

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33504

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17945

研究課題名(和文) 食事性肥満による消化管運動障害の解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of gastrointestinal motility disorders caused by dietary obesity and of new treatment development

研究代表者

志茂 聡 (Satoshi, Shimo)

健康科学大学・健康科学部・准教授

研究者番号：80734607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食誘発肥満モデルマウスを用いた実験により、以下の3点を明らかにした。(1)高脂肪食群では小腸筋層間神経叢のNOS、Substance P、Calbindinが有意に減少を認め、フロリジン投与後はNOSの増加を認めた。(2)高脂肪食群では軸索のVaricosity内のシナプス顆粒の集積が減少を認め、フロリジン投与後はシナプス集積の増加と側枝の形成を認めた。(3)高脂肪食群では消化管通過時間の遅延を認めた。高脂肪食摂取により、小腸筋層間神経叢のシナプス顆粒の減少を惹起することが明らかとなった。さらに、フロリジンがシナプス動態の保護とともに蠕動運動の改善に作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の肥満人口は急速に増えており、日本でも欧米型(高脂肪)の食事とともに、肥満を背景とした2型糖尿病患者が増加傾向であり、大きな社会的問題となっている。また、糖尿病の合併症ではしびれなどの感覚神経障害以外にも、下痢や便秘などの消化器症状を高頻度で引き起こし、日常生活が著しく制限されるため社会的な損失も大きい。しかし、これらの消化器症状の発症機序は不明な点が多く、対症的な治療となるため新規薬剤の開発が求められている。我々の研究により、腸管神経叢を標的とした消化管機能改善薬を開発することができれば、糖尿病の新たな治療法として臨床への応用・発展が大いに期待でき、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Obesity induced in mice through high fat diet (HFD) revealed the following three points. (1) In HFD-fed mice, NOS, substance P, and calbindin in the myenteric plexus were significantly decreased, while NOS was increased after phlorizin treatment. (2) In HFD-fed mice, accumulation of synaptic vesicles in axon varicosities was decreased, but increased synaptic accumulation vesicle and formation of lateral branches were observed after phlorizin treatment. (3) Delayed gastrointestinal transit time was observed in HFD-fed mice. The HFD induced a decrease in synaptic vesicles in the myenteric plexus during the prediabetic period, when glucose intolerance began. Furthermore, it was suggested that phlorizin treatment may act to improve peristalsis as well as restore lost axonal varicosities of the myenteric plexus in HFD-fed obese mice.

研究分野：解剖学関連

キーワード：糖尿病 肥満 糖尿病自律神経障害 消化管運動障害 アウエルバッハ神経叢 筋間神経叢 SBF-SEM 3次元再構築

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界の肥満人口は急速に増えている(NCD-RisC, Lancet. 2016)。日本でも欧米型(高脂肪)の食事とともに、肥満を背景とした2型糖尿病患者が増加傾向にあり、大きな社会的問題となっている。糖尿病の合併症ではしびれなどの感覚神経障害以外に、下痢や便秘などの消化器症状(糖尿病性自律神経障害)を高頻度で引き起こし、日常生活が著しく制限されるため社会的な損失も大きい。しかし、これらの消化管運動障害の発症機序は不明な点が多く、対症的な治療となるため新規薬剤の開発が求められている(Low PA, Diabetes Care. 2004)。我々は、高脂肪食飼した肥満2型糖尿病モデルマウスの予備実験から、(1)蠕動運動を司る小腸筋層間神経叢内のシナプス顆粒が減少する。(2)小腸筋層間神経叢内の軸索ではバリコシティと側枝が減少する。(3)フロリジン(SGLT 阻害剤)投与により軸索バリコシティと側枝が増加することを見出した。

