

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08926

研究課題名(和文) 母子分離ストレスモデルでの腸管グリア細胞応答と消化管機能変調の分子生物学的解析

研究課題名(英文) Responses of enteric glial cells and biological molecules of the digestive tracts under the dysfunctional condition in maternally separated rats

研究代表者

富永 和作 (Kazunari, Tominaga)

大阪医科大学・医学部・特別任命教員教授

研究者番号：80336768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸管グリア細胞は、幼少期の母子分離ストレスにより、その突起形態が変化し、成獣期における水浸拘束ストレスの多重付加強度に応じてさらに顕著となり、大腸運動機能は亢進に転じ胃運動機能は低下することが明らかとなった。組織学的な神経ネットワークは、EGCネットワークに並走して発達し、粘膜層あるいは粘膜下層での神経ガイダンス分子の発現に關与する可能性が示唆された。培養腸管グリア細胞へのコルチコステロンやトリプターゼ刺激は、細胞内活性化や神経ガイダンス分子の発現増加を惹起させ、グリア細胞の変化に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Processes of enteric glial cell (EGC) were morphologically changed by maternal separation stress during the childhood period, which were dynamically enhanced by additional water immersion stress in the adulthood. Colonic motility was hypercontracted but gastric emptying was delayed by these phenomena. Neuronal network was histologically developed along with the glial network. These spread of network was possibly associate with expressions of neuronal guidance molecules in the submucosal and mucosal layers. Cellular activation and increased expressions of neuronal guidance molecules was induced by stimulations of corticosterone and trypsinase in established enteric glial cell (CRL-2690). All these findings indicated the role of EGC in regulation of physiology of the digestive tracts such as colon and stomach especially under the stress conditions.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸管神経系 グリア細胞 ストレス 消化管運動

1. 研究開始当初の背景

われわれは消化管機能を制御する細胞として、腸管神経系(enteric nervous system: ENS)の構成要素である腸管グリア細胞(enteric glial cell: EGC)に注目してきた。先行研究において、幼少期の母子分離ストレスモデルにより、大腸筋層間神経叢に存在する EGC の突起形態が、filamentous から leaf-like へと変化すること、これら変化は成獣期における水浸拘束ストレスなどの、ストレス多重付加の強度に応じてさらに増強されること、またその変化した突起は神経細胞体に向かう伸長反応として顕著に現れ、大腸運動機能の亢進に関与することを明らかにしてきた。一方、抑うつ・不安を併存した機能性消化管疾患のひとつである機能性ディスペプシア患者の十二指腸組織における炎症ならびに EGC や glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の発現等の解析が並行して進められ、基礎・臨床両面からのアプローチを試みてきた。しかし、EGC の形態変化に関わる機序やストレス関連因子での影響については、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

幼少期母子分離ラットの成獣期における急性ストレス追加負荷による EGC の突起形態変化を、ストレス負荷直後から成熟過程の中で追跡し、さらには急性期ストレス解除に伴う EGC の突起形態変化の可逆性について検討するとともに、消化管運動機能における EGC の持つ役割について、神経生理学的観点から解明することを初期段階での目的とする。

一方で、突起伸展や上記の形態変化をもたらす機序として、EGC 内部での細胞骨格フィラメントや増殖因子により誘導される small G protein が関与する可能性が想定される。樹立化 EGC を用いて、その定量的評価を分子生物学的手法にて行い、また内部蓄積に対する

形態変化については、病理組織学的に解析を行うことを次期の目的とする。

3. 研究の方法

幼少期の慢性ストレスが与える影響として、Wistar 系雄性ラットを用い、生後 2~14 日目まで母子分離ストレスを与える。母子分離が終了し、離乳直後(4 週齢)、成熟期(8 週齢)、高齢期(48 週齢)の胃・大腸を摘出し、mRNA ならびに蛋白抽出に供する。さらに、筋層間ならびに粘膜下神経叢の whole mount 標本作製し、EGC マーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)と神経マーカーである HuC/D あるいは PGP9.5 による蛍光二重染色を行い、EGC の突起形態変化、特に予備検討で認められた leaf-like 突起を、画像解析ソフト(Image J)を用いて定量的評価を行う。ストレス負荷による大腸収縮運動への影響に関しては、上記で使用した部位と同じ遠位大腸を各群から約 1.5cm 摘出し、電気生理学的収縮反応として、神経電気刺激(electrical field stimulation: EFS)による大腸収縮反応を測定する。電気刺激による収縮反応が、EGC を介した反応であることを検討する目的で、EGC の選択的代謝阻害剤である gliotoxin (fluorocitrate)を用いて評価する。グリア細胞における突起伸展過程に、神経細胞の軸索誘導(axon guidance)に関与する tyrosine kinase growth factor である netrin, semaphorin などの small G protein が関与しているか否かについて、樹立化 EGC (CRL-2690)を使用し、corticosterone や CRF などのストレス関連ホルモンや NGF などの神経栄養因子を添加し刺激することによって、これら small G protein 発現や各々の受容体の発現も検討し、培養 EGC の形態変化についても同時評価する。

