細胞におけるBK単独或いはB1受容体拮抗薬（Lys-des^9-HOE140、1 μM）存在下、B2受容体拮抗薬（HOE140、1 μM）存在下でのBKによる典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応。B：無処置、LPS処置、IL-1ra（200 ng/ml）を1時間前処置後その存在下でLPS処置（IL-1ra+LPS）した腸管グリア細胞におけるBK単独或いはB1受容体存在下、B2受容体存在下でのBKによる$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。カラムはmean ± S.E.M.を示す。Untreated; *n*=57-67、 LPS; *n*=52-58、IL-1ra+LPS; *n*=56-70。

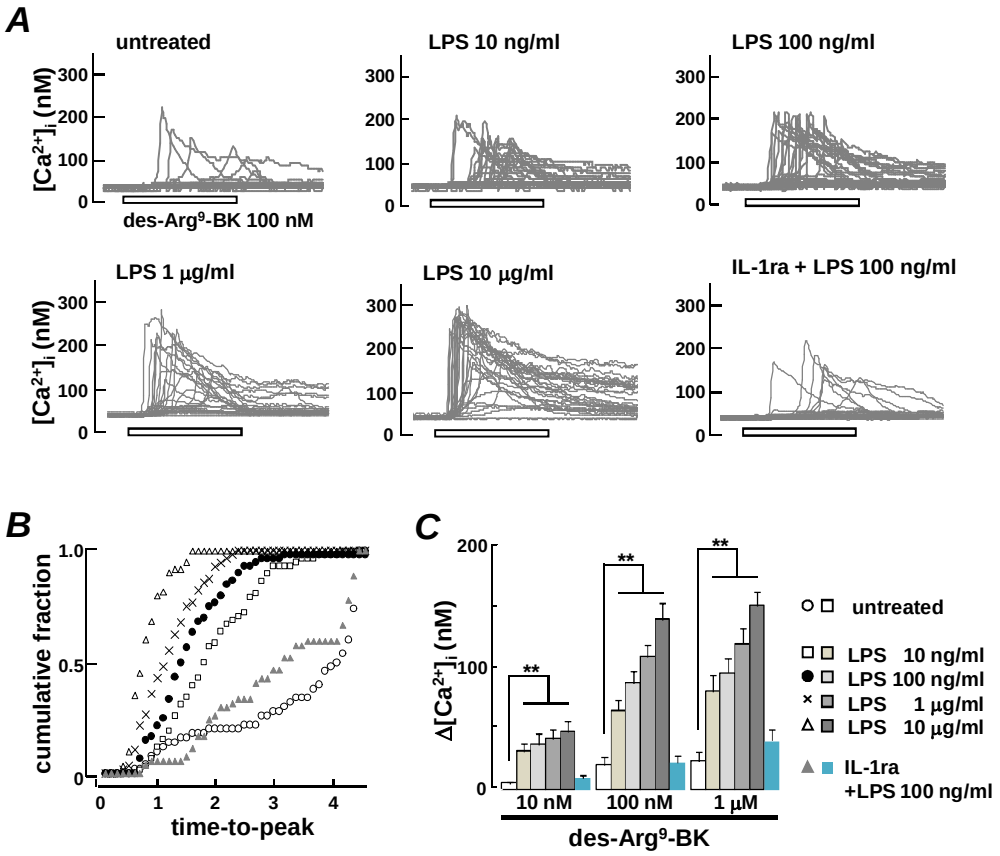

図22.　培養筋層間神経叢細胞でのB1受容体作動薬反応のlipopolysaccharide濃度依存性変化

A：無処置（untreated）或いは様々な濃度の LPS（10 ng~10 μg/ml）、IL-1ra（200 ng/ml）を 1 時間前処置してその存在下で LPS 処置（100 ng/ml、IL-1ra+LPS）した培養についての腸管グリア細胞における des-Arg^9-BK（100 nM、240 秒間）による$[Ca^{2+}]_i$ 反応を重ねて示した。Untreated: *n*=51、LPS 10 ng/ml: *n*=58、LPS 100 ng/ml: *n*=60、LPS 1 μg/ml: *n*=56、LPS 10 μg/ml: *n*=60、IL-1ra+LPS: *n*=54。B：各培養における des-Arg^9-BK による$[Ca^{2+}]_i$反応において、刺激から最大反応までの時間を累積細胞割合（cumulative fraction）で示した。C：各培養の腸管グリア細胞において、様々な濃度の des-Arg^9-BK（10 nM~1 μM）による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）を mean ± S.E.M.のカラムで示した。100 nM については A における反応の$\Delta[Ca^{2+}]_i$。10 nM; *n*=48-56、1 μM; *n*=40-57。

ア細胞の反応性の増大作用は IL-1ra の前処置により抑制された。以上の結果より、IL-1β処置と同様に LPS によっても BK 反応は増強され、この作用にも B1 受容体が関与していることが明らかになった。

3. RT-PCR 及び real-time PCR

薬理学的な検索の結果、IL-1βによる BK 反応の増強に B1 受容体の関与が示唆されたことから、IL-1βによって B1 受容体発現が増大しているか否かを RT-PCR により調べた。無処置或いは IL-1β処置（10 ng/ml、24 時間）した培養筋層間神経叢細胞それぞれについて、B1、B2 受容体及びβ-actin（陽性コントロール）の mRNA を検出した。PCR 反応を 25 サイクル行うと、B1 受容体 mRNA のバンドは IL-1β処置培養においてより強く検出された。なお、B2 受容体のバンドは IL-1β処置によって殆んど変化しなかった（図 23A）。次に、より定量的に解析するために、無処置或いは IL-1β処置した培養筋層間神経叢細胞における B1、B2 受容体の発現レベルを real-time PCR により調べた。図 23B にβ-actin と B1 受容体についての増幅曲線を、図 23C に無処置及び IL-1β処置細胞それぞれにおけるβ-actin 発現量に対する各受容体サブタイプの発現レベルの割合を示した。これらの結果より IL-1β処置は B1 受容体 mRNA 発現量を増大させるが、B2 受容体 mRNA 発現量には影響を与えないことが明らかになった。

4. 免疫細胞染色

IL-1βにより、培養筋層間神経叢細胞における B1 受容体 mRNA 発現が増強されたことから、B1 受容体蛋白の発現の局在を調べるために B1 受容体とグリアマーカーである S100 に対する抗体を用いて免疫染色を行った（図 24）。無処置細胞では B1

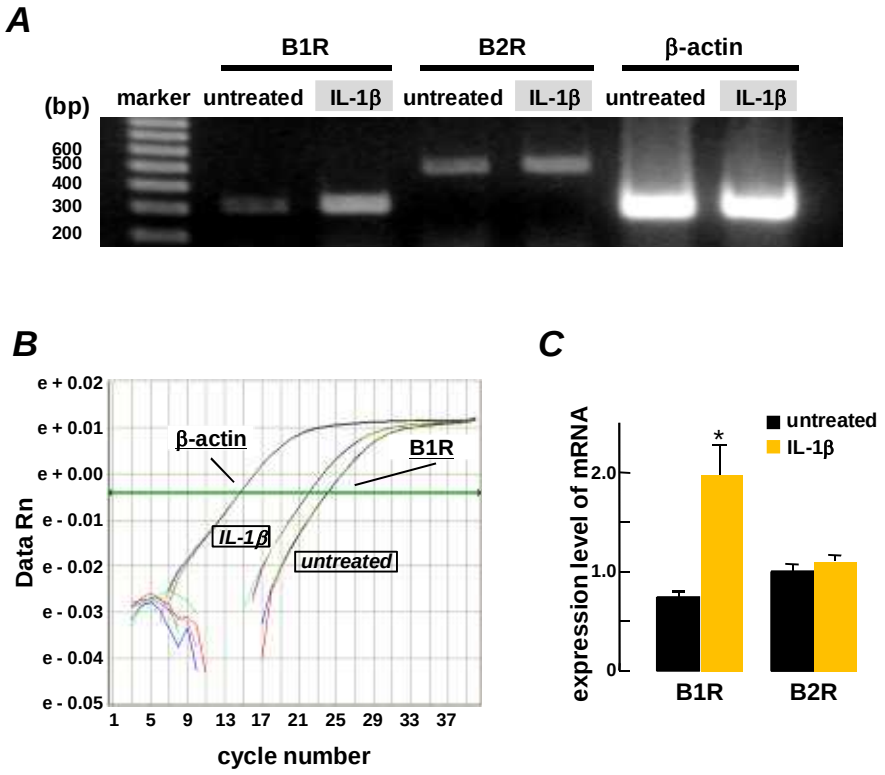

図23.　Interleukin-1β処置による培養筋層間神経叢細胞におけるbradykinin受容体mRNA発現レベルに対する影響

A：無処置（untreated）或いは IL-1β処置（10 ng/ml）した培養筋層間神経叢細胞からそれぞれ抽出した全 RNA を用いて、各 B1 受容体に特異的なプライマーにより、RT-PCR を行った（25 サイクル）。陽性コントロールとして、β-actin を使用した。B：無処置或いは IL-1β処置した培養筋層間神経叢細胞における B1 受容体及びβ-actin についての real-time PCR による増幅曲線。C：無処置或いは IL-1β処置した培養細胞の B1 受容体及び B2 受容体のβ-actin に対する mRNA 発現レベルを mean ± S.E.M.のカラムで示した（n=3）。*は無処置における発現レベルとの有意差（p<0.05）を示す。

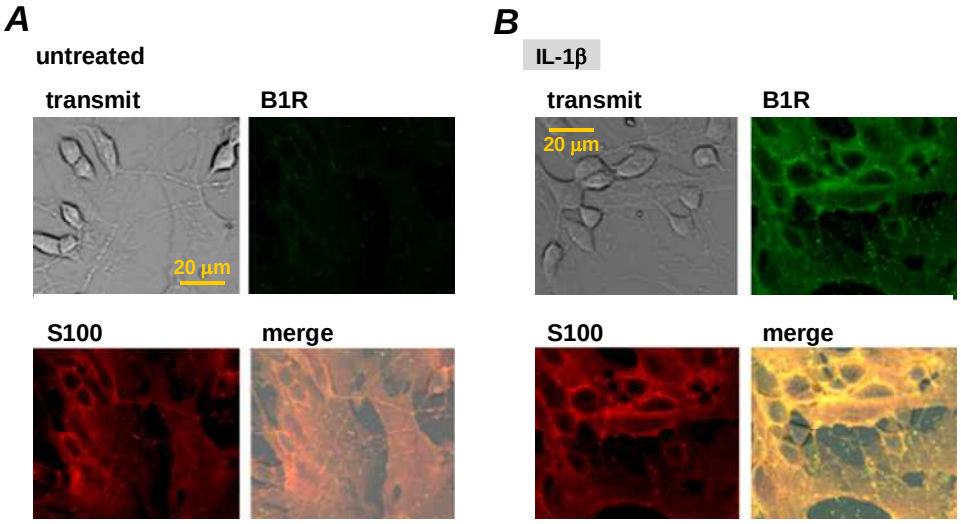

図 24.　Interleukin-1β処置した培養筋層間神経叢細胞における B1 受容体についての免疫染色像

無処置（A, untreated）及び IL-1β処置（B, 10 ng/ml）培養細胞について、抗 B1 受容体抗体と抗 S100 抗体を用いて免疫染色を行った。それぞれ、透過像（transmit）、B1 受容体免疫陽性細胞（緑）、S100 免疫陽性細胞（赤）、マージ像を示した。IL-1β処置により、S100 免疫陽性細胞における B1 受容体免疫陽性シグナルの増強が認められた。

