

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08122

研究課題名(和文)食道横紋筋運動を制御する中枢性および末梢性機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of esophageal striated muscle motility by the central and peripheral systems

研究代表者

椎名 貴彦 (Shiina, Takahiko)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：90362178

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)：本研究は、ほ乳類の食道横紋筋運動における中枢および末梢における制御機構を解明することを目的として行った。食道横紋筋運動の制御に関与する中枢レベルの新規因子を明らかにするため、麻酔下ラットの食道内腔にバルーンを設置し、バルーンの移動速度等を指標にして、in vivoで食道蠕動運動を評価した。実験系を確立するとともに、中枢性制御に一酸化窒素が関与することを明らかにした。一方、摘出食道標本を用いた実験系で、プリン作動系シグナルとカリウムチャンネルを介するシグナルが食道運動を局所的に調節する可能性を見出した。これらの成果は、食道運動の中枢および末梢性制御機構の全貌を解明する上で重要な知見といえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほ乳類の食道筋層は、小腸や大腸と異なり、一部または全長にわたって横紋筋で構成されている。一方、食道は摂取した食物を胃まで運搬する役割を持つことから、食道横紋筋も小腸や大腸の平滑筋と同様に蠕動運動を担っている。蠕動運動は、筋の収縮のみならず、適切な弛緩も必要とすることから、食道横紋筋が「収縮」とともに「弛緩(収縮の抑制)」する制御機構の解明は重要である。食道以外の消化管(胃、小腸、大腸)では、中枢性制御に加えて、内在神経系などによる末梢性(局所)制御が発達している。本研究の意義は、食道横紋筋運動の中枢性および末梢性制御機構の一旦を明らかにしたことにある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify central and peripheral regulation on esophageal striated muscle motility in mammals. I characterized peristaltic motility using a novel in vivo method in rats. A balloon-tipped catheter was placed in the esophagus of a rat anesthetized with urethane to induce esophageal peristalsis. A nitric oxide synthase inhibitor abolished the induction of esophageal peristalsis, which suggests that nitric oxide plays essential roles in the induction of esophageal peristalsis. On the other hand, an isolated segment of the rat esophagus was placed in an organ bath and mechanical responses were recorded. Pharmacological and morphological studies indicated that purinergic receptors and potassium channels contribute to motor regulation of esophageal muscle motility peripherally. These findings provide novel insights into the regulatory mechanisms of esophageal striated muscle motility.

研究分野：獣医学

キーワード：食道 横紋筋 平滑筋 一酸化窒素 カリウムチャンネル プリン受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の食道筋層は、口に近い部分が横紋筋で胃に近い部分が平滑筋で構成されているか、もしくは全長に渡って横紋筋で構成されている。これは、小腸や大腸といった他の消化管の筋層が平滑筋で構成されているのとは異なった、食道に独特の特徴である。食道横紋筋の機能を解明することで、食道梗塞や巨大食道症といった食道特有の運動疾患の解決に向けて有効な情報を得られると考えられる。

食道横紋筋は「骨格筋」とみなされている。実際、運動制御に関わる因子は骨格筋と共通である。骨格筋が脊髄由来の運動神経によって支配されているように、食道横紋筋は延髄に由来する迷走運動神経によって支配されている。食道横紋筋はニコチン受容体を介してアセチルコリンによって収縮する点も骨格筋と共通している。一方、食道は摂取した食物を胃まで運搬する役割を持つことから、食道横紋筋も小腸や大腸の平滑筋と同様に蠕動運動を担っている。蠕動運動は、筋の収縮のみならず、適切な弛緩も必要とすることから、中枢由来の運動神経による収縮だけでは食道横紋筋の運動制御を十分には説明できない。そのため、食道横紋筋の制御を真に理解するためには、「収縮」とともに「弛緩(収縮の抑制)」する制御機構の解明は重要であり、既知の機構以外についてさらに探索する必要がある。

