

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：34207

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09362

研究課題名（和文）ストレスによる機能性胃腸症の発症メカニズム解明とイメージングバイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Study on the pathogenesis of functional dyspepsia caused by stress and development of imaging biomarkers

研究代表者

田中 弘一郎 (TANAKA, Koichiro)

びわこリハビリテーション専門職大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：00171752

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）： 脳腸相関を可視化するためMn²⁺を用いた超高磁場機能的MRIによるマイクロイメージング法を開発し、慢性および急性ストレスモデルにおける脳神経活動の可視化を行った。慢性予測不能軽度ストレス負荷マウスでは、機能性胃腸症に関連する摂食行動に関する視床下部に神経活動の有意な変化がみられた。急性ストレスモデルである拘束ストレス負荷マウスおよびラットでは、予想に反して脳内の神経活動に有意な変化が認められなかった。Mn²⁺の取込み時間が原因と考えられた。今後、これらのストレスモデルの更なる解析を通して機能性胃腸症の発症メカニズムの解明と診断・治療に役立つイメージングバイオマーカーの開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能性胃腸症や過敏性腸症候群などのストレス関連疾患の発症に關与する神経系を介した脳と腸の相互作用（脳腸相関）を超高磁場機能的MRIを用いてリアルタイムかつ非侵襲的に可視化する方法の開発は、ストレス関連疾患の発症メカニズムを解明するための基盤研究を促進するだけでなく、ストレス関連疾患の診断及び創薬スクリーニングの評価や薬剤の治療効果を評価する新規イメージングバイオマーカーの開発に繋がると期待される。更に、超高磁場機能的MRIを用いた脳のマイクロイメージングは、リハビリテーションの対象となる脳・神経系疾患の発症メカニズムの研究や各療法の診断や治療効果を評価する方法として用いられる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： We developed a micro-imaging method using ultra-high-field functional MRI with Mn²⁺ to visualize the gut-brain axis and visualized brain neural activity in chronic and acute stress models. In chronic stress models such as unpredictable mild stress-loaded mice, significant changes in neural activity were observed in the hypothalamus involved in eating behavior related to functional dyspepsia. In acute stress models such as restraint stress-loaded mice and rats, no significant changes in neural activity in the brain were observed contrary to expectations. It is under consideration that the uptake time of Mn²⁺ may be the cause. In the future, we aim to elucidate the pathogenesis of functional dyspepsia through further analysis of these stress models and develop imaging biomarkers that will be useful for diagnosis and treatment of functional dyspepsia.

研究分野：細胞生物学、生体分子医学、創薬化学

キーワード：機能性胃腸症 ストレス 脳腸相関 超高磁場機能的MRI イメージングバイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

機能性胃腸症 (functional dyspepsia : FD) は、Rome III 基準¹⁾で機能性胃・十二指腸障害として収載され、食後膨満感、早期飽満感、早期満腹感を主訴とする食後愁訴症候群 (post-prandial distress syndrome: PDS) と心窩部痛および心窩部灼熱感を主訴とする心窩部痛症候群 (epigastric pain syndrome: EPS) に分類され、その原因となりそうな器質的疾患は確認されない。FD の原因は複合的であると考えられるが、第一の原因は、胃の拡張障害や運動機能の低下である。つまり、食物受け入れ時に胃の伸展が十分でなかったり (適応性弛緩障害) 消化物が十二指腸へうまく送り出せなかったり (胃排出能異常) することが考えられている。第二の原因は、胃の知覚過敏である。少量の食べ物で圧迫感を感じたり、胃酸に対して過剰に反応して痛みを感じる。これらにはストレスが発症の引き金になると考えられているが、そのメカニズムは明らかではない。