本研究の学術的な問いは、消化管運動障害が小腸筋層間神経叢内の軸索における側枝の減少および神経伝達物質の枯渇による伝達異常に起因するのではないか?という仮説である。また、予備実験で得た SGLT 阻害剤投与による軸索形態の改善は、筋層間神経叢内神経叢内の神経細胞に局在する SGLT1、SGLT2、SGLT3 の影響が強く示唆されるものである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病における消化管運動障害の発症機序を明らかにし、SGLT 阻害剤による消化管運動改善薬の開発することである。そこに至る本研究目標として、上記仮説を立証し、SGLT 阻害剤の効果の基礎検討をおこなう。本研究の学術的独自性は、消化器運動障害を軸索の形態変化と神経伝達物質の枯渇による伝達異常によって起こるという新たな概念でとらえる点である。現在注目されている新規糖尿病薬 SGLT 阻害剤は、腎臓近位尿管に局在する SGLT2 を阻害することにより糖再吸収を抑制し、血糖低下を主目的とするものである。一方、我々は小腸筋層間神経叢内の腸管神経細胞に局在する SGLT1、SGLT2、SGLT3 を標的とすることにより、直接的に腸管における神経伝達機能および蠕動運動の改善を図るものである。これは、今までに無い発想で消化管運動機能改善を図るものであり、本研究の独創的な点である。SGLT 阻害による消化管運動機能への効果が明らかとなれば、新規治療法として臨床医学への貢献も大きい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物の作製

4週齢雄マウスに20週齢までに高脂肪食群(60Kcal% fat)と通常食群(16Kcal% fat)を与え、各群とともに1)フロリジン(400 mg/kg)投与、2)Vehicle 投与または3)投与なしの各3群を作製した。また、比較検討のためストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウス(STZ 群)を作製した。試料採取前には、各群ともに血糖値および24時間の摂食量、飲水量、糞便量を計測した。

#### (2) 免疫組織化学的解析

麻酔下で空腸を露出し、生体内凍結技法による物理固定を行った後、型のごとくパラフィン包埋を行った。一部の腸管試料は、4%パラホルムアルデヒドによる浸漬固定後、ホールマウント法を行った。作製したパラフィン切片およびホールマウント試料は、各種神経伝達物質(Synaptophysin, ChAT, Substance P, NOS, VIP)および一次求心性神経(Calbindin)に対する抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。

#### (3) 高速連続電子顕微鏡画像取得による3次元微細構造解析

麻酔下で空腸を切り出して4%パラホルムアルデヒドおよび1%グルタルアルデヒドによる浸漬固定後、1%四酸化オスmium水溶液による後固定を行った。さらに、コンダクティブエポキシ処理を行った後に型のごとくエポキシ包埋し、クロトーム組み込み型走査型電子顕微鏡(SBF-SEM, CarlZeiss Merlin, Sigma)にて撮像を行った。解析は3次元解析ソフトウェア(Amira5.6, Thermo fisher scientific)を用いて、軸索内のバリコシティ、リソソームおよび側枝の数、表面積、体積を計測し、比較した。

#### (4) 消化管排泄機能の解析

マウスを4時間絶食させた後、5%のエバンスブルーを含む1.5%メチルセルロース 100ml を経口投与30分後に腸管を採取した。摘出した小腸の全長とエバンスブルーで覆われた長さを測定し、染色割合を算出した。

### 4. 研究成果

通常食群と比較して高脂肪食群では、顕著な体重増加および血糖値の上昇がみられた。一方、摂食量および飲水量では、通常食群と高脂肪食群で有意な差はみられなかったが、糞便量では高脂肪食群で顕著に減少していた。

免疫組織化学的解析では、通常食群では、小腸筋層間神経叢内および筋層間の軸索内に顆粒状

の synaptophysin 陽性像を豊富に認めたと、高脂肪食群では小腸筋層間神経叢内の陽性像は減弱していた。一方、高脂肪食群フロリジン投与後は、小腸筋層間神経叢内に顆粒状の synaptophysin 陽性像を豊富に認めた。さらに、通常食群に比べて高脂肪食群において ChAT、VIP で有意な増加を認め、NOS、Substance P、Calbindin で有意な減少を認めた。一方、高脂肪食群フロリジン投与後では ChAT、NOS は正常化した。