食道以外の消化管(胃、小腸、大腸)では、中枢性制御に加えて、内在神経系やカハール介在細胞などによる末梢性(局所)制御が発達している。これにより、消化管内腔の状況に応じて、細かな調節が可能となっている。ところが、食道横紋筋では内在神経やカハール介在細胞の他、肥満細胞やグリア細胞といった間質細胞の局在とその生理機能の可能性は指摘されているものの、その詳細な解明は未だ行われていない。そのため、食道横紋筋運動を調節する未知の末梢性制御を解明することにも十分な意義があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、食道横紋筋運動における中枢および末梢における制御機構の全貌を解明することを目的とした。

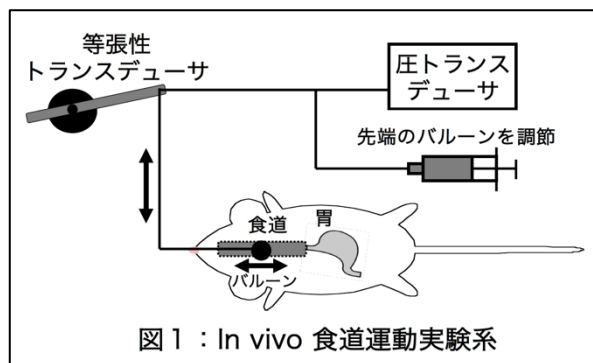
3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には、食道筋層が全て横紋筋で構成されているラット(Sprague-Dawley系雄、8~12週齢)を用いた。飼育室の温度は $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ に調節し、明暗周期12時間:12時間(明期7:00~19:00)の環境で飼育した。飼育期間中は水道水と固形飼料を自由に摂取させた。本研究における動物実験はすべて、岐阜大学動物実験委員会にて審査を受けた後に許可されたものであり、岐阜大学動物実験取扱規程に従って実施した(実験承認番号:17011、17013、17164、17169、H30-178、H30-183)。

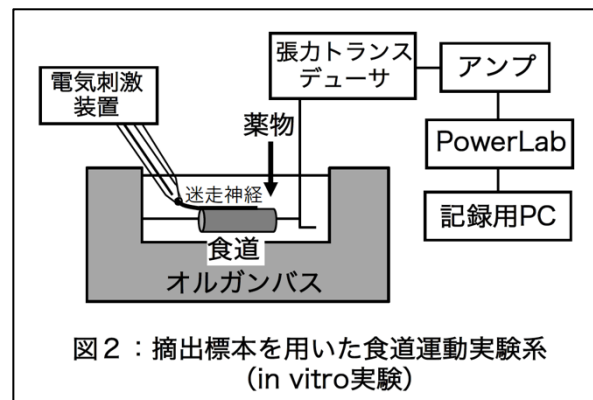
(2) In vivo 実験系による食道横紋筋運動の評価

食道運動の中枢性制御機構を解明するため、中枢を含む丸ごと動物を用いた in vivo 実験系を用いた実験を行った(図1)。ウレタンで麻酔したラットの食道内腔にバルーンを設置し、バルーンの移動速度や移動距離、バルーン内圧の変化を指標にして、in vivo で食道蠕動運動を評価した(図1)。



(3) 摘出食道標本を用いた in vitro 実験系

末梢での制御の解明のため、摘出食道標本による in vitro 試験を実施した。ラットから食道を摘出して、オルガンバスにセットし、in vitro で食道運動を記録した(図2)。迷走神経あるいは横紋筋そのものを電気刺激することによって生じる食道横紋筋の収縮反応を解析した。



(4) 食道横紋筋運動の制御に関与する因子の分子レベルの解析

RT-PCRによって遺伝子レベルでの発現を解析した。また、組織分布を調べるために、免疫組織化学を行った。

4. 研究成果

(1) 食道横紋筋運動の制御に関与する中枢レベルの因子の解明

ウレタンで麻酔したラットの食道内腔にバルーンを設置し、バルーンを膨張させて食道壁に伸展刺激を加えたところ、食道蠕動運動が起こり、バルーンが口腔側から胃側に向かって移送された(図3A)。バルーンの移動速度や移動距離、バルーン内圧の変化を指標にして、食道蠕動運動を評価した。