2013 年、世界に先駆けて日本で発売された acotiamide は、Rome III 基準に適合した FD 患者を対象とした臨床試験において、世界で初めて食後愁訴症候群に対して有効性が確認された薬剤である。その作用機序は、神経末端のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) を阻害することによる胃前庭部の運動低下改善作用によるとされる。一方、acotiamide をラットに投与後、DNA マイクロアレイによる視床下部及び延髄の遺伝子発現解析を行った結果、ストレス関連遺伝子 (neuromedin U, GABA 関連遺伝子) の発現に変化が見られた。また、acotiamide は拘束ストレス下で低下したラット胃排出及び摂食を改善した。さらに、カプサイシンによる求心性迷走神経遮断は、acotiamide によるラット胃排出改善作用を消失させた²⁾。これらのことから、acotiamide は AChE 阻害活性だけでなく、迷走神経を介した脳腸相関を調節することにより他の腸管運動賦活剤とは異なる作用を示し、FD の食後膨満感、早期満腹感を改善する可能性が示唆された (Fig.1)。

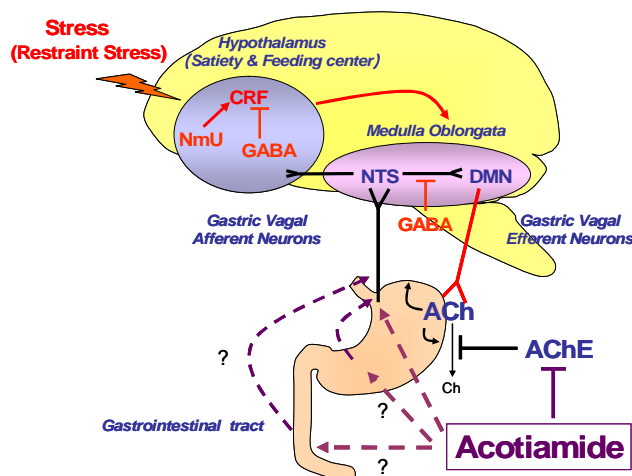


Fig.1. Putative mode of action of acotiamide.

近年、胃から分泌される腸管ペプチド・グレリンが求心性迷走神経に存在するグレリン受容体を介して脳腸相関に関与し、消化管運動亢進作用及び摂食亢進作用を示すことが明らかにされつつある³⁾。また、一般的に胃腸機能が低下し、食欲不振、胃もたれなどの上部消化管症状を訴える患者に用いられてきた漢方薬、六君子湯が、消化管運動亢進、胃排出能改善、胃適応性弛緩改善などの作用を示すことが確認され、臨床研究で FD に対する有効性が示されている⁴⁾。これらの六君子湯の作用は、最近の基礎研究から、六君子湯に含まれるフラボノイドなどによるグレリン分泌低下改善作用及びグレリン感受性改善作用によると考えられている⁵⁾⁶⁾。

以上のことから、FD の発症にはストレス、迷走神経を介した脳腸相関、グレリン等の腸管ペプチドの関与が示唆されるが、これらを統合的に説明できる発症メカニズムは提唱されていない。また、現在のところこれらについて評価するリアルタイムかつ非侵襲的計測法の開発はされていない。

本研究では脳腸相関を可視化するため Mn^{2+} を用いた超高磁場機能的 MRI (fMRI) によるマイクロイメージング法を開発し、慢性および急性ストレスモデルにおける脳神経活動の可視化を行い、ストレス負荷による FD の発症メカニズムを解明するための研究基盤作りを試みた。

2. 研究の目的

迷走神経系を介した脳と腸管の相互作用 (脳腸相関) を超高磁場 fMRI を用いて可視化するマイクロイメージング法を開発し、開発した方法を用いてストレス負荷による FD の発症メカニ

Δを解明するための研究基盤をつくる。更に、FDの診断・治療に役立つイメージングバイオマーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