受容体免疫陽性はごく弱く示されるのみであったが、IL-1β処置により S100 免疫陽性細胞における B1 受容体免疫陽性シグナルが増強された。IL-1β処置に拘らず、S100 免疫陰性細胞では B1 受容体発現は認められなかった。これらのことから、IL-1βによる B1 受容体発現の増強は腸管グリア細胞で生じていることが明らかとなり、B1 受容体作動薬を用いた薬理学的な実験の結果と一致した。

J. Bradykinin による prostaglandin E_2 放出への影響

1. Interleukin-1β処置による変化

本研究では、腸管グリア細胞から放出された PGE_2 が神経細胞上の EP_1 受容体に作用することにより、神経細胞における BK 反応が増強されることを明らかにした。加えて、神経細胞の BK 反応に対する IL-1βの増強作用は、腸管グリア細胞における B1 受容体発現の増大を介した反応であることが示唆された。そこで次に、IL-1β処置神経細胞における BK 反応の増強に腸管グリア細胞から放出される PGE_2 量の増大が関与している可能性を検討するために、無処置或いは IL-1β処置培養それぞれについて、神経細胞での BK（10 nM、120 秒間）反応に対する EP_1 受容体拮抗薬（SC19220、1 μM）の作用を調べた。IL-1β処置神経細胞における SC19220 非存在下及び存在下での BK 刺激による典型的な$[Ca^{2+}]_i$ 反応を図 25A に、無処置及び IL-1β処置神経細胞における BK による$\Delta[Ca^{2+}]_i$ を図 25B に示した。SC19220 は無処置神経細胞の BK 反応は変化させなかったが、IL-1β処置により増強された神経細胞の BK 反応を有意に抑制した。この結果は、IL-1β処置によって BK 刺激による PGE_2 放出が増強さることを示唆する。
そこで次に、それぞれの培養における BK（10 nM）による PGE_2 放出量の変化について検討した（図 26）。静止レベルの PGE_2 放出量は変化しなかったが、IL-1β処置細胞

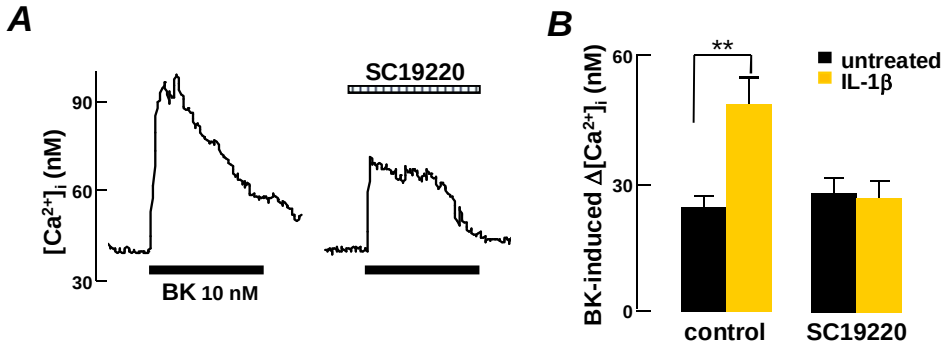

図 25.　Interleukin-1β処置による神経細胞における bradykinin 反応に対する選択的 EP_1 受容体拮抗薬作用への影響

A：IL-1β（10 ng/ml）処置した神経細胞における BK 単独（10 nM、60 秒間）或いは SC19220（1 μM）存在下での BK による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応。B：無処置（untreated）或いは IL-1β処置神経細胞における BK 単独（control）或いは SC19220 存在下における BK による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。カラムは mean ± S.E.M.を示す。Untreated: control; *n*=48、SC19220、*n*=41、IL-1β: control; *n*=38、SC19220、*n*=36。**は有意差（$p<0.01$）を示す。

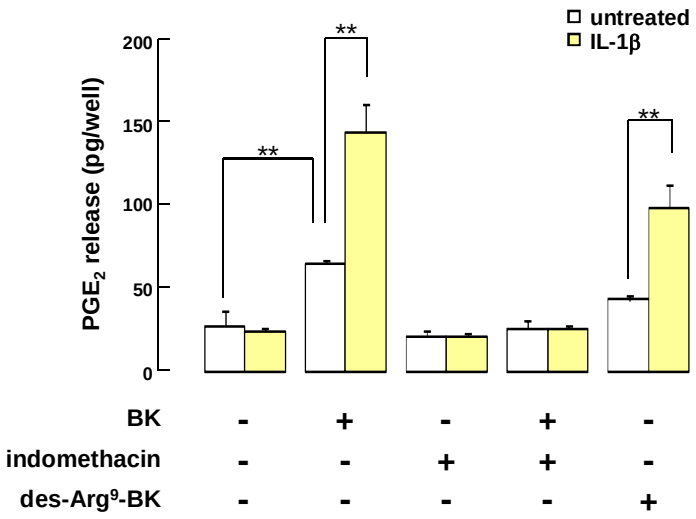

図 26.　Interleukin-1β処置による培養筋層間神経叢細胞からの prostaglandin E_2 放出の変化

無処置（untreated）或いは IL-1β処置（10 ng/ml）した培養細胞を栄養液のみ或いはそれぞれ BK（10 nM）、indomethacin（1 μM）、BK と indomethacin、B1 受容体作動薬（des-Arg^9-BK、1 μM）を含む栄養液で 10 分間インキュベーションしたときの PGE_2 放出量。カラムは mean ± S.E.M.を示す（n=3-4）。**はコントロール（BK-, indo-）における PGE_2 放出量との有意差（p<0.01）を示す。

からの BK 刺激による PGE_2 放出量は無処置細胞からの放出量に比べて有意に大きかった。この両培養での BK 刺激による PGE_2 放出は共に indomethacin（1 μM）により消失した。また、B1 受容体作動薬（des-Arg^9-BK、1 μM）は無処置細胞には影響を与えなかったが、IL-1β処置細胞からは PGE_2 を放出させた。以上のことから、IL-1βは腸管グリア細胞の B1 受容体発現を介して BK による PGE_2 放出量を増加させることが明らかになった。

2. 腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$反応との関与

PGs は PLA_2 によってリン脂質から遊離されたアラキドン酸に COX が作用することにより産生される。IL-1βが腸管グリア細胞において、B1 受容体発現を介して BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応を増強していたこと、また PLA_2 には Ca^{2+}依存性に活性化されるサブタイプがあることから、次に$[Ca^{2+}]_i$増加と PGE_2 放出の関係について検討した（図 27）。まず、BK による PGE_2 放出量に対する細胞内 Ca^{2+}の影響について調べた。EGTA（0.5 mM）を含む Ca^{2+}-free 溶液下で thapsigargin（0.5 μM）を処置することで細胞内外の Ca^{2+}の関与を無くしたために、BK 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$増加反応が生じない条件下では、BK（100 nM）は培養筋層間神経叢細胞からの PGE_2 放出を引き起こさなかった。そこで次に、$[Ca^{2+}]_i$ 増加そのものが PGE_2 放出を引き起こすか否かを検討した。Ca^{2+} ionophore である A23187（100 nM）の投与により PGE_2 放出量は有意に増加し、この放出は非選択的 PLA_2 抑制薬である aristolochic acid（1 μM）によって消失した。なお、A23187（100 nM）或いは BK（10 nM）による腸管グリア細胞における$\Delta[Ca^{2+}]_i$は同程度であった（データは示していない）。これらの結果から、腸管グリア細胞からの PGE_2 放出には Ca^{2+}依存性 PLA_2 の活性化が関与していることが示唆された。

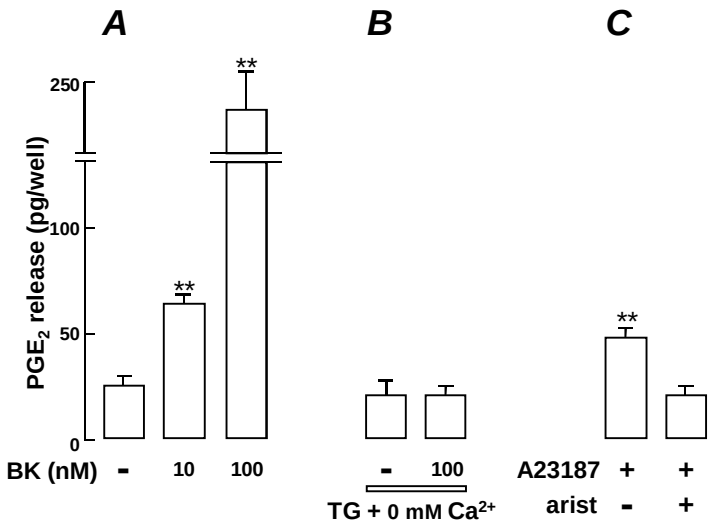

図27.　培養筋層間神経叢細胞からのprostaglandin E_2放出と細胞内Ca^{2+}濃度増加の関与

A： BK（10、100 nM）存在下或いは非存在下で培養細胞を 10 分間インキュベーションしたときの栄養液中の PGE_2 量。B：EGTA（0.5 mM）を含む Ca^{2+}-free 溶液中で thapsigargin（TG、0.5 μM）を 10 分間処置して溶液を交換し、更に Ca^{2+}-free 溶液のみ或いは BK（100 nM）を含む Ca^{2+}-free 溶液で 10 分間インキュベーションしたときの培養細胞からの PGE_2 放出量。C：A23187（100 nM）のみ或いは A23187 に加えて aristolochic acid（arist、1 μM）を含む栄養液で 10 分間インキュベーションしたときの培養細胞からの PGE_2 放出量。カラムは mean ± S.E.M.を示す（n=4)。**はコントロール（BK-）における PGE_2 放出量との有意差（p<0.01）を示す。

K. Interleukin-1β作用への cyclooxygenase-prostaglandins 系の関与

1. Phospholipese A_2 抑制薬及び cyclooxygenase 抑制薬の効果

BK 刺激による培養筋層間神経叢細胞からの PGE_2 放出に PLA_2 が関与することが示されたので、IL-1βによる神経細胞における BK 反応の増強及び BK による培養筋層間神経叢細胞からの PGE_2 放出の増強作用に PLA_2 が関与しているか否かについて調べた。まず、無処置或いは IL-1β処置培養それぞれにおける非選択的 PLA_2 抑制薬（aristolochic acid、1 μM）の効果を検討した。Aristolochic acid は無処置神経細胞の BK 反応を変化させなかったが、IL-1β処置した神経細胞の BK 反応を有意に抑制した（図 28A、B）。更に、BK による無処置及び IL-1β処置培養からの PGE_2 放出も、aristolochic acid により静止時の PGE_2 放出レベルにまで抑制された（図 28C）。