迷走神経を切除したところ、食道蠕動運動が停止した(図3C)。評価している食道蠕動運動が迷走神経を介した反射であることを確認した。

一酸化窒素(NO)は重要なガス状伝達物質のひとつである。そこで、NO合成酵素の阻害薬をラットに静脈内投与したところ、食道蠕動運動が抑制された(図4)。この結果は、食道横紋筋による蠕動運動の中枢性制御に一酸化窒素が関与することを示唆している。

また、食道横紋筋運動の制御に関与する中枢レベルの新規因子の解明のため、新たなin vivo実験系を確立した。この実験系は、ウレタンで麻酔したラットの食道内腔に液体を満たし、食道運動を制御する迷走神経を電気刺激するというものである。この実験系の確立により、中枢性制御と末梢性制御の相互作用の解析が可能となった。

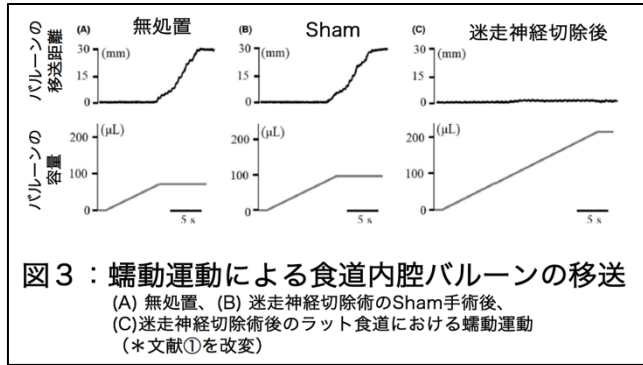


図3：蠕動運動による食道内腔バルーンの移送
(A) 無処置、(B) 迷走神経切除術のSham手術後、
(C) 迷走神経切除術後のラット食道における蠕動運動
(*文献①を改変)

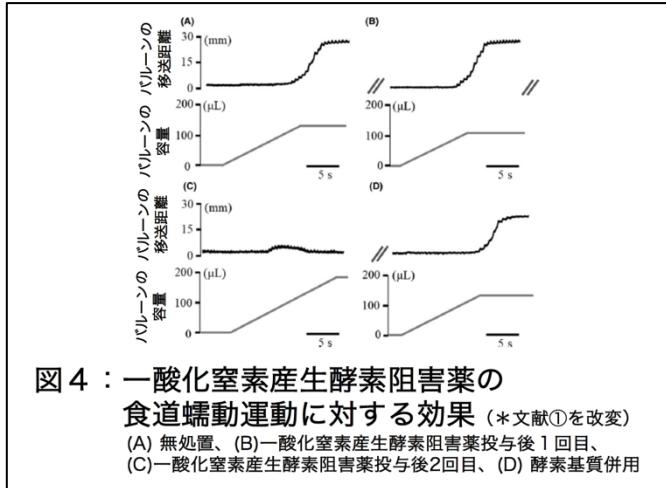


図4：一酸化窒素産生酵素阻害薬の食道蠕動運動に対する効果 (*文献①を改変)
(A) 無処置、(B) 一酸化窒素産生酵素阻害薬投与後1回目、
(C) 一酸化窒素産生酵素阻害薬投与後2回目、(D) 酵素基質併用

(2) 食道横紋筋運動の制御に関与する末梢レベルの因子の解明

ラットから食道を摘出して、in vitroで食道運動を記録し、食道筋の収縮反応を解析した。これまで未知であったプリン作動系シグナルとカリウムチャンネルを介するシグナルが食道運動に関与する可能性を示唆する結果が得られた。

① プリン作動系シグナルによる食道運動の調節機構

食道横紋筋運動の制御にプリン作動系シグナルが関与するかどうかについて検討した。RT-PCRによって、食道組織には様々なサブタイプのP2X受容体あるいはP2Y受容体が発現していることが明らかとなった。プリン作動系シグナルの主要な伝達物質であるATPを食道標本に投与したところ、食道筋層の横紋筋の反応には影響しなかったものの、粘膜筋板平滑筋は弛緩した。この食道平滑筋の弛緩反応に関与する受容体と制御機構のより詳細な解析を行った。その結果、P2Y受容体の関与が示唆された。さらに、P2Y受容体を介してカリウムチャンネルが開くことで弛緩反応が引き起こされることが明らかとなった。