一方、ミクロトーム組み込み型走査電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いた超微形態解析では、高脂肪食群では軸索の Varicosity 内のシナプス集積はほとんどみられなかったが、高脂肪食群フロリジン投与後は、Varicosity 内のシナプス集積とともに軸索に多数の側枝の形成を認めた。軸索内リソソームの解析では、表面積および体積では高脂肪食群と通常食群に著明な変化は認めなかったが、リソソーム数では高脂肪食群で有意な減少を認めた。一方、高脂肪食群フロリジン投与後は、リソソーム数に有意な増加を認めた。STZ 群の 3 次元的再構築では、高脂肪食群と類似した軸索 Varicosity の減少とともに、一部の筋層間神経叢では断片化した瘤状の軸索が確認された。さらに、消化管排泄機能の解析では、通常食群に比べて高脂肪食群において消化管通過時間の遅延を認めた。高脂肪食摂取により、耐糖能異常が引き起こされた前糖尿病期において、軸索のリソソーム動態の異常を惹起すること、さらに STZ 群の解析により高脂肪食群で観察された軸索バリコシティの減少が、軸索の断片化への前段階となっている可能性が示唆された。SGLT 阻害剤が小腸筋層間神経叢内のシナプス動態の保護とともに蠕動運動の改善に作用する可能性が示唆された。

本研究の SBF-SEM による 3D 電顕試料作製では、コンダクティブエボン処理を行うことによりコントラストの高い電顕像での取得することができた。これらの新規手法を用いた電顕用エボン包埋試料を解析に使用することにより、小腸筋層間神経叢の超微細立体構造の解析を継続的に取得することができた。一方、当初予定していた(1)平滑筋収縮能の解析を目的とした筋張力計測および(2)自発活動の解析を目的とした slow wave 計測の 2 つの生理学的解析については、実験群の腸管壁が非常に薄く、電極固定が難しいため安定した電氣的活動を計測することができなかった。そのため、エバンスブルーを用いた経口投与による消化管排泄機能の解析を行い、高脂肪食による生理機能への影響を明らかにすることができた。本研究で得られた成果の一部は、国際誌へ発表することができた(S Shimo et al., Sci Rep. 2020, Y Sakamoto et al., IJMS. 2021)。

本研究の SBF-SEM による 3 次元再構築像では、高脂肪食群の一部の軸索ではシナプス小胞や側枝が良好に維持されていることを認めた。しかし、高脂肪食群の同一の筋層間神経叢内で、なぜ軸索によって形態が大きく異なるのか未解明である。今後の展望として、軸索標識技術と 3 次元微細構造解析を用いて、肥満糖尿病モデルにおける各軸索種の微細構造異常の相違を解明したい。さらに、SGLT 阻害剤が各軸索種に及ぼす影響と腸管運動能や神経機能の変化との関連を明らかにすることにより、糖尿病性自律神経障害の病態解明と神経保護に向けた、新たな治療戦略の確立に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satoshi Shimo, Sei Saitoh, Huy Bang Nguyen, Truc Quynh Thai, Masako Ikutomo, Ken Muramatsu, Nobuhiko Ohno	4. 巻 10: 12372.
2. 論文標題 Sodium-glucose co-transporter (SGLT) inhibitor restores lost axonal varicosities of the myenteric plexus in a mouse model of high-fat diet-induced obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69256-9	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 該当する