PGE_2 産生には PLA_2 の下流で働く COX も関与する。COX には恒常性に発現する COX-1 と誘導性の COX-2 のサブタイプが存在する。様々な組織において炎症性疾患や炎症性サイトカインにより COX-2 発現が増強することが報告されているため、IL-1βによる BK 反応の増強作用に COX-2 が関与しているか否かを薬理学的に検討した。その結果、無処置の神経細胞の BK による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応に対して、非選択的 COX 抑制薬（indomethacin、1 μM）と選択的 COX-2 抑制薬（nimesulide、1 μM）は共に影響を与えなかった。一方、IL-1β処置した神経細胞においては、選択的 COX-2 抑制薬は BK 反応を有意に抑制したものの、非選択的 COX 抑制薬のように無処置神経細胞における BK 反応のレベルにまでは抑制しなかった（図 28A、B）。BK による PGE_2 放出に対する COX 抑制薬の作用についても検討した。無処置細胞における BK による PGE_2 放出は非選択的 COX 抑制薬では抑制されたが、選択的 COX-2 抑制薬では抑制されなかった。一方、IL-1β処置細胞からの BK による PGE_2 放出は非選択的 COX 抑制薬によ

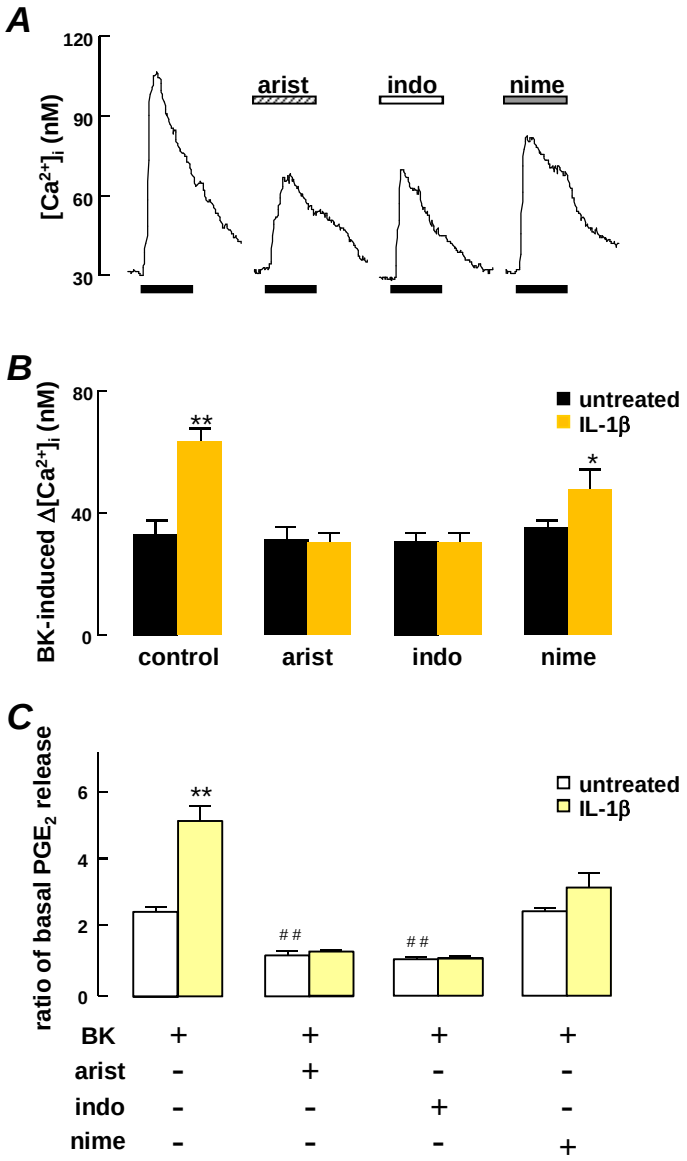
A
120
90
60
30
[Ca2+]i (nM)
arist
indo
nime
B
80
40
0
BK-induced Δ[Ca2+]i (nM)
untreated
IL-1β
**
*
control
arist
indo
nime
C
6
4
2
0
ratio of basal PGE2 release
untreated
IL-1β
**
##
##
BK + + + +
arist - + - -
indo - - + -
nime - - - +

図 28.　Interleukin-1β処置培養における bradykinin による神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$反応と培養細胞からの PGE_2 放出に対する PLA_2 と COX の関与

A：IL-1β（10 ng/ml）処置した神経細胞における BK 単独（10 nM、120 秒間）或いは aristolochic acid（arist、1 μM）存在下、indomethacin（indo、1 μM）存在下、nimesulide（nime、1 μM）存在下での BK による典型的な$[Ca^{2+}]_i$反応。B：無処置（untreated）及び IL-1β処置神経細胞における BK 単独、aristolochic acid 存在下、indomethacin 存在下、nimesulide 存在下での BK による$[Ca^{2+}]_i$反応の増加分（$\Delta[Ca^{2+}]_i$）。カラムは mean ± S.E.M.を示す。Untreated; *n*=51-64、IL-1β; *n*=55-68。各条件での untreated における BK 反応に対する有意差を**（$p<0.01$）或いは*（$p<0.05$）で示す。C：無処置或いは IL-1β処置した培養筋層間神経叢細胞からの BK 単独、aristolochic acid（1 μM）存在下、indomethacin（1 μM）存在下、nimesulide（1 μM）存在下での BK（10 nM）による PGE_2 放出量を静止時の PGE_2 放出に対する割合で示した。カラムは mean ± S.E.M.を示す（*n*=3-4）。**は各条件での untreated における BK による PGE_2 放出に対する有意差（$p<0.01$）を、##は untreated における BK に対する有意差（$p<0.01$）を示す。

り静止時の放出レベルにまで抑制されたが、選択的 COX-2 抑制薬では一部を抑制するのみであった（図 28C）。

2. 免疫細胞染色

IL-1β処置による PGE_2 放出増大に対する COX-2 の関与が示唆されたことから、培養筋層間神経叢細胞に COX-2 蛋白が発現増大するか否かを調べるために、COX-2 と S100 或いは PGP9.5 に対する抗体を用いて免疫染色を行った（図 29）。無処置培養では COX-2 免疫陽性のシグナルはごく弱かったが、IL-1β処置により COX-2 シグナルは顕著になった。COX-2 免疫陽性は S100 免疫陽性細胞においてのみ認められ、PGP9.5 免疫陽性細胞とは一致しなかった。これらのことから、IL-1β処置は腸管グリア細胞において COX-2 発現を誘導し、その結果、BK による PGE_2 放出が増加することが示唆された。

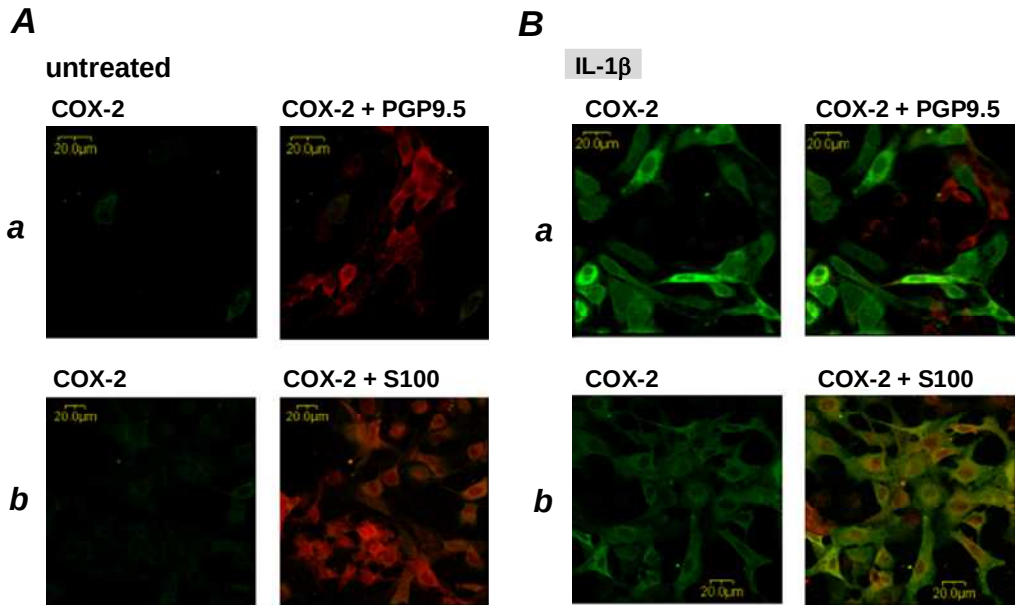

図 29.　Interleukin-1β処置した培養筋層間神経叢細胞における COX-2 についての免疫染色像

無処置（A , untreated）及び IL-1β処置（B , 10 ng/ml）培養細胞について、(a) 抗 COX-2 抗体と抗 PGP9.5 抗体或いは (b) 抗 COX-2 抗体と抗 S100 抗体を用いて免疫染色を行った。IL-1β処置により、S100 免疫陽性細胞において COX-2 免疫陽性シグナルの増強が認められたが、PGP9.5 免疫陽性細胞では認められなかった。

V 考察

本研究において、ラット小腸筋層間神経細胞は BK により興奮性の制御を受けること、またこの作用を腸管グリア細胞が調節していることを明らかにした。更に、IBD において血中レベルが増加することが知られている LPS と炎症性サイトカイン（IL-1β）が腸管グリア細胞の表現型の変化を介して神経細胞の BK 作用を増強させることを示した。本研究により見出された筋層間神経叢における神経‐腸管グリア相互作用の関係を図 30 及び 31 に示した。即ち、BK は神経細胞の B2 受容体を介して膜電位と$[Ca^{2+}]_i$を増加させ、同時に腸管グリア細胞においても B2 受容体を介して$[Ca^{2+}]_i$を増加させる。この腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$増加により活性化されたCa^{2+}依存性 PLA_2 と COX の作用によって PGE_2 が産生・放出される。この PGE_2 が神経細胞上の EP_1 受容体に作用し、神経細胞の BK 反応が増大する。更に、LPS は腸管グリア細胞から IL-1β放出を促し、この IL-1βが腸管グリア細胞に自己分泌性に作用して B1 受容体と COX-2 発現を誘導させる。このとき BK は B2 受容体に加え B1 受容体にも作用するために、腸管グリア細胞における $[Ca^{2+}]_i$反応が増強され PLA_2 がより活性化される。COX-2 の発現増大によっても PGE_2 産生量は増加するために、神経細胞における BK 反応が更に増強される。これらのことから、IBD 病態には神経細胞と腸管グリア細胞の相互作用の変化が関わっている可能性が示唆された。

A. 新生ラット小腸の筋層間神経叢の初代培養細胞の構成

特異的マーカーを用いた免疫染色の結果から、本実験で用いたラット小腸の筋層間神経叢の培養細胞は 30%の神経細胞と 68%の腸管グリア細胞で構成されることが分かった。Bassotti ら（2007）は成熟ラットの ENS における神経細胞と腸管グリア