② 食道横紋筋運動の制御に関わるカリウムチャンネル

食道横紋筋運動の制御にカリウムチャンネルが関与するかどうかについて検討した。カリウムチャンネルには様々な種類が存在するが、そのうちATP感受性カリウムチャンネルに着目して実験を行なった。摘出食道標本の迷走神経を電気刺激したところ、食道横紋筋が収縮反応を起こした(図5)。ATP感受性カリウムチャンネルの開口薬を投与すると、収縮反応は増強した(図6)。また、ATP感受性カリウムチャンネルの開口薬の適用によって、収縮反応は阻害された(図7)。さらに、ATP感受性カリウムチャンネルの組織分布を解明するために免疫染色を行なったところ、食道筋層の横紋筋に発現していることが明らかとなった(図8)。RT-PCRにより、ATP感受性カリウムチャンネルを構成するサ

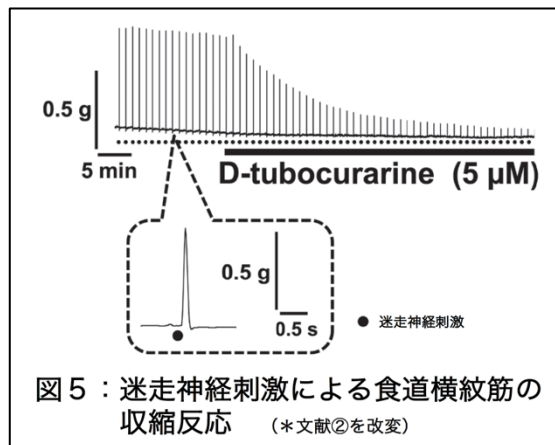
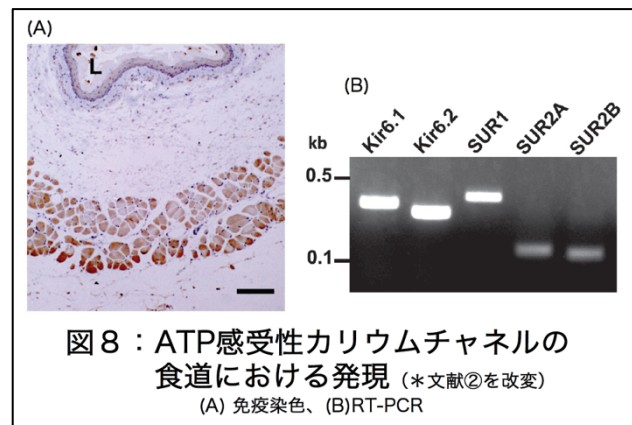
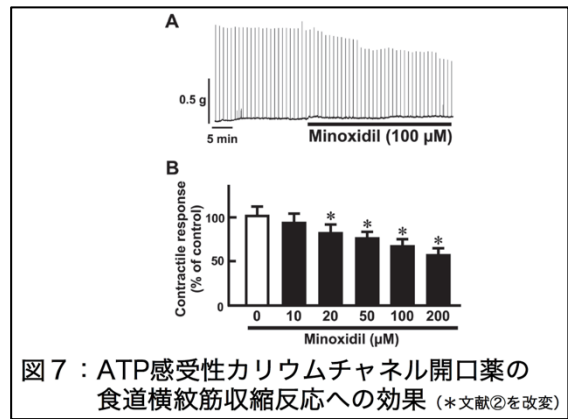
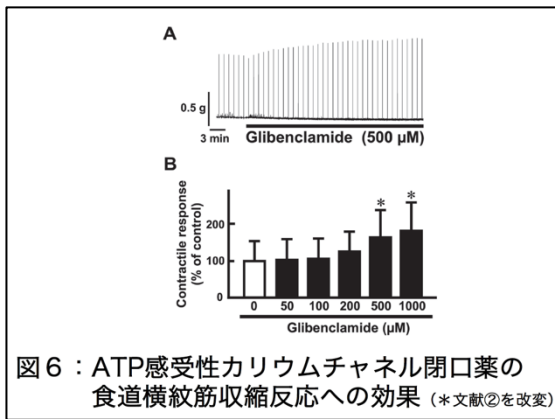