4. 研究成果

・幼少期慢性ストレスとして母子分離ストレス(生後 2-14 日, 3 時間/日)を行い、母子分離

負荷終了後4週(離乳直後)・8週(成熟期)・48週(高齢)において、EGCは、神経細胞体に向かって突起を伸展させ、細胞体を被覆伸展する程の形態的变化を示した。さらに突起先端の形態は、ストレス負荷により糸状(filament-like)から膨化した木の葉様(leaf-like)へと変化することも判明した。しかし、EGCそのものの増殖反応は軽微なものであり、一神経節あたりに存在する腸管神経細胞体数や組成の割合にも差は認めなかった。神経ネットワークのコネクションに関しては、EGCネットワークに並走した形で表現され、粘膜層あるいは粘膜下層での神経ガイダンス分子の発現増強が関与する可能性が示唆された。

・摘出した大腸腸管に対して行ったEFSにおいて、母子分離ストレス負荷群では、低刺激の状態から収縮振幅の増大を認め、刺激強度に応じて収縮増大反応が認められた。これらの増大反応は、グリア細胞の選択的代謝阻害剤である fluorocitrate の刺激前投与により抑制されることも判明した。胃内にフェノールレッドを投与して測定する胃排出能については、母子分離ストレス負荷群において有意に遅延していることも判明した。

・局所での直接的に評価することを目的にして、EGC(CRL-2690)をコルチコステロンやトリプターゼで刺激したところ、EGCは細胞内での活性化が認められ、コルチコステロン刺激において、GFAP/S100 β や nerve growth factor (NGF)の mRNA 発現は、約1.5倍に増加した。しかし、GDNF mRNA 発現は半減した。コルチコステロン(1 μ M)での6時間刺激では、EGCの突起伸長や、伸長突起の近隣EGCとのコネクションを示唆する画像所見を得ることができた。トリプターゼ刺激により、GFAP (1.7-fold)、GDNF (3.7-fold)の mRNA 発現は、1時間をピークに認め漸減した。NGF や netrin1 の mRNA 発現は、1時間後に増加し6時間後まで2.5倍の増加を認めた。一方、

IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインには影響しなかった。

以上の結果より、大腸などの腸管臓器において、支持組織と想定されてきたEGCは、ストレス刺激あるいは関連刺激に呼応して、形態・機能変化を来とし、消化管生理での役割を担うのみならず、神経伸長や神経ガイダンス分子の発現などと呼応して、病的環境における生理的な枠割に一義的に重要とされ、ひいては治療標的の一つとなりうる可能性があることを示唆する研究成果を得ることが出来たものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Yoshiko Fujikawa, Kazunari Tominaga, Fumio Tanaka, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa. Enteric glial cells are associated with stress-induced colonic hyper-contraction in maternally separated rats. *Neurogastroenterology motility*, 2015, 27; 1010-1023
2. Kazunari Tominaga, Yoshiko Fujikawa, Fumio Tanaka, Noriko Kamata, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa. Structural changes in gastric glial cells and delayed gastric emptying as responses to early life stress and acute adulthood stress in rats. *Lif Sci*, 2016; 148: 254-259.

〔学会発表〕(計2件)

1. Yoshiko Fujikawa, Kazunari Tominaga, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Kazuhide Higuchi. Possibility of communication between Enteric glia and Mast cell via tryptase-PAR2 receptor under the pathogenesis of IBS. ANMA & JSNM Joint Meeting 2017 (国際学会), 2017年03月24
Osaka International Convention Center
2. 藤川佳子, 富永和作, 谷川徹也, 渡辺俊雄, 藤原靖弘, 荒川哲男. コルチコステロン刺激

による腸管グリア細胞への影響. 合同学術集
会2015. 沖縄科学技術大学院大学2015年11月
12日

〔図書〕(計1件)

1. Kazunari Tominaga & Hiroaki Kusunoki,
editors. Functional Dyspepsia-Evidences in
Pathophysiology and Treatment. Springer,
2018, in press

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富永 和作 (TOMINAGA KAZUNARI)
大阪医科大学・医学部・特別任命教員教授
研究者番号：80336768

(2)研究分担者

荒川 哲男 (ARAKAWA TETSUO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60145779

藤原 靖弘 (FUJIWARA YASUHIRO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40285292

渡辺 俊雄 (WATANABE TOSHIO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50336773

谷川 徹也 (TANIGAWA TETSUYA)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70423879

藤川 佳子 (FUJIKAWA YOSHIKO)
大阪医科大学・医学部・特別任命教員助教
研究者番号：60711661