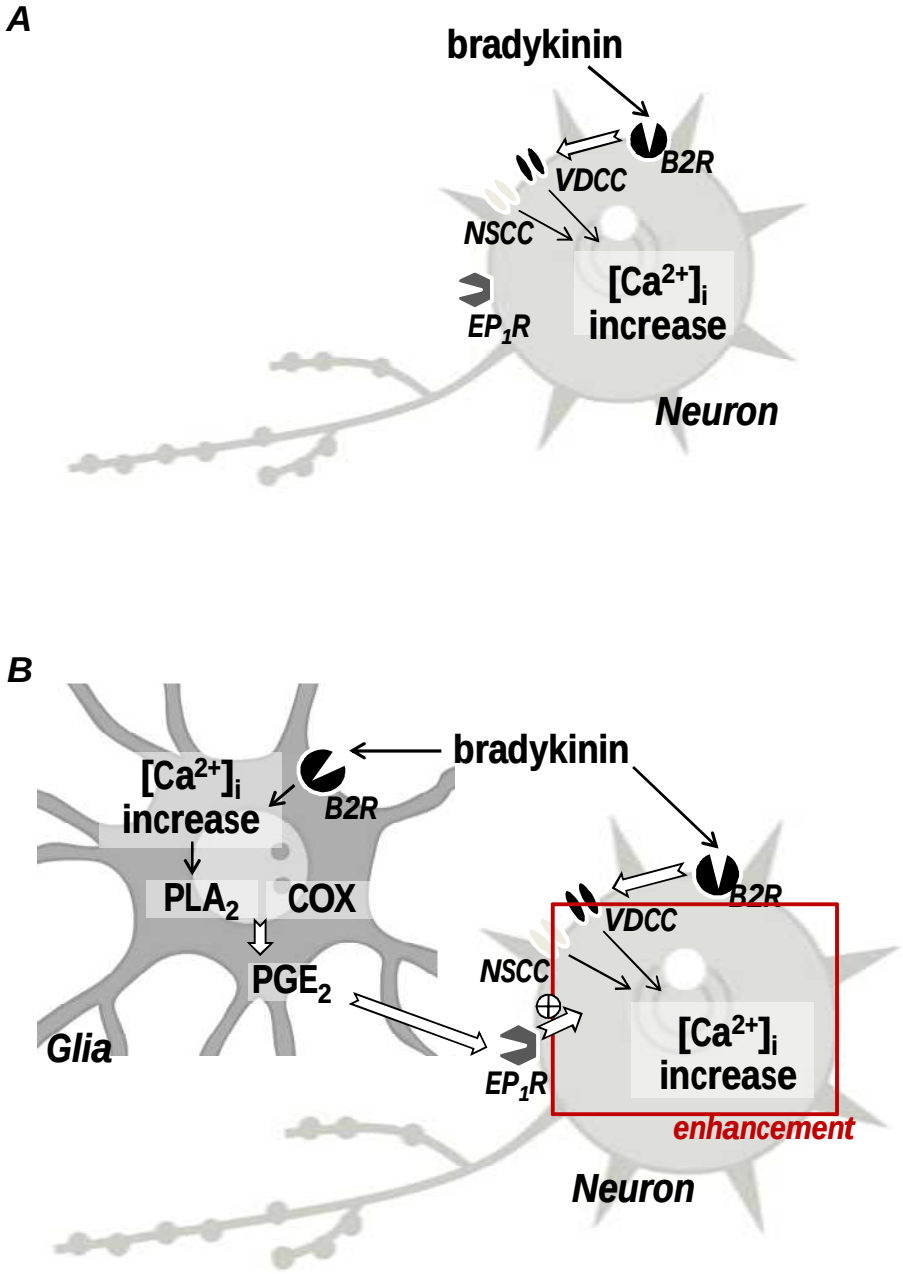

図 30.　Bradykinin 反応における神経‐腸管グリア相互作用（正常時）

A.　筋層間神経細胞における BK 反応。B. 培養筋層間神経叢細胞を BK 刺激したとき、筋層間神経細胞の BK 反応は腸管グリア細胞から放出された PGE_2 により増強される。

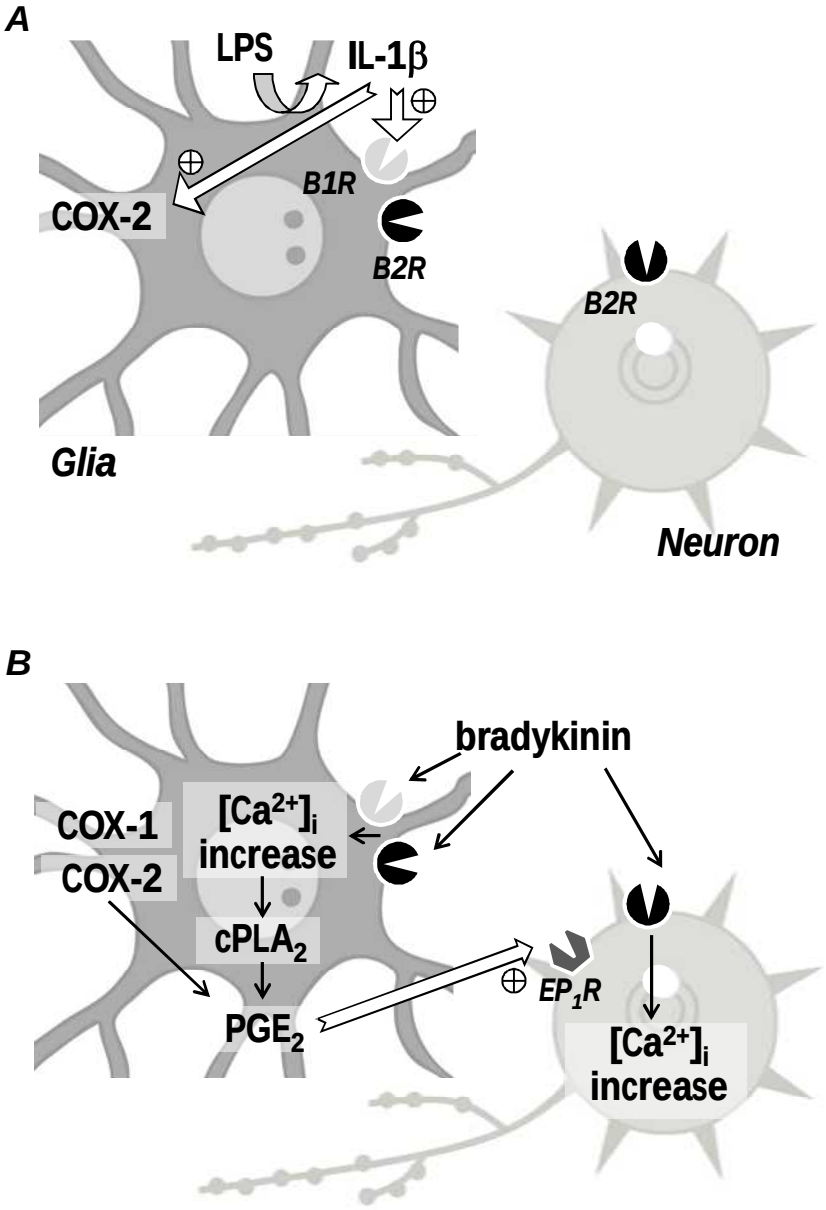

図 31.　培養筋層間神経叢細胞における lipopolysaccharide 作用の概要（炎症時）

A.　LPS は腸管グリア細胞から IL-1β放出を促し、この IL-1βは腸管グリア細胞において B1 受容体と COX-2 発現を誘導する。B. 腸管グリア細胞において、BK による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応が増大された結果、PLA_2 がより活性化され、加えて COX-2 が作用するために PGE_2 産生量が増加し、神経細胞における BK 反応が増強される。

細胞の構成割合が 1：3~4 であることを報告している。それ故、新生動物における筋層間神経叢の両細胞の割合は、成熟動物のそれとほぼ同程度であると考えられる。なお、新生マウスの回腸における筋層間神経叢では S100 を発現する神経細胞が数%存在し、成熟とともにその割合は減少することが報告されている（Young *et al.*, 2003）。

腸管神経細胞は形態学的特徴或いは特異的蛋白質の発現の違いから一次知覚神経、介在神経、運動神経に分類されている（Furness, 2006a）。本実験で用いた培養系では、神経細胞間に顕著な形態的差異が認められなかった。モルモット及びマウス腸管の一次知覚神経に特異的に発現する Ca^{2+}結合蛋白の calbindin に対する免疫染色性を調べたところ、calbindin に免疫陽性を示した神経細胞は 10%以下であった。この結果は以前の報告と一致した（Ohta *et al.*, 2005）。Haschke ら（2002）は組織の分離過程で calbindin 免疫陽性の特徴を有する神経細胞が消失してしまう可能性を示している。しかしながら、分離培養を行っていない筋層間神経叢‐縦走筋のホールマウント標本においても calbindin 免疫陽性神経細胞の割合は少なかった（3%程度）ため、新生ラット小腸の筋層間神経叢では calbindin 免疫陽性神経、即ち一次知覚神経が未発達である可能性がある。BK は calbindin 染色性に拘らずいずれの神経細胞でも$[Ca^{2+}]_i$増加反応を起こした。それ故、本実験で観察された神経細胞における BK 反応は、主に運動神経或いは介在神経に対する反応を反映していると考えられる。

B.　筋層間神経細胞に対する bradykinin 作用

本研究ではラット筋層間神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 動態と細胞膜電位変化に対する BK 作用を検討した。前述した様に、BK により神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$が増加し、これは主に細胞外からの Ca^{2+}流入による反応であった。しかし BK による$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は VDCC 遮断薬によって強く抑制されたが完全には消失しなかったことから、VDCC と

それ以外の Ca^{2+}流入機構が関与すると考えられる。モルモット筋層間神経叢を用いた研究では、BK は非選択的陽イオンチャネル（NSCC）に作用することにより神経細胞を脱分極させることを報告している（Hu *et al.*, 2003; 2004a; 2004b）。本実験でも、BK は神経細胞に持続的な脱分極を引き起こした。これらのことから、ラット筋層間神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$増加は直接 NSCC を介した Ca^{2+}流入と、NSCC 活性化による脱分極によって開口した VDCC を介する Ca^{2+}流入が関与していると考えられた。このような NSCC の活性化を介した電位依存性チャネルの活性化は、マウス背根神経節の神経細胞における Ca^{2+}流入機構に関与していることが示されている（Wu *et al.*, 2006）。

BK は直接作用により腸管平滑筋を収縮させ（Boschcov *et al.*, 1984）、腸管粘膜から陰イオン分泌を刺激する（Kachur *et al.*, 1987; Beltinger *et al.*, 1999）。一方、モルモット小腸の筋層間神経叢‐縦走筋標本においては、BK が PGs 依存性に神経からの acetylcholine 放出を引き起こすので、BK が ENS を介して腸管機能に作用する可能性が示されている（Yau *et al.*, 1986）。本研究では BK がラット筋層間神経細胞の興奮性を増大させたため、それにより神経伝達物質の放出を引き起こす可能性がある。それ故、腸炎病態時に BK 産生が増加すると、BK は腸管平滑筋や腸管粘膜への作用に加えて ENS への作用により腸管機能を変化させていると考えられる。

C.　神経細胞の bradykinin 反応に対する腸管グリア細胞の関与

近年、腸管グリア細胞は神経細胞構造の支持のみならず、神経栄養因子の放出や過剰な陽イオンの除去による微小環境の保持により、神経細胞に対する調節作用を有することが示されている（Cabarrocas *et al.*, 2003; Rühl *et al.*, 2004; Rühl, 2005; Bassotti *et al.*, 2007）。腸管グリア細胞を欠損させた遺伝子改変動物では、ENS におけ

