

令和元年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19469

研究課題名(和文)脳腸関連の統合的理解に基づく新しい創薬標的探索を指向した萌芽的研究

研究課題名(英文)Challenging research aimed at exploration of novel target for drug discovery based on integrated understanding of brain-intestine interactions

研究代表者

南 雅文(Minami, Masabumi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20243040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃(上部消化管)や結腸直腸(下部消化管)への伸展刺激が、脳内の分界条床核においてノルアドレナリン遊離を促進することを明らかにした。我々は、これまでに、分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達亢進が不安・嫌悪を惹起することを報告しており、消化管への刺激が分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達亢進を介して不安・嫌悪を惹起することが考えられる。一方、分界条床核へのアドレナリン受容体作動薬投与が、上部消化管運動を抑制する一方、下部消化管運動は促進することを明らかにした。不安やストレスが分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達亢進を介して、胃もたれや下痢などの消化管障害を惹起することが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管刺激により分界条床核内ノルアドレナリン遊離が亢進すること、さらには、分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達亢進が消化管活動に影響を及ぼすことを示した本研究成果は、脳腸関連における分界条床核の重要性を示すものである。日常的にも経験する「お腹の調子が悪いと不安やうつになる」、あるいは、「心配なことがあるとお腹の調子が悪くなる」という脳と消化管の間の機能関連のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、機能的ディスペプシアや過敏性腸症候群などのストレスに起因する機能的消化管障害の病態メカニズム解明や治療薬創製に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The gastric (upper gastrointestinal tract) and colorectal (lower gastrointestinal tract) distention increased noradrenaline release in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Because we have previously reported that enhanced noradrenaline neurotransmission in the BNST causes anxiety and aversion, gastric and colorectal distention may induce anxiety and aversion via the enhancement of intra-BNST noradrenaline neurotransmission. Furthermore, we showed that intra-BNST administration of beta-adrenoceptor agonist reduced gastric emptying (suppressed upper gastrointestinal motility), while it increased colonic transit (enhanced lower gastrointestinal motility). Anxiety and stress may cause functional gastrointestinal disorders such as stomach upset and diarrhea via enhanced noradrenaline neurotransmission in the BNST.

研究分野：薬理系薬学

キーワード：薬学 薬理学 脳腸関連 情動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 分界条床核 (Bed nucleus of the stria terminalis; BNST) は、扁桃体中心核とともに拡張扁桃体 (extended amygdala) と呼ばれる脳領域を構成し、ストレス応答や不安・嫌悪・恐怖などの不快情動の生成に関与していることが知られている。また BNST の腹側領域 (ventral BNST; vBNST) は、ノルアドレナリン神経の密な投射を受けている。

(2) 我々はこれまでに、ホルマリン後肢足底内投与や酢酸腹腔内投与による炎症性疼痛によって vBNST におけるノルアドレナリン遊離が亢進し、アドレナリン受容体を介した神経情報伝達の亢進が、痛みによる嫌悪反応に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらに、vBNST 内のアドレナリン受容体を介した神経情報伝達亢進により、不安様行動が増加することも明らかにしている。

(3) 脳と消化管の機能的連関 (脳腸相関) が注目されており、過敏性腸症候群 (Irritable bowel syndrome; IBS) 患者はうつ病の罹患率が高いことや、ラットに下部消化管 (結腸直腸) 刺激を負荷することにより不安が亢進することなどが報告されている。

### 2. 研究の目的

(1) 不快情動を惹起することが知られている胃 (上部消化管) や結腸直腸 (下部消化管) の拡張刺激によっても vBNST 内ノルアドレナリン遊離量が増加するかどうかを明らかにする。