1) 慢性ストレス負荷マウス

慢性予測不能軽度ストレス (CUMS) 負荷マウス

6週齢の雄性 C57BL/6J 系マウスに 12 時間の餌と飲水の制限、12 時間の 30 度のケージ傾斜での飼育、10 分間の 100rpm でのケージ揺動、12 時間の湿ったチップでの飼育、1 分間の尻尾へのピンチ、2 時間のチューブ内での拘束、24 時間の照明、12 時間の空ケージでの飼育、24 時間の隔離飼育をランダムに 1 日 1 種類のストレスを 4 週間負荷した。第 4 週目に隔日に $MnCl_2$ 水溶液を 0.2 mmol/kg になるように腹腔内投与した。24 時間絶食した後、fMRI 測定を行った。

慢性社会的敗北ストレス (SDS) 負荷マウス

攻撃的な雄性 ICR マウスの縄張り本能を利用して劣位の 6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに敗北経験を負荷する。C57BL/6J マウスは異なる攻撃的な ICR マウスに毎日 1 分間、10 日間連続で曝露された。攻撃性のばらつきの影響を最小化するために、ストレスを与えたマウスと攻撃的なマウスの組み合わせは毎日ランダムにした。最終週に隔日に $MnCl_2$ 水溶液を 0.2 mmol/kg になるように腹腔内投与した。24 時間絶食した後、fMRI 測定を行った。

2) 急性ストレス負荷マウス

拘束ストレス負荷マウスおよびラット

6 週齢の雄性 C57BL/6J 系マウスおよび 7 週齢の雄性 Crj:Wistar 系ラットを 24 時間絶食後、 $MnCl_2$ 水溶液を 0.2 mmol/kg になるように腹腔内投与した。30 分後ストレスケージに入れて 60 分間拘束ストレスを負荷した後、fMRI 測定を行った。

3) fMRI

MRI 装置は、大阪大学先導的学際研究機構所有の小動物用超高磁場 MRI 装置 (11.7T MR scanner, AvanceII imaging system, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) を用いた。

各種ストレス負荷雄性マウスを 2.8% isoflurane で麻酔後、MRI 装置に保持し、測定時は呼吸数が 60 ± 10 になるように isoflurane 濃度を $1.5 \pm 0.4\%$ に調整した。

4. 研究成果

1) Mn^{2+} を用いた超高磁場 fMRI によるマイクロイメージング法の開発

非侵襲的脳機能計測法として、磁気共鳴法では神経細胞の電位依存性カルシウムチャネルの活動 (Mn^{2+} を利用) 神経伝達物質や ATP の量 (磁気共鳴スペクトロスコピー) 神経活動に伴い変動する血液の変化など、様々な脳活動に伴う神経細胞や脳血液の変動を評価することができる。近年で飛躍的に発展した BOLD-fMRI (BOLD: blood oxygenation level-dependent) は、血液中の脱酸素ヘモグロビン濃度を反映させた磁気共鳴信号強度を指標とするが、比較的、時空間的分解能に優れており、多用されてきた。観測しているのは血行動態であり直接的な神経活動ではないが、脳での神経系と血管系の密接な関係を反映していると考えられている。適応できる時間レベルは、数秒から数十秒程度であり、それを越えると徐々に反応は低下する。

fMRI は、BOLD 効果の他にも、拡散係数、動脈血流、静脈血流量、血液量、温度、代謝物質、ある種のプローブ (Mn^{2+} など) の活用など、様々なパラメータを用いた方法が開発・提案されてきた。

神経細胞が活性化されると活動電位の発生に伴い電位依存性カルシウムチャネルが開口して Ca^{2+} が細胞内に流入するが、これと同時に Mn^{2+} が存在すると電位依存性カルシウムチャネルは Mn^{2+} も取り込む。取り込まれた Mn^{2+} は細胞内に蓄積されるため、これを検知できる 11.7T の超高磁場 MRI 装置を用いたマイクロイメージングは非常に有効な方法と考えられた。