る神経細胞の変性や神経伝達物質発現の変化が起こるため、腸管グリア細胞は神経細胞の維持には必要不可欠な要素である（Vasina *et al.*, 2006; Bassotti *et al.*, 2007）。更にアストロサイトに特異的に取り込まれて代謝抑制を起こす fluorocitrate が腸管グリア細胞も抑制し、その結果、摘出腸管におけるグルコースやペプチドの吸収が減弱することや腸管輸送運動が抑制されることが示されている（Nasser *et al.*, 2006）。この報告では、腸管神経回路の調節に腸管グリア細胞が関わっている可能性が示唆されているが、直接的な証拠は示されていない。本実験では、培養中の腸管グリア細胞密度を低下させることにより、神経細胞における BK 反応が抑制されることを見出した。即ち、1) 通常の培養条件では神経細胞の BK 反応が COX 依存性であったのに対し、腸管グリア細胞を低密度にすると COX の関与が消失した。2) 培養筋層間神経叢細胞から BK 刺激による PGE_2 放出が腸管グリア密度を減らすことにより有意に抑制された。更に、3) 外因性に適用した PGE_2 により神経細胞における BK 反応が増強された。腸管グリア細胞は、CNS に存在するアストロサイトに類似した性質を持つことが報告されている（Cabarrocas *et al.*, 2003; Savidge *et al.*, 2007a; 2007b）。また、ウサギ大脳皮質より得られた培養アストロサイトは BK 刺激により PGE_2 を放出することが示されており（Ishimoto *et al.*, 1996）、ラット視覚皮質におけるアストロサイトは PGE_2 産生を介して神経活性を調節すると考えられている（Hirst *et al.*, 1999）。以上のことから、腸管グリア細胞は BK 刺激により PGE_2 を放出し、この PGE_2 によって神経細胞における BK 反応を増強していることが明らかとなり、筋層間神経叢では神経‐腸管グリア相互作用が存在することが示された。それ故、ENS において、病態時に活性化されたキニン‐カリクレイン系は腸管グリア細胞からの PGE_2 放出を介して神経細胞機能に影響を与えている可能性が示唆される。

D.　Prostaglandin E_2 による増強作用に関与する EP 受容体サブタイプ

EP 受容体には EP_1、EP_2、EP_3、EP_4 のサブタイプが存在し、また EP_3 は更に EP_{3A}、EP_{3B}、EP_{3C}、EP_{3D} に分類される（Sugimoto & Narumiya, 2007）。成熟ラット小腸の腸管神経叢神経節での in situ hybridization により、神経細胞では EP_1 受容体と EP_3 受容体、腸管グリア細胞では EP_1 受容体の mRNA の存在が示されている（Northey *et al.,* 2000）。本研究において、神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は EP_1 受容体拮抗薬により抑制された。一方、外因性に EP_3 受容体作動薬を適用しても PGE_2 の様に BK 反応を増強しなかった。これらの結果より、PGE_2 は EP_1 受容体を介して神経細胞の BK 反応を増強していることが分かった。EP_1 受容体は $G_{p/q}$ 蛋白共役受容体であり、活性化されると PLC-IP_3 経路を介して細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を促すと同時に Protein kinase C（PKC）作用を介して細胞膜上のチャネルをリン酸化することが知られている（Dey *et al.,* 2006）。本実験においては、外因性に投与した PGE_2 は単独では $[Ca^{2+}]_i$ を変化させなかった。BK による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が非常に小さかったことを考慮すると、神経細胞の細胞内 Ca^{2+} ストアは未発達なのかも知れない。一方、BK による神経細胞の脱分極が非選択的 COX 抑制薬の indomethacin により抑制されたことから、内因性 PGE_2 は NSCC を活性化させると考えられる。モルモットの小腸粘膜下神経叢の神経細胞において、BK は PGE_2 を介して PKC を活性化することにより神経細胞の NSCC をリン酸化し、その結果、神経細胞の興奮性を高めることが報告されている（Hu *et al.,* 2004a; 2004b）。

E.　腸管グリア細胞を介する炎症性サイトカインの作用

これまで IBD 病態に腸内細菌叢の変化が関与する可能性が示されており（Strober *et al.*, 2007; Rescigno, 2008）、更に LPS を含む細菌性内毒素が IBD 患者の血清中において検出されている（Caradonna *et al.*, 2000）。また、炎症性サイトカインの増加も IBD 患者の血清や生検組織中において認められ（Ligumsky *et al.*, 1990; MacDonald *et al.*, 1990; Reinecker *et al.*, 1993; Schreiber *et al.*, 1999）、これら炎症性物質の増加が IBD 病態を引き起こす可能性が示されている。本実験では、筋層間神経叢の初代培養の培養液に LPS 或いは IL-1β を添加して 24 時間培養すると、神経細胞と腸管グリア細胞の両方の BK 反応が増強することが示された。この LPS 及び IL-1β による BK 反応の増強は腸管グリア細胞の純培養においても認められ、更にこのときの LPS 作用が IL-1 受容体拮抗薬により抑制されたことから、LPS は腸管グリア細胞からの IL-1β 放出を介して BK 反応を増強していることが示唆された。このことは、純培養した腸管グリア細胞から LPS が IL-1β 放出を引き起こしたことで証明された。腸管グリア細胞の純培養と、この純培養と同程度の腸管グリア細胞数に加えて神経細胞が存在する共培養からの LPS による IL-1β 放出量には有意差が無かった。それ故、LPS 刺激による IL-1β 放出は神経細胞には由来しないと思われる。これまで LPS は腸管において、免疫細胞、粘膜上皮細胞、血管内皮細胞等から様々な炎症性サイトカインを放出させることが知られている（Ogawa *et al.*, 2003; Sartor, 2006; Bhattachayya *et al.*, 2007; Dambachher *et al.*, 2007; Mizutani *et al.*, 2007）。それ故本研究より、これらの細胞に加えて腸管グリア細胞も炎症性サイトカインの供給源のひとつであることが示された。

LPS は Toll-like receptor 4（TLR-4）に結合することにより最終的に nuclear factor κB（NF-κB）を活性化し、様々なサイトカインの誘導放出を引き起こして免疫

反応を進行させる（Zhang & Ghosh, 2000）。ヒトとマウス小腸において、平滑筋と筋層間神経叢における TLR-4 発現が報告されており、LPS 刺激によりこれらの細胞で NF-κBの核移行が起こることが示されている（Rumio *et al.*, 2006）。本実験において、データには示していないが、神経細胞での nicotine 反応及び腸管グリア細胞での ATP 反応は LPS 処置により増強したが、この増強作用については IL-1ra で抑制されなかった。このことから、これらの神経細胞での nicotine 反応及び腸管グリア細胞での ATP 反応に対する作用は、LPS の直接作用か、或いは LPS が IL-1β以外のサイトカインを放出させた結果の作用である可能性がある。In vitro 実験により腸管グリア細胞への LPS 処置により nerve growth factor（NGF）が放出されること（von Boyen *et al.*,, 2006）、また、ラット迷走神経下神経節の知覚神経細胞において NGF はニコチン性アセチルコリン受容体の電流密度を増大することが報告されている（Mandelzys & Cooper, 1992）。それ故、本研究で用いた筋層間神経叢の初代培養においても LPS によって放出された NGF 等のサイトカインが作用していたのかもしれない。IBD では IL-1βに加えて他の炎症性サイトカインの増加も報告されている（Brown & Mayer, 2007）。そのうち TNF-αは病態との関与も示されており、抗 TNF-αクローン抗体の IBD 治療薬への応用が検討されている（Barrie & Regueiro, 2007; Tilg *et al.*, 2008）。しかしながら、本実験では TNF-αα処置による培養筋層間神経叢細胞への影響は無かったことから、TNF-αは ENS を介さない機序により IBD 病態に関与していると思われる。

F.　腸管グリア細胞における特異的蛋白発現による神経機能への影響

腸管グリア細胞はアストロサイトと形態的及び機能的に良く似た性質を有し、炎症性サイトカインを放出し、そのサイトカインに対する受容体を発現する（Cabarrocas *et al.*, 2003; Rühl *et al.*, 2004; Rühl, 2005）。本実験では、腸管グリア細

胞より放出されたIL-1βが自己分泌性に作用することにより、腸管グリア細胞におけるB1受容体及びCOX-2発現が誘導されることが示された。このときBKが作用すると、恒常的に発現するB2受容体に加え、この発現誘導されたB1受容体も刺激されるために腸管グリア細胞における$[Ca^{2+}]_i$反応が増強されることが示された。ラット胃上皮細胞では、Ca^{2+}イオノフォアにより$[Ca^{2+}]_i$増加が起こるとPGE_2が放出され、この放出反応はCa^{2+}依存性に活性化されるcytosolic PLA_2を介していることが報告されている（Akiba *et al.,* 2000）。本実験においても、Ca^{2+}イオノフォアによりPLA_2依存性にPGE_2が放出されたことから、BKは腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$増加によりCa^{2+}依存性PLA_2活性化を介し、PGE_2を産生増加させることが示された。これらの結果から、LPSやIL-1β処置による神経細胞のBK反応の増強には、腸管グリア細胞からのPGE_2放出の増加が関与することが分かった。

PGE_2を含むエイコサノイドは、PLA_2によって細胞膜リン脂質から遊離されたアラキドン酸からCOX作用により産生される（Laye & Gill, 2003）。IL-1βは腸管グリア細胞におけるCOX-2発現を増加させることによっても、腸管グリア細胞からのPGE_2放出を増加させていることが分かった。以上のことから、炎症性刺激によって腸管グリア細胞の表現型（蛋白質発現）の変化が腸管神経機能に影響を与えることが明らかになった。腸炎では、ENSの神経可塑性変化に対する腸管グリア細胞の関与が報告されており（Lomax *et al.,* 2005）、このことに本実験で示したような腸管グリア細胞の変化が関係している可能性がある。腸管グリア細胞は腸管神経細胞のみならず、腸管を構成する他の要素とも相互作用する。例えば、S-nitrosoglutathione放出を介して粘膜上皮細胞間のタイトジャンクション形成に関わり、腸管上皮バリアを強固にする（Savidge *et al.,* 2007a）。それ故、炎症による腸管グリア細胞の機能変化は、様々な腸管機能に影響すると考えられる。

G.　*In vitro* 炎症モデルと炎症性腸疾患病態の相似性

腸炎モデル動物や IBD 患者において、BK を含むキニン類の活性化が病態の発生や維持に深く関わることが様々な研究により報告されている（Zeitlin & Smith, 1973; Stanicki *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2008）。本研究において、ラット小腸筋層間神経叢では、BK は腸管グリア細胞と神経細胞の B2 受容体に作用することにより、神経細胞を活性化させていることが示された。腸炎モデル動物において、選択性の高い B2 受容体拮抗薬により病勢が寛解されることが示されており（Arai *et al.*, 1999）、この病因に本実験で示した様な ENS への BK 作用が関与しているかもしれない。また、IBD 病態への関与が報告されている LPS 及び IL-1β が腸管グリア細胞における B1 受容体誘導による PLA_2 活性化及び COX-2 発現誘導を介して、ラット筋層間神経叢における BK 作用を増強することを示した。IBD 患者の腸管生検において B1 受容体発現の増強が認められており（Stanicki *et al.*, 2005）、B1 受容体は B2 受容体よりも脱感作され難く BK による反応が持続することからも（Cuthbert, 1999）、IBD において B1 受容体が治療標的として有用であると考えられている（Hara *et al.*, 2008; Marceau & Regoli, 2008）。更に PLA_2 や COX-2 の IBD 治療標的としての有用性も報告されている（Peterson *et al.*, 1996; Mahadevan *et al.*, 2002; Bonner *et al.*, 2002）。