(2) アドレナリン受容体作動薬の vBNST 内投与によるノルアドレナリン神経情報伝達亢進が、上部および下部消化管機能に与える影響について検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 上部および下部消化管の拡張刺激: 実験には雄性 Sprague-Dawley 系ラットを使用した。動物は、室温  $23 \pm 1$ 、明暗周期 12 時間で、摂食・飲水が自由に行える室内環境の下で飼育した。なお、実験は全て「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」を遵守して行った。胃拡張 (gastric distension; GD) 刺激については、麻酔下に、カテーテル先端に接続したラテックス製バルーン (長軸: 4 cm, 短軸: 2 cm) を前胃に切り込みを入れて挿入し胃内に留置した。カテーテル逆端は皮下を通して首の後ろから露出させた。実験当日、カテーテル逆端をバロスタット装置に接続しバルーンを膨らませることで、25 もしくは 45 mmHg の GD 刺激を 30 分間負荷した。結腸直腸拡張 (Colorectal distension; CRD) 刺激では、イソフルラン麻酔下、ラット肛門からポリエチレン製バルーンを 6 cm 挿入し、尾部にテープで固定した。バルーンをバロスタット装置に接続し、30 もしくは 45, 60 mmHg の CRD 刺激を 30 分間負荷した。

(2) In vivo マイクロダイアリシス: 麻酔下に、ラットを脳定位固定装置に固定し、マイクロダイアリシス用ガイドカニューレの先端が右側 vBNST の 1.0 mm 上 (bregma から尾側に 0.3 mm、外側に 1.6 mm、頭蓋表面から深さ 6.7 mm) の位置になるよう挿入し、歯科用セメントで固定した。ガイドカニューレ埋め込み手術から 1-2 日後、前日から絶食していたラットにマイクロダイアリシス用透析プローブを挿入し、リンゲル液をマイクロシリンジポンプにより流速 1.0  $\mu\text{l}/\text{min}$  で灌流した。ラットが自由にチャンバー (30 × 30 × 35 cm) 内を行動できる状態で実験を行った。ノルアドレナリンの分離には、分離カラム Eicomapak CAX (2.0 mm i.d. × 200 mm) を装着した HTEC-500 型マイクロダイアリシス分析システム (株式会社エイコム、京都) を用いた。分離カラムは恒温槽により  $35^\circ\text{C}$  に保った。移動相として 0.05 M 硫酸ナトリウム、50 mg/l エチレンジアミン四酢酸、30 % メタノールを含有する 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) を用い、流速 0.25 ml/min で送液した。ノルアドレナリンはグラファイト電極 (WE-3G) を装着した電気化学検出器 (+450 mV vs. Ag/AgCl 参照電極) により検出した。透析液はオートインジェクタ (EAS-20) により 15 分毎に自動的に注入し、クロマトグラムピークは解析ソフトウェアにより解析を行った。灌流を開始してから 2 時間以上経過の後、細胞外ノルアドレナリン量が安定してから基礎遊離量 (basal level) を測定し、その後 GD あるいは CRD 刺激の負荷を開始し、負荷開始 120 分後 (GD) あるいは 90 分後 (CRD) まで細胞外ノルアドレナリン遊離量を測定した。

(3) 脳局所薬物投与: 麻酔下に、ラットを脳定位固定装置に固定し、ガイドカニューレの先端が vBNST の 1.5 mm 上方 (bregma から尾側に 0.3 mm、外側に 1.6 mm、頭蓋表面から深さ 6.0 mm) の位置になるよう両側性に挿入し、歯科用セメントで固定した。ガイドカニューレ挿入後、少なくとも 5 日間の回復期間において、各薬物および vehicle の投与を行った。脳内局所投与は、インジェクションカニューレをガイドカニューレ内へ挿入することにより行った。インジェクションカニューレ先端は、ガイドカニューレ先端から 1.5 mm 突出するようにした。インジェクションカニューレはポリエチレンチューブを介してマイクロインジェクションポンプに接続し、流速 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  で 1 分間かけて、両側に各々 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$  投与した。薬液逆流防止のため、投与後さらに 1 分経過した後にインジェクションカニューレを抜き取った。