図5：迷走神経刺激による食道横紋筋の収縮反応 (*文献②を改変)

ブユニットが発現していることを明らかにした(図8)。以上の結果より、食道横紋筋運動には、ATP感受性カリウムチャンネルを介した局所的な制御機構が存在することが明らかとなった。



これらの成果は、食道運動の中核および末梢性制御機構の全貌を解明する上で重要な知見といえる。

<引用文献>

- ① Horii K, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Horii Y, Shimaoka H, Shimizu Y.: Characterization of peristaltic motility in the striated muscle portion of the esophagus using a novel in vivo method in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 31(4):e13518, 2019.
- ② Horii K, Suzuki Y, Shiina T, Saito S, Onouchi S, Horii Y, Shimaoka H, Shimizu Y.: ATP-dependent potassium channels contribute to motor regulation of esophageal striated muscle in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 81(9):1266-1272, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sawada Rika, Nakamori Hiroyuki, Naitou Kiyotada, Horii Kazuhiro, Horii Yuuki, Shimaoka Hiroki, Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 6
2. 論文標題 Local regulatory mechanism to coordinate colorectal motility in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13710 ~ e13710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naitou Kiyotada, Nakamori Hiroyuki, Horii Kazuhiro, Kato Kurumi, Horii Yuuki, Shimaoka Hiroki, Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 315
2. 論文標題 Descending monoaminergic pathways projecting to the spinal defecation center enhance colorectal motility in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G631 ~ G637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00178.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horii Kazuhiro, Shiina Takahiko, Naitou Kiyotada, Nakamori Hiroyuki, Horii Yuuki, Shimaoka Hiroki, Shimizu Yasutake	4. 巻 31
2. 論文標題 Characterization of peristaltic motility in the striated muscle portion of the esophagus using a novel in vivo method in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology & Motility	6. 最初と最後の頁 e13518 ~ e13518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nmo.13518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamori H., Naitou K., Sano Y., Shimaoka H., Shiina T., Shimizu Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Exogenous serotonin regulates colorectal motility via the 5-HT2 and 5-HT3 receptors in the spinal cord of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology & Motility	6. 最初と最後の頁 e13183 ~ e13183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nmo.13183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamori Hiroyuki, Naitou Kiyotada, Horii Yuuki, Shimaoka Hiroki, Horii Kazuhiro, Sakai Hiroki, Yamada Akihiro, Furue Hidemasa, Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 314
2. 論文標題 Medullary raphe nuclei activate the lumbosacral defecation center through the descending serotonergic pathway to regulate colorectal motility in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G341 ~ G348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00317.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naganuma S., Shiina T., Yasuda S., Suzuki Y., Shimizu Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Histamine-enhanced contractile responses of gastric smooth muscle via interstitial cells of Cajal in the Syrian hamster	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology & Motility	6. 最初と最後の頁 e13255 ~ e13255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nmo.13255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naitou Kiyotada, Shiina Takahiko, Nakamori Hiroyuki, Sano Yuuki, Shimaoka Hiroki, Shimizu Yasutake	4. 巻 68
2. 論文標題 Colokinetic effect of somatostatin in the spinal defecation center in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 243 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-017-0524-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 椎名貴彦、堀井和広、志水泰武	4. 巻 26