以上、本研究では筋層間神経叢の初代培養細胞を用いた in vitro 炎症モデルにおいて示された腸管グリア細胞に特異的な蛋白発現が、ENS 機能変化を引き起こすことで IBD における腸管機能異常の一因となる可能性を示した。

V 総括

新生ラット小腸筋層間神経叢の初代培養細胞を用いて、bradykinin（BK）による腸管神経への作用と、その作用に対する腸管グリア細胞の関与の可能性を検討した。更に、炎症性腸疾患で増加する細菌由来リポ多糖体（lipopolysaccharide; LPS）及び炎症性サイトカインが腸管神経に与える影響について調べた。

1. 抗 protein gene product 9.5（PGP9.5）と抗 S100 抗体を用いた免疫染色により、新生ラット小腸の筋層間神経叢より得られた初代培養細胞は 30%の神経細胞と 68%の腸管グリア細胞で構成され、神経細胞は軸索によりネットワークを形成していた。

2. 初代培養細胞と筋層間神経叢ホールマウント標本の両方において、PGP9.5 免疫陽性細胞のうち一次知覚神経マーカーである calbindin に免疫陽性を示したのは 10%以下であった。BK は calbindin 免疫陽性と陰性の両方の神経細胞において細胞内 Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_i$）を増加させた。

3. BK は濃度依存性に神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$を増加させた。また、BK により$[Ca^{2+}]_i$増加を生じる細胞数も濃度依存性に増加した。

4. RT-PCR により、培養筋層間神経叢細胞において B1 と B2 受容体 mRNA が検出された。神経細胞における BK 反応は B1 受容体拮抗薬（Lys-des-Arg^9-HOE140）では影響を受けなかったが、B2 受容体拮抗薬（HOE140）でほぼ消失した。B1 受容体作動薬（des-Arg^9-BK）により神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$は変化しなかった。

5. 培養筋層間神経叢細胞において、PGP9.5 免疫陽性細胞と S100 免疫陽性細胞は共に B2 受容体免疫陽性を示した。

6. BK 刺激による神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$増加は、細胞外 Ca^{2+}除去及び Cd^{2+}による電位依存性 Ca^{2+}チャネル阻害により著明に減弱した。Thapsigargin により細胞内 Ca^{2+}ストアを涸渇させた条件下でも BK 反応は抑制された。

7. 非選択的 cyclooxygenase（COX）抑制薬（indomethacin）は神経細胞での BK 反応を有意に抑制した。外因性 prostaglandin E_2（PGE_2）はそれ自身では$[Ca^{2+}]_i$を変化させなかったが、BK 反応を増強した。PGI_2は BK 反応に影響を与えなかった。EP_1 受容体拮抗薬（SC19220）は BK 反応を抑制したが、EP_3 受容体作動薬（sulprostone）は BK 反応に影響を与えなかった。

8. BK は培養筋層間神経叢細胞から濃度依存性に PGE_2を放出させた。この放出反応は indomethacin により抑制された。

9. 神経細胞における BK による$[Ca^{2+}]_i$増加反応の大きさは、細胞密度の低下及び腸管グリア細胞数の減少により有意に低下した。Indomethacin は高密度で培養した条件での神経細胞の BK 反応を抑制したが、低密度での培養或いは腸管グリア細胞数を低下させた培養条件下での神経細胞の BK 反応には影響しなかった。

10. BK は神経細胞に持続的な脱分極を引き起こした。また、この脱分極に伴って活動電位を生じる細胞も存在した。BK による脱分極の大きさは indomethacin により減少した。BK は活動電位の発生に要するパルス電流量を低下させた。

11. BK（100 pM~10 μM）は腸管グリア細胞の$[Ca^{2+}]_i$を濃度依存性に増加し、この反応の大きさは細胞外 Ca^{2+}除去によって変化しなかった。Thapsigargin により細胞内 Ca^{2+}ストアを涸渇させた条件下或いは phospholipase C 抑制薬（U73122）存在下では BK 反応は消失した。

12. LPS 或いは interleukin-1β（IL-1β）処置により、神経細胞と腸管グリア細胞の両方において BK による$[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は増強したが、tumor necrosis factor-α（TNF-α）処置では変化しなかった。この LPS 及び IL-1βによる増強作用は腸管グリア細胞の純培養でも認められた。LPS による BK 反応の増強は IL-1 受容体拮抗薬（IL-1ra）前処置により抑制された。

13. 神経細胞における LPS 及び IL-1βによる BK 反応への増強作用は、腸管グリア細胞の培養密度を減少させると抑制された。

14. LPS は神経細胞と腸管グリア細胞から成る共培養と、腸管グリア細胞のみから成る純培養から IL-1βを放出させた。

15. IL-1βは時間依存性に腸管グリア細胞と神経細胞における BK 反応を増強した。無処置培養において、両細胞の BK 反応は B2 受容体拮抗薬（HOE140）により消失したが、B1 受容体拮抗薬（Lys-des-Arg^9-HOE140）では影響を受けなかった。IL-1βにより増強された両細胞における BK 反応は、B1 受容体拮抗薬によって抑制された。B2 受容体拮抗薬は IL-1β処置した神経細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を完全に消失させたが、腸管グリア細胞での反応は消失させなかった。

16. IL-1βは腸管グリア細胞においてはB1受容体作動薬（des-Arg^9-BK, BK fragment 1-8）による$[Ca^{2+}]_i$増加反応を著しく増強したが、神経細胞では IL-1β処置に拘らずB1受容体作動薬は$[Ca^{2+}]_i$増加を引き起こさなかった。

17. IL-1βは培養筋層間神経叢細胞のB1受容体mRNA発現レベルを増大させた。IL-1β処置培養では、グリアマーカーであるS100免疫陽性細胞におけるB1受容体免疫陽性シグナルの増強が認められた。

18. IL-1βによって増強された神経細胞のBK反応はEP_1受容体拮抗薬（SC19220）によって抑制された。培養筋層間神経叢細胞からのBKによるPGE_2放出量は、IL-1β処置により増加した。B1受容体作動薬（des-Arg^9-BK）は無処置細胞からのPGE_2放出を引き起こさなかったが、IL-1β処置細胞からはPGE_2放出を有意に増強した。

19. 細胞外Ca^{2+}を除去した上で細胞内Ca^{2+}ストアを涸渇させた条件下では、BKによる培養細胞からのPGE_2放出は起こらなかった。Ca^{2+}イオノフォア（A23187）によりPGE_2が放出され、この放出は非選択的PLA_2抑制薬（aristolochic acid）により抑制された。

20. Aristolochic acid及びindomethacinはIL-1β処置神経細胞におけるBKによる$[Ca^{2+}]_i$増加反応とBKによるPGE_2放出を抑制した。選択的COX-2抑制薬（nimesulide）は無処置培養細胞からのBKによるPGE_2放出量には影響を与えず、IL-1β処置培養細胞からのそれを部分的に抑制した。また、IL-1βにより増強された神経細胞におけるBK反応を部分的に抑制した。

21. IL-1βは S100 免疫陽性細胞において COX-2 免疫陽性シグナルを増強したが、PGP9.5 免疫陽性細胞では IL-1β処置の有無に拘らず COX-2 免疫陰性であった。

以上の結果から、ラット筋層間神経叢において BK は B2 受容体の活性化を介して神経細胞を脱分極させ、$[Ca^{2+}]_i$ 増加を引き起こした。同時に、BK は腸管グリア細胞の B2 受容体を活性化して PGE_2 を放出させ、この PGE_2 が神経細胞における BK 反応を増強することが明らかとなった。更に、LPS は腸管グリア細胞からの IL-1β放出を促し、腸管グリア細胞における特異的蛋白（B1 受容体、COX-2）の発現を引き起こした。その結果、腸管グリア細胞からの PGE_2 産生の更なる増大により、神経細胞がより活性化されることが示された。これらのことから、炎症性腸疾患における病態には腸管グリア細胞を介した神経‐腸管グリア相互作用の変化が関与している可能性が示された。

謝辞

稿の終わりに臨み、本論文をまとめるに当たって終始御指導、御校閲頂きました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座薬理学教室　伊藤茂男教授に深甚なる感謝を申し上げます。同時に、同教室での研究生活に渡って格別のご鞭撻を賜ったことを厚く御礼申し上げます。

本論文を御校閲頂きます北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座生化学教室　木村和弘教授、同解剖学教室　昆泰寛教授に心から厚く御礼申し上げます。北海道大学大学院獣医学研究科獣医学研究科比較形態機能学講座薬理学教室の太田利男准教授には貴重な研究テーマを与えて頂き、また本研究を進めるに当たり的確で示唆に富んだ御指導を賜ったのみならず、研究への真摯な態度をご教示頂きました。言葉では言い尽くせない程の感謝の気持ちに満ちております。

村上重美氏をはじめとする技官の方々には、実験動物や実験機器を安全かつ適正に管理して頂き、より良い研究環境を提供して頂きました。北海道大学大学院獣医学研究科の教員の方々には、公私に渡り多くの有益なご指導を賜りました。研究生活を送るに当たり、北海道大学獣医学部の事務の方々にもひとかたならぬ御協力を頂きました。みなさまにこの場を借りて御礼申し上げます。

最後に、薬理学教室の教室員の方々や友人、先輩、後輩には日々暖かい励ましを頂き、充実した博士課程を過ごさせて頂きました。みなさまに深く感謝致します。

参考文献

1. Akiba, S., Hatazawa, R., Ono, K., Hayama, M., Matsui, H. & Sato, T. (2000). Transforming growth factor-alpha stimulates prostaglandin generation through cytosolic phospholipase A(2) under the control of p11 in rat gastric epithelial cells. *Br J Pharmacol* **131**: 1004-1010.
2. Arai, Y., Takanashi, H., Kitagawa, H., Wirth, K.J. & Okayasu, I. (1999).Effect of icatibant, a bradykinin B2 receptor antagonist, on the development of experimental ulcerative colitis in mice. *Dig Dis Sci* **44**: 845-851.
3. Barrie, A. & Regueiro, M. (2007). Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 1424-1429.
4. Bassotti, G., Villanacci, V., Antonelli, E., Morelli, A. & Salerni, B. (2007). Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Lab Invest* **87**: 628-632.
5. Beltinger, J., Hawkey, C.J. & Stack, W.A. (1999). TGF-alpha reduces bradykinin-stimulated ion transport and prostaglandin release in human colonic epithelial cells. *Am J Physiol Cell physiol* **276**: C848-C855.
6. Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**: 13-26.
7. Bhattacharyya, S., Borthakur, A., Pant, N., Dudeja, P.K. & Tobacman, J.K. (2007). Bcl10 mediates LPS-induced activation of NF-kappaB and IL-8 in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**: G429-G437.
8. Bonner, G.F. (2002). Using COX-2 inhibitors in IBD: anti-inflammatories inflame a controversy. *Am J Gastroenterol* **97**: 783-785.
9. Boschcov, P., Paiva, A.C., Paiva, T.B. & Shimuta, S.I. (1984). Further evidence for the existence of two receptor sites for bradykinin responsible for the diphasic effect in the rat isolated duodenum. *Br J Pharmacol* **83**: 591-600.
10. Brehmer, A., Schrodl, F. & Neuhuber, W. (1999).Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. *Anat Embryol* **200**: 125-135.