(4) 胃排出能：24時間の絶食後、vBNST内に薬物投与を行い、5分後にEvans blueを1.5 mL経口投与し、投与20分後にイソフルラン麻酔下で屠殺した。開腹後、消化管(胃から盲腸まで)を摘出し、下部食道括約筋の上部および幽門の下部を結紮し、胃を切り離して粉末状ドライアイスで急速凍結させた。胃排出能解析の際には、胃とその内容物に15 mLの0.1 N NaOHを加え、ホモジネート後に、30 mLまで0.1 N NaOHで希釈し、室温で1時間静置した。その後、上清5 mLを1400 g、4 で20分間遠心した。上清サンプルをさらに0.1 N NaOHで希釈(1/50)し、565 nmでの吸光度を測定した。Evans blue経口投与直後に屠殺したラットから得られた胃および内容物をコントロールとし(reference stomach) gastric emptyingを $[(A565 \text{ reference}-A565 \text{ sample})/A565 \text{ reference}] \times 100$ の式で算出した。

(5) 大腸輸送能：麻酔下に、ポリエチレンチューブを首から腹部までの皮下を通し、腹筋を切開して盲腸を露出させ、大腸と盲腸の境目からポリエチレンチューブの末端を1.5 cm大腸に挿入した。前日から絶食したラットにvBNST内薬物投与を行い、5分後にチューブを介してEvans blueを200  $\mu$ l注入し、15分後に大腸を摘出し、大腸全長と色素が輸送された距離を測定し、大腸全長に対する色素移動距離の割合を大腸輸送能(Colonic transit)として算出した。

(6) 統計解析：データは平均値  $\pm$  SEMで表した。統計解析は、student's *t*-testおよびTwo-way analysis of variance (ANOVA)を用いた。危険率が5%未満の場合に統計学的に有意であると判定した。

#### 4. 研究成果

(1) GDおよびCRD刺激負荷によるvBNST内ノルアドレナリン遊離量の変化：GD刺激負荷により、vBNST内ノルアドレナリン遊離量は有意に増加した(GD stimulus:  $F_{1,15} = 6.97$ ,  $P = 0.019$ ; time:  $F_{10,150} = 8.78$ ,  $P < 0.001$ ; interaction:  $F_{10,150} = 4.93$ ,  $P < .001$ , 2-way repeated-measures ANOVA)。Post hoc testの結果、45 mmHg GD刺激群において、刺激開始後15から60分の時間帯で刺激開始前-15から0分の時間帯と比較し、ノルアドレナリン遊離は有意に上昇していた。一方、25 mmHg GD刺激群では、いずれの時間帯においても有意なノルアドレナリン遊離上昇は観察されなかった。CRD刺激負荷により、vBNST内ノルアドレナリン遊離量は有意に増加した(CRD stimulus:  $F_{2,20} = 5.17$ ,  $P = 0.016$ ; time:  $F_{8,160} = 7.72$ ,  $P < 0.001$ ; interaction:  $F_{16,160} = 3.35$ ,  $P < 0.001$ , 2-way repeated-measures ANOVA)。Post hoc testの結果、60 mmHg CRD刺激群において、刺激開始後0から45分の時間帯で刺激開始前-15から0分の時間帯と比較し、ノルアドレナリン遊離は有意に上昇していた。一方、45 mmHg CRD刺激群でノルアドレナリン遊離の上昇傾向が見られたが、Post hoc testの結果、30および45 mmHg CRD刺激群では、いずれの時間帯においても有意なノルアドレナリン遊離上昇は観察されなかった。

(2) vBNST内ノルアドレナリン受容体作動薬投与による胃排出能の変化：両側vBNSTにアドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールおよびアドレナリン受容体拮抗薬であるチモロールを投与し胃排出能に及ぼす影響を検討した。イソプロテレノールのvBNST内投与により、胃排出は、vehicle投与群と比較し有意に抑制された。このイソプロテレノールによる胃排出抑制はチモロールの同時投与により拮抗された。チモロール単独投与では胃排出能に影響を及ぼさなかった。