2) Mn^{2+} を用いた超高磁場 fMRI による脳機能評価

Mn^{2+} を用いた超高磁場 fMRI によるマイクロイメージング法を用いて、慢性ストレスモデル及び急性ストレスモデルにおける前頭皮質、側坐核、線条体、脳梁、海馬、視床下部、扁桃体、腹側被蓋野の脳神経活動の可視化を行った。

慢性ストレスモデルである慢性予測不能軽度ストレス (CUMS) 負荷マウスでは、視床下部での有意なシグナル増加が見られた。視床下部は、FD に関連する摂食行動に関与することから FD のイメージングマーカーになる可能性が示唆された。実際にこのストレスモデルでは摂食の低下が確認されていることから、さらに FD に関連する胃排出能についても詳細に検討する必要がある。更に、このモデルでは海馬および脳梁において優位なシグナル増加が認められた。CUMS においては海馬の神経新生低下が惹起されるなど神経活動の低下が認められることから、海馬

シグナルの増加はグリア細胞の活性化が示唆された。脳梁におけるシグナル増加は、下記の SDS 負荷マウスと同様に、髄鞘の炎症による活性化が示唆された。

慢性ストレスモデルである慢性社会的敗北ストレス (SDS) 負荷マウスでは、脳梁でのシグナル増加が認められ、髄鞘の炎症による活性化が示唆された。

急性ストレスモデルである拘束ストレス負荷マウスおよびラットでは、予想に反して脳内の神経活動に有意な変化が認められなかった。これまでの研究から急性ストレス負荷ラットでは摂餌量および胃排出能の低下が確認されていたため、視床下部における神経活動の変化が検出されると予想されていた。原因は Mn^{2+} の取込み時間が慢性ストレスモデルに比べて短いため、コントロールとの差が検出できなかった可能性が高い。

今後、これらのストレスモデルの更なる解析を通して FD の発症メカニズムの解明と診断・治療に役立つイメージングバイオマーカーの開発を目指す。

3) 超高磁場 fMRI を用いた脳のマイクロイメージング法の今後の展開

FD や過敏性腸症候群などのストレス関連疾患の発症に関与する神経系を介した脳と腸の相互作用 (脳腸相関) を超高磁場 fMRI を用いてリアルタイムかつ非侵襲的に可視化するマイクロイメージング法の開発は、ストレス関連疾患の発症メカニズムを解明するための基盤研究を促進するだけでなく、ストレス関連疾患の診断及び創薬スクリーニングの評価や薬剤の治療効果を評価する新規イメージングバイオマーカーの開発に繋がると期待される。

参考文献

- 1) Drossman D. A., The functional gastrointestinal disorders and Rome III *Gastroenterology*, **130**, 1377-1390, 2006.
- 2) Seto K., Sasaki T., Katsunuma K., Kobayashi N., Tanaka K., Tack J. Acotiamide hydrochloride (Z-338), a novel prokinetic agent, restores delayed gastric emptying and feeding inhibition induced by restraint stress in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* **20**, 1051-1059, 2008.
- 3) Kojima M., Kangawa K. Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ.* **50**, 185-205, 2010.
- 4) Arai M., Matsumura T., Tsuchiya N., Sadakane C., Inami R., Suzuki T., Yoshikawa M., Imazeki F., Yokosuka O. Rikkunshito improves the symptoms in patients with functional dyspepsia, accompanied by an increase in the level of plasma ghrelin. *Hepatogastroenterology.* **59**, 62-66, 2012.
- 5) Fujitsuka N., Asakawa A., Uezono Y., Minami K., Yamaguchi T., Nijima A., Yada T., Maejima Y., Sedbazar U., Sakai T., Hattori T., Kase Y., Inui A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Transl Psychiatry.* **1**, e23, 2011.
- 6) Takeda H., Sadakane C., Hattori T., Katsurada T., Ohkawara T., Nagai K., Asaka M. Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism. *Gastroenterology.* **134**, 2004-2013, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	吉岡 芳親 (YOSHIOKA Yoshichika) (00174897)	大阪大学・先導的学際研究機構・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関