11. Brown, S.J. & Mayer, L. (2007). The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **102**: 2058-2069.
12. Bush, T.G. (2002). Enteric glial cells. An upstream target for induction of necrotizing enterocolitis and Crohn's disease? *Bioessays* **24**: 130-140.
13. Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H. & Sofroniew MV. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* **93**: 189-201.
14. Bär, K.J., Facer, P., Williams, N.S., Tam, P.K. & Anand, P. (1997). Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* **112**: 1381-1385.
15. Cabarrocas, J., Savidge, T.C. & Liblau, R.S. (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* **41**: 81-93.
16. Caradonna, L., Amati, L., Lella, P., Jirillo, E. & Caccavo, D. (2000). Phagocytosis, killing, lymphocyte-mediated antibacterial activity, serum autoantibodies, and plasma endotoxins in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **95**: 1495-1502.
17. Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P. & Liblau, R.S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13306-13311.
18. Cuthbert, A.W. (1999). Anion secretory effects of a non-peptide mimic of bradykinin (FR190997) on mouse colon epithelium. *Immunopharmacology* **45**: 191-198.
19. Dambacher, J., Beigel, F., Seiderer, J., Haller, D., Göke, B., Auernhammer, C.J. Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkühn, T., Göke, B., Auernhammer, C.J. & Dambacher, J. (2007). Interleukin 31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is upregulated in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**: 1257-1265.
20. Dey, I., Lejeune, M. & Chadee, K. (2006). Prostaglandin E_2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* **49**: 611-623.

21. Furness, J.B. (2006a). Conctituent neurons of the enteric nervous system. In The Enteric Nervous System, 1st ed. (Brown, A. eds.) *Blackwell Publishing professional* pp.29-79.
22. Furness, J.B. (2006b). Structure of the enteric nervous system. In The Enteric Nervous System, 1st ed. (Brown, A. eds.) *Blackwell Publishing professional* pp.1-28.
23. Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J. & Caron, M.G. (2004). Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* **27**: 107-144.
24. Goldstein, D.J., Ropchak, T.G., Keiser, H.R., Atta, G.J., Argiolas, A. & Pisano, J.J. (1983). Bradykinin reverses the effect of opiates in the gut by enhancing acetylcholine release. *J Biol Chem* **258**: 12122-12124.
25. Goyal, R.K. & Hirano, I. (1996). The enteric nervous system. *N Engl J Med* **334**: 1106-1115.
26. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450.
27. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**: 85-100.
28. Hanani, M., Francke, M., Härtig, W., Grosche, J., Reichenbach, A. & Pannicke, T. (2000). Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**: G644-G651.
29. Hara, D.B., Leite, D.F., Fernandes, E.S., Passos G.F., Guimarães, A.O., Pesquero, J.B., Campos, M.M. & Calixto, J.B. (2008). The relevance of kinin B1 receptor upregulation in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol* **154**: 1276-1286.
30. Haschke, G., Schafer, H. & Diener, M. (2002). Effect of butyrate on membrane potential, ionic currents and intracellular Ca^{2+} concentration in cultured rat myenteric neurons. *Neurogastroenterol Motil* **14**: 133-142.

31. Hernanz, R., Briones, A.M., Alonso, M.J., Vila, E. & Salaices, M. (2004). Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: H225-H234.
32. Hirst, W.D., Young, K.A., Newton, R., Allport, V.C., Marriott, D.R. & Wilkin, G.P. (1999). Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* **13**: 57-68.
33. Hoehner, J.C., Wester, T., Påhlman, S. & Olsen, L. (1996). Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* **110**: 756-767.
34. Hu, H.Z., Gao, N., Liu, S., Ren, J., Wang, X., Xia, Y. & Wood, J.D. (2004a). Action of bradykinin in the submucosal plexus of guinea pig small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **309**: 320-327.
35. Hu, H.Z., Gao, N., Liu, S., Ren, J., Xia, Y. & Wood, J.D. (2004b). Metabotropic signal transduction for bradykinin in submucosal neurons of guinea pig small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **309**: 310-319.
36. Hu, H.Z., Liu, S., Gao, N., Xia, Y., Mostafa, R., Ren, J., Zafirov, D.H. & Wood, J.D. (2003). Actions of bradykinin on electrical and synaptic behavior of neurones in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* **138**: 1221-1232.
37. Ishimoto, H., Matsuoka, I., Nakanishi, H. & Nakahata, N. (1996). A comparative study of arachidonic acid metabolism in rabbit cultured astrocytes and human astrocytoma cells (1321N1). *Gen Pharmacol* **27**: 313-317.
38. Janigro, D., Gasparini, S., D'Ambrosio, R., McKhann, G. 2nd & DiFrancesco, D. (1997). Reduction of K+ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. *J Neurosci* **17**: 2813-2824.
39. Jenkins, D.W., Sellers, L.A., Feniuk, W. & Humphrey, P.P. (2003). Characterization of bradykinin-induced prostaglandin E_2 release from cultured rat trigeminal ganglion neurones. *Eur J Pharmacol* **469**: 29-36.
40. Kachur, J.F., Allbee, W., Danho, W. & Gaginella, T.S. (1987). Bradykinin receptors: functional similarities in guinea pig gut muscle and mucosa. *Regul*

Pept **17**: 63-69.

41. Kennedy, M.B. (1989). Regulation of neuronal function by calcium. *Trends Neurosci* **12**: 417-420.
42. Kubota, Y., Nakahara, T., Mitani, A., Maruko, T., Saito, M., Sakamoto, K. & Ishii, K. (2003). Possible involvement of Ca^{2+}-independent phospholipase A_2 in protease-activated receptor-2-mediated contraction of rat urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **367**: 588-591.
43. Laye, J.P. & Gill, J.H. (2003). Phospholipase A_2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention? *Drug Discov Today* **8**: 710-716.
44. Ligumsky, M., Simon, P.L., Karmeli, F. & Rachmilewitz, D. (1990). Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease: enhanced production during active disease. *Gut* **31**: 686-689.
45. Liu, C.Y., Zhang, H. & Christfi F.L. (1998). Adenylyl cyclase co-distribution with the CaBPs, calbindin-D28 and calretinin, varies with cell type: assessment with the fluorescent dye, BIDIPY forskolin, in enteric ganglia. *Cell Tissue Res* **293**: 57-73.
46. Lomax, A.E., Fernández, E. & Sharkey, K.A. (2005). Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* **17**: 4-15.
47. MacDonald, T.T., Hutchings, P., Choy, M.Y., Murch, S. & Cooke, A. (1990). Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* **81**: 301-305.
48. Mahadevan, U., Loftus, E.V. Jr., Tremaine, W.J. & Sandborn, W.J. (2002). Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **97**: 910-914.
49. Mandelzys, A. & Cooper, E. (1992). Effects of ganglionic satellite cells and NGF on the expression of nicotinic acetylcholine currents by rat sensory neurons. *J Neurophysiol* **67**: 1213-1221.
50. Marceau, F. & Regoli, D. (2008). Therapeutic options in inflammatory bowel disease: experimental evidence of a beneficial effect of kinin B1 receptor

blockade. *Br J Pharmacol* **154**: 1163-1165.

51. Marceau, F., Hess, J.F. & Bachvarov, D.R. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* **50**: 357-386.
52. Mizutani, N., Sakurai, T., Shibata, T., Uchida, K., Fujita, J., Kawashima, R., Kawamura, Y.I., Toyama-Sorimachi. N., Imai, T. & Dohi, T. (2007). Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J Immunol* **179**: 7478-7487.
53. Murakami, M., Ohta, T. & Ito, S. (*in press*). Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1β from enteric glial cells. *J Neurosci Res*
54. Murakami, M., Ohta, T. & Ito, S. (2008). Interleukin-1beta enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through up-regulation of glial B1 receptor expression. *Neuroscience* **151**: 222-231.
55. Murakami, M., Ohta, T., Otsuguro, K.I. & Ito, S. (2007). Involvement of prostaglandin E(2) derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* **145**: 642-653.
56. Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C.M., Ho, W., Oland, L.D., Tibbles, L.A., Schemann, M., MacNaughton, W.K., Rühl, A. & Sharkey, K.A. (2006). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**: G912-G927.
57. Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A. & Savidge, T. (2008). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* **263**: 577-583.
58. Northey, A., Denis, D., Cirino, M., Metters, K.M. & Nantel, F. (2000). Cellular distribution of prostanoid EP receptors mRNA in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **62**: 145-156.
59. Ogawa, H., Rafiee, P., Heidemann, J., Fisher, P.J., Johnson, N.A., Otterson, M.F., Kalyanaraman, B., Pritchard, K.A. Jr. & Binion, D.G. (2003). Mechanisms of endotoxin tolerance in human intestinal microvascular endothelial cells. *J Immunol* **170**: 5956-5964.

60. Ohta, T., Kubota, A., Murakami, M., Otsuguro, K. & Ito, S. (2005). P_2X_2 receptors are essential for $[Ca^{2+}]_i$ increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G935-G948.
61. Peters, A., Palay, S.L. & Webster, Hb. (1991). General Morphology of the Neuron. In The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells. 3rd ed. (Peters, A. eds.)*Oxford University Press* pp. 3-13.
62. Peterson, J.W., Dickey, W.D., Saini, S.S., Gourley, W., Klimpel, G.R. & Chopra, A.K. (1996). Phospholipase A_2 activating protein and idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut* **39**: 698-704.
63. Poenie, M., Alderton, J., Steinhardt, R. & Tsien, R. (1986). Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science* **233**: 886-889.
64. Prado, G.N., Taylor, L., Zhou, X., Ricupero, D., Mierke, D.F. & Polgar, P. (2002). Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol* **193**: 275-286.
65. Regoli, D. & Barabe, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* **32**: 1-46.
66. Reinecker, H.C., Steffen, M., Witthoeft, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R.P. & Raedler, A. (1993). Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* **94**: 174-181.
67. Rescigno, M. (2008). The pathogenic role of intestinal flora in IBD and colon cancer. *Curr Drug Targets* **9**: 395-403.
68. Rodgers, H.C., Pang, L., Holland, E., Corbett, L., Range, S. & Knox, A.J. (2002). Bradykinin increases IL-8 generation in airway epithelial cells via COX-2-derived prostanoids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**: L612-L618.
69. Rodriguez, J.A., Vio, C.P., Pedraza, P.L., McGiff, J.C. & Ferreri, N.R. (2004). Bradykinin regulates cyclooxygenase-2 in rat renal thick ascending limb cells. *Hypertension* **44**: 230-235.