2. 論文標題 食道横紋筋の運動制御 内在神経による新たな局所調節機構の提唱	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本病態生理学会雑誌	6. 最初と最後の頁 65-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 HORII Kazuhiro, SUZUKI Yuji, SHIINA Takahiko, SAITO Shouichiro, ONOUCHI Sawa, HORII Yuuki, SHIMAOKA Hiroki, SHIMIZU Yasutake	4. 巻 81
2. 論文標題 ATP-dependent potassium channels contribute to motor regulation of esophageal striated muscle in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1266 ~ 1272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamori Hiroyuki, Naitou Kiyotada, Horii Yuuki, Shimaoka Hiroki, Horii Kazuhiro, Sakai Hiroki, Yamada Akihiro, Furue Hidemasa, Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 317
2. 論文標題 Roles of the noradrenergic nucleus locus coeruleus and dopaminergic nucleus A11 region as supraspinal defecation centers in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G545 ~ G555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00062.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 椎名貴彦、長沼悟、安田昇平、志水泰武
2. 発表標題 カハールの間質細胞を介したヒスタミンによるハムスター胃運動の亢進反応
3. 学会等名 第28回日本病態生理学会大会 (横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 椎名貴彦、堀井和広、矢部富雄、志水泰武
2. 発表標題 肥満細胞によるスunks食道平滑筋運動の調節機構
3. 学会等名 第60回日本平滑筋学会総会 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiko Shiina, Kazuhiro Horii, Satoru Naganuma, Shohei Yasuda, Yasutake Shimizu
2. 発表標題 Regulation of gastric motility by histamine via interstitial cells of Cajal in the Syrian hamster
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS 2019) (Kobe) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎名 貴彦、嶋 剛士、大橋 錬、内藤 清惟、中森 裕之、堀井 有希、島岡 弘樹、志水 泰武
2. 発表標題 カプサイシン感受性局所神経回路によるラット食道横紋筋運動の調節。
3. 学会等名 第27回日本病態生理学会大会（東京）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀井 和広、中森 裕之、内藤 清惟、椎名 貴彦、志水 泰武
2. 発表標題 ラット食道横紋筋の運動制御に対するカリウムチャネルの関与
3. 学会等名 第27回日本病態生理学会大会（東京）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 椎名 貴彦
2. 発表標題 食道"骨格筋"の機能的特徴 ~「ちぢむ(収縮)」仕組みと「ゆるむ(弛緩)」仕組み~
3. 学会等名 第59回日本平滑筋学会総会（福岡）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 椎名 貴彦、嶋 剛士、大橋 錬、内藤 清惟、中森 裕之、堀井 有希、島岡 弘樹、志水 泰武
2. 発表標題 ラット食道横紋筋運動の制御におけるカプサイシン感受性内在神経回路の役割
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会（鹿児島）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀井 和広、中森 裕之、内藤 清惟、椎名 貴彦、志水 泰武
2. 発表標題 カリウムチャンネルを介するラット食道横紋筋の運動制御
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会（鹿児島）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀井 和広、中森 裕之、内藤 清惟、椎名 貴彦、志水 泰武
2. 発表標題 ラットの食道蠕動を解析できるin vivo実験法の確立
3. 学会等名 第64回中部日本生理学会（甲府）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 椎名 貴彦、堀井 和広、内藤 清惟、中森 裕之、志水 泰武
2. 発表標題 ラット食道運動を制御するプリン作動性機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会（高松）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro Horii, Takahiko Shiina, Kiyotada Naitou, Hiroyuki Nakamori, Yuuki Sano, Hiroki Shimaoka, Yasutake Shimizu
2. 発表標題 A novel in vivo method is useful for investigating central mechanisms of esophageal peristalsis in rats.
3. 学会等名 ISAN2017(Nagoya) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 椎名貴彦、堀井和広、志水泰武
2. 発表標題 大腸炎に伴ったハムスター結腸平滑筋における神経筋伝達機構の変化
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会総会 (名古屋)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎名貴彦、堀井和広、志水泰武
2. 発表標題 大腸炎モデル動物における結腸運動の神経制御機構
3. 学会等名 第29回日本病態生理学会大会 (大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎名 貴彦
2. 発表標題 哺乳類の食道運動制御機構に関する研究
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 (つくば) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎名貴彦、堀井和広、齋藤正一郎、尾之内佐和、志水泰武
2. 発表標題 ATP感受性カリウムチャネルによる食道横紋筋運動の制御機構
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（別府）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

獣医生理学研究室 岐阜大学応用生物科学部 http://www.abios.gifu-u.ac.jp/yshimizu/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	志水 泰武 (Shimizu Yasutake)		
研究協力者	堀井 和広 (Horii Kazuhiro)		