(3) vBNST内ノルアドレナリン受容体作動薬投与による大腸輸送能の変化：両側vBNSTにイソプロテレノールおよびチモロールを投与し大腸輸送能に及ぼす影響を検討した。イソプロテレノールのvBNST内投与により、大腸輸送は、vehicle投与群と比較し有意に促進された。このイソプロテレノールによる大腸輸送促進はチモロールの同時投与により拮抗された。チモロール単独投与では大腸輸送能に影響を及ぼさなかった。

(4) 研究成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望：これまでに、拘束ストレスや炎症性疼痛、天敵臭などの種々のストレスにより分界条床核内ノルアドレナリン遊離が上昇することが報告されている。本研究において新たに、上部消化管や下部消化管に対する拡張刺激も分界条床核内ノルアドレナリン遊離を上昇させることが明らかとなった。我々はこれまでに、分界条床核内のノルアドレナリン神経情報伝達亢進により嫌悪反応や不安情動が惹起されることを見出しており、分界条床核内ノルアドレナリン遊離上昇が、消化管拡張刺激による嫌悪反応や不安情動の惹起に関与していることが考えられる。

ストレスとノルアドレナリンの間には密接な関係がある。ストレスが消化管に与える影響としては、胃排出能低下や大腸輸送能上昇(糞便排泄量増加)が知られている。本研究により、vBNSTに受容体アゴニストであるイソプロテレノールを投与することによって、胃排出能が低下し、大腸輸送能が上昇することが明らかとなった。これらの結果は、分界条床核でのノルアドレナリン神経情報伝達亢進が、ストレスによる胃排出能低下や大腸輸送能上昇に関与している可能性を示唆している。

消化管刺激により分界条床核内ノルアドレナリン遊離が亢進することを示すとともに、分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達の亢進が消化管活動に影響を及ぼすことを示した本研究成果は、脳腸関連のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、機能的ディスペプシア(FD)や過敏性腸症候群( IBS)などのストレスに起因する機能的消化管障害の病態メカニズム解明や治療薬創製に役立つことが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 3 件 )

Soichiro Ide, Ryuta Yamamoto, Hacchi Suzuki, Hiroshi Takeda, Masabumi Minami. Roles of noradrenergic transmission within the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis in bidirectional brain-intestine interactions. **Neuropsychopharmacol. Rep.** **38**:182-188, 2018 DOI:10.1002/npr2.12032. 査読有

Naoki Yamauchi, Daiki Takahashi, Yae K. Sugimura, Fusao Kato, Taiju Amano, Masabumi Minami. Activation of the neural pathway from the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis to the central amygdala induces anxiety-like behaviors. **Eur. J. Neurosci.** **48**:3052-30691, 2018 DOI: 10.1111/ejn.14165. 査読有

Soichiro Ide, Ryuta Yamamoto, Hiroshi Takeda, Masabumi Minami. Bidirectional brain-gut interactions: Involvement of noradrenergic transmission within the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropsychopharmacol. Rep.** **38**:37-43, 2018 DOI:10.1002/npr2.12004. 査読有

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html>

## 6 . 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：井手 聡一郎  
ローマ字氏名：( IDE, Soichiro )

研究協力者氏名：天野 大樹  
ローマ字氏名：( AMANO, Taiju )

研究協力者氏名：野村 洋  
ローマ字氏名：( NOMURA, Hiroshi )

研究協力者氏名：人羅 菜津子  
ローマ字氏名：( HITORA, Natsuko )

研究協力者氏名：山本 隆太  
ローマ字氏名：( YAMAMOTO, Ryuta )

研究協力者氏名：鈴木 発知  
ローマ字氏名：( SUZUKI, Hacchi )

研究協力者氏名：高橋 大樹  
ローマ字氏名：( TAKAHASHI, Daiki )

研究協力者氏名：山内 直樹  
ローマ字氏名：( YAMAUCHI, Naoki )

研究協力者氏名：武田 宏司  
ローマ字氏名：( TAKEDA, Hiroshi )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。