70. Rumio, C., Besusso, D., Arnaboldi, F., Palazzo, M., Selleri, S., Gariboldi, S., Akira, S., Uematsu, S., Bignami, P., Ceriani, V., Ménard, S. & Balsari, A. (2006). Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4. *J Cell Physiol* **208**: 47-54.
71. Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* **17**: 777-790.
72. Rühl, A., Nasser, Y. & Sharkey, K.A. (2004). Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* **16**: 44-49.
73. Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**: 390-407.
74. Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Rühl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R. & Sofroniew, M.V. (2007a). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**: 1344-1358.
75. Savidge, T.C., Sofroniew, M.V. & Neunlist, M. (2007b). Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest* **87**: 731-736.
76. Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J., Hämling, J., Koop, I., Groessner, B., Lochs, H. & Raedler, A. (1999). Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* **353**: 459-461.
77. Souza, D.G., Lomez, E.S., Pinho, V., Pesquero, J.B., Bader, M., Pesquero, J.L. & Teixeira, M.M. (2004). Role of bradykinin B(2) and B(1) receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* **172**: 2542-2548.
78. Stadnicki, A., DeLa Cadena, R.A., Sartor, R.B., Bender, D., Kettner, C.A., Rath, H.C., Adam, A. & Colman, R.W. (1996). Selective plasma kallikrein inhibitor attenuates acute intestinal inflammation in Lewis rat. *Dig Dis Sci* **41**: 912-920.
79. Stadnicki, A., Gonciarz, M., Niewiarowski, T.J., Hartleb, J., Rudnicki, M., Merrell, N.B., DeLa Cadena, R.A. & Colman, R.W. (1997). Activation of plasma contact and coagulation systems and neutrophils in the active phase of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* **42**: 2356-2366.
80. Stadnicki, A., Mazurek, U., Plewka, D. & Wilczok, T. (2003). Intestinal tissue kallikrein-kallistatin profile in inflammatory bowel disease. *Int*

Immunopharmacol **3**: 939-944.

81. Stadnicki, A., Pastucha, E., Nowaczyk, G., Mazurek, U., Plewka, D., Machnik, G., Wilczok, T. & Colman, R.W. (2005). Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G361-G366.
82. Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **117**: 514-521.
83. Sugimoto, Y. & Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* **282**: 11613-11617.
84. Tilg, H., Moschen, A.R., Kaser, A., Pines, A. & Dotan, I. (2008). Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut* **57**: 684-694.
85. Vasina, V., Barbara, G., Talamonti, L., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Tonini, M., De Ponti, F. & De Giorgio, R. (2006). Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* **126-127**: 264-272.
86. Villanacci, V., Bassotti, G., Nascimbeni, R., Antonelli, E., Cadei, M., Fisogni, S., Salerni, B. & Geboes, K. (2008). Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* **20**: 1009-1016.
87. Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* **36**: 291-300.
88. Wood, J.D. (2007). Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* **13**: 1313-1332.
89. Wu, H., Friedman, W.J. & Dreyfus, C.F. (2004). Differential regulation of neurotrophin expression in basal forebrain astrocytes by neuronal signals. *J Neurosci Res* **76**: 76-85.
90. Wu, Z.Z., Chen, S.R. & Pan, H.L. (2006). Signaling mechanisms of down-regulation of voltage-activated Ca^{2+} channels by transient receptor potential vanilloid type 1 stimulation with olvanil in primary sensory neurons. *Neuroscience* **141**: 407-419.
91. Yau, W.M., Dorsett, J.A. & Youther, M.L. (1986). Bradykinin releases acetylcholine from myenteric plexus by a prostaglandin-mediated mechanism. *Peptides* **7**: 289-292.

92. Young, H.M., Bergner, A.J. & Müller, T. (2003). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* **456**: 1-11.
93. Zeitlin, I.J. & Smith, A.N. (1973). Mobilization of tissue kallikrein in inflammatory disease of the colon. *Gut* **14**: 133-138.

94. Zhang, G. & Ghosh, S. (2000). Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **6**: 453-457.
95. Zhang, Y., Adner, M. & Cardell, L.O. (2007). IL-1beta-induced transcriptional up-regulation of bradykinin B1 and B2 receptors in murine airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**: 697-705.
96. von Boyen, G.B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.H., Adler, G. & Kirsch, J. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* **53**: 222-228.
97. von Boyen, G.B., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schäfer, K.H., Adler, G. & Kirsch, J. (2006). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 346-354.

英文抄録

Involvement of enteric glial cells in functional changes of enteric neurons in inflammatory bowel disease: Study using *in vitro* model system

Matsuka Murakami

Laboratory of Pharmacology, Department of Biomedical Sciences,

Graduated School of Veterinary Medicine, Hokkaido University,

Sapporo 060-0818, Japan

To identify the action of BK in the enteric nervous system (ENS), the effects of bradykinin (BK) on the enteric neuron and glial cells were examined by focusing on the interaction between them, using primary culture of myenteric plexus cells from the rat intestine. Furthermore, the impacts of lipopolysaccharide (LPS) or inflammatory cytokines, elevated in serum of inflammatory bowel disease (IBD) patients, on the interaction were investigated.

1. The immunocytochemical analysis using anti-protein gene product (PGP9.5) and anti-S100 antibodies showed that cells in primary culture of myenteric plexus were composed of neurons (30%) and enteric glial cells (68%). The processes of these neurons connected with other neurons and formed neural networks.
2. In both primary cultured myenteric plexus and whole mount preparation of myenteric plexus, less than 10% of neurons showed an immunoreactive (IR)

positive to calbindin, a marker of intrinsic primary afferent neuron. BK increased $[Ca^{2+}]_i$ to the same extent in both calbindin IR-positive or -negative neurons.

3. BK evoked $[Ca^{2+}]_i$ rise in neurons in a dose-dependent manner. The number of neurons responded to BK were increased by increasing concentrations of BK.
4. Both B1 and B2 receptor mRNAs were detected in cultured myenteric plexus cells. The neural $[Ca^{2+}]_i$ increase by BK was abolished by a B2 receptor antagonist HOE140, but not affected by a B1 receptor antagonist Lys-des-Ag^9-HOE140. A B1 receptor agonist des-Arg^9-BK failed to cause a $[Ca^{2+}]_i$ response.
5. Double immunostaining using antibodies against B2 receptors together with PGP9.5 or S100 indicated that B2 receptors were expressed in both enteric neurons and glial cells.
6. The neural $[Ca^{2+}]_i$ response to BK was attenuated by removal of external Ca^{2+} or by Cd^{2+}, a blocking agent of voltage dependent Ca^{2+} channels. In the neurons depleted of Ca^{2+} from internal stores by thapsigargin, $[Ca^{2+}]$ response to BK became smaller.
7. Indomethacin, a non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, significantly suppressed the neural $[Ca^{2+}]_i$ response to BK. Pretreatment with prostaglandin E_2 (PGE_2), but not PGI_2, significantly potentiated the $[Ca^{2+}]_i$ response to BK. Neither PGE_2 nor PGI_2 affected the resting $[Ca^{2+}]_i$ level. An EP_1 receptor antagonist SC19220 suppressed the neural response to BK. Unlike PGE_2, an EP_3 receptor agonist sulprostone did not potentiate the neural response to BK.
8. The release of PGE_2 from cultured myenteric plexus cells was increased by BK

in a dose-dependent manner, which was inhibited by indomethacin.

9. The $[Ca^{2+}]_i$ response to BK in neurons cultured at the high density was significantly larger than that at the low density. The response to BK in neurons was greatly diminished by reducing the number of enteric glial cells in culture. Indomethacin inhibited the response to BK in neurons cultured at the high density, but not the low density. Under the culture conditions of lowering the number of enteric glial cells, indomethacin failed to inhibit the neural response to BK.
10. In cultured myenteric neurons, BK evoked a slow and sustained depolarization and action potential discharges superimposed on it in some neurons. BK-induced depolarization and action potentials were suppressed by indomethacin. The current intensity required for evoking action potentials was decreased by BK, without changing membrane potential threshold of evoking action potentials.
11. BK evoked dose-dependent increases of $[Ca^{2+}]_i$ in enteric glial cells, which were hardly diminished by the removal of external Ca^{2+}. In glial cells depleted Ca^{2+} from internal stores by thapsigargin, BK failed to evoke $[Ca^{2+}]_i$ increase. BK-induced glial $[Ca^{2+}]_i$ increase was abolished by a phospholipase C inhibitor U73122.
12. $[Ca^{2+}]_i$ responses to BK in enteric neurons and glial cells were potentiated by treatment with LPS or IL-1β, but not with TNF-α. Similar potentiation was induced by LPS or IL-1β in the pure culture of glial cells. These augmenting effects of LPS on responses to BK were suppressed by pretreatment with an interleukin-1 receptor antagonist IL-1ra.

13. In cultured myenteric plexus cells, the augmenting effects of LPS and IL-1β on neural $[Ca^{2+}]i$ responses to BK were suppressed by reducing the number of enteric glial cells in culture.
14. LPS increased IL-1β secretion either from cultured myenteric plexus cells containing neurons and glial cells or from pure culture of glial cells.
15. IL-1β augmented BK-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases in both enteric neurons and glial cells in exposure time-dependent manner. In untreated neurons and glial cells, BK-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was not affected by a B1 receptor antagonist des-Arg^9-HOE140, but abolished by a B2 receptor antagonist HOE140. After cultured with IL-1β, the augmented $[Ca^{2+}]_i$ response to BK in both cell types were partly inhibited by the B1 receptor antagonist. The B2 receptor antagonist completely abolished the responses to BK in neurons but not in enteric glial cells.
16. In glial cells cultured without IL-1β, two different B1 receptor agonists, Lys-des-Arg^9-BK and BK fragment 1-8, evoked tiny changes in $[Ca^{2+}]_i$. After culture with IL-1β, substantial $[Ca^{2+}]_i$ increase occurred with both B1 receptor agonists in enteric glial cells but not neurons.
17. IL-1β potentiated the expression level of mRNA of B1 receptor but not B2 receptor in cultured myenteric plexus cells. The signal intensity of B1 receptor IR increased in enteric glial cells immunoreactive to S100.
18. The EP_1 receptor antagonist SC19220 suppressed the IL-1β-enhancing neural response to BK. The amount of PGE_2 release by BK from myenteric plexus cells was increased by IL-1β. The B1 receptor agonist produced a significant release of PGE_2 from IL-1β-treated myenteric plexus cells but not from untreated cells.

19. Under the conditions of depletion of Ca^{2+} from internal stores by thapsigargin and the removal of external Ca^{2+}, BK failed to evoke PGE_2 release from cultured myenteric plexus cells. A23187, a Ca^{2+} ionophore, significantly increased PGE_2 release, which was suppressed by a non-selective phospholipase A_2 inhibitor aristolochic acid.
20. After cultured with IL-1β, either aristolichic acid or indomethacin suppressed the neural $[Ca^{2+}]_i$ response to BK and BK-induced PGE_2 release from myenteric plexus cells. A selective COX-2 inhibitor, nimesulide, significantly, but not completely, abolished the augmented $[Ca^{2+}]_i$ responses to BK. This drug inhibited partly the BK-induced PGE_2 release from myenteric plexus cells cultured with IL-1β but not without IL-1β.
21. IL-1β increased the intensity of COX-2 IR in all positive to S100 IR-positive, but not PGP9.5 IR-positive cells.

These results shows that BK causes a $[Ca^{2+}]_i$ increase and depolarization in rat myenteric neurons through the activation of B2 receptors, which was partly associated with PGE_2 released from glial cells in response to BK. Furthermore, these results also indicate that LPS up-regulates B1 receptors and COX-2 in enteric glial cells via secretion of IL-1β in an autocrine fashion. The enhancement of PGE_2 production results in the alteration of cross-talk of the neuron-glial interaction. Such functional changes of enteric glial cells may cause dysfunction in the gut of IBD patients.