1. 著者名 Yuta Sakamoto, Masatoshi Niwa, Ken Muramatsu, Satoshi Shimo	4. 巻 22(3): 1165
2. 論文標題 High-Fat Diet and Age-Dependent Effects of IgA-Bearing Cell Populations in the Small Intestinal Lamina Propria in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences (IJMS)	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22031165	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小松明日香, 田村菜緒, 古屋遥奈, 甘利貴志, 志茂聡, 坂本祐太
2. 発表標題 食事誘発性肥満モデルマウスの脾臓におけるIL-10 の免疫組織化学的解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 保坂悠介、齋藤和喜、甘利貴志、坂本祐太、志茂聡
2. 発表標題 SBF-SEMを用いた1型糖尿病モデルマウスにおける空腸筋間神経叢の3次元微細構造解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本祐太, 志茂聡, 村松憲, 丹羽正利
2. 発表標題 高脂肪摂取マウスにおける小腸粘膜固有層に分布するIgA陽性細胞の経時的変化
3. 学会等名 第81回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志茂聡, 坂本祐太, 甘利貴志, 村松憲, 大野伸彦
2. 発表標題 高脂肪食摂取下での腸管筋間神経叢における神経伝達物質局在の免疫組織学的検討
3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S Shimo, S Saitoh, HB Nguyen, TQ Thai, M Ikutomo, K Muramatsu, N Ohno
2. 発表標題 Sodium-glucose co-transporter (SGLT) inhibitor restores lost axonal varicosities of the myenteric plexus in a mouse model of high-fat diet-induced obesity
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志茂聡, 齊藤成, Huy Bang Nguyen, Truc Quynh Thai, 生友聖子, 村松憲, 大野伸彦
2. 発表標題 高脂肪食摂取下でのフロリジン投与がアウエルバツハ神経叢に与える影響
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y Sakamoto, S Shimo, K Muramatsu, M Niwa
2. 発表標題 Immunohistochemical analysis of soluble immunoglobulins in the intestinal mucosa using high-fat feeding model mice
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本祐太, 志茂聡, 村松憲, 丹羽正利
2. 発表標題 高脂肪摂食モデルマウスを用いた腸管粘膜内血清蛋白の免疫組織化学的解析
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimo S, Saitoh S, Nguyen HB, Thai TQ, Muramatsu K, Ohno N.
2. 発表標題 Three-dimensional ultrastructure of myenteric plexus in high-fat diet mice assessed by serial block face scanning electron microscopy.
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saitoh S, Ohno N, Saitoh Y, Terada N, Shimo S, Aida K, Fujii H, Kobayashi T. Ohno S.
2. 発表標題 Correlative light-electron microscopy mapping of Human Langerhans Islets.
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saitoh S, Takaki T, Shimo S, Ohno N.
2. 発表標題 SGLT inhibitor and Impaired Phospholipid Metabolism of Proximal Tubular Epithelium in Diet-Induced Obesity (DIO) Mouse Kidney.
3. 学会等名 第78回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 大野伸彦, 志茂聡, 齊藤百合花	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本組織細胞化学会	5. 総ページ数 12
3. 書名 組織細胞化学2020 電子顕微鏡ボリュームイメージング法	

1. 著者名 大野伸彦, 志茂聡, 齊藤百合花, 藤原研	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本組織細胞化学会	5. 総ページ数 12
3. 書名 組織細胞化学2019-組織細胞化学技法の基礎と応用: -分子を観る、細胞を知る、機能を探る-	

1. 著者名 大野伸彦, 東森生, 藤原研, 齊藤百合花, 志茂聡	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本組織細胞化学会	5. 総ページ数 14
3. 書名 組織細胞化学2018-組織細胞化学の基礎から最先端まで: 形を観て、機能を識る-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

健康科学大学教員紹介

<https://www.kenkoudai.ac.jp/professor/540/>

[https://www.kenkoudai.ac.jp/modules/waffle0/index.php?t\\_m=ddcommon\\_view&id=28&t\\_dd=waffle0\\_data2](https://www.kenkoudai.ac.jp/modules/waffle0/index.php?t_m=ddcommon_view&id=28&t_dd=waffle0_data2)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------