

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592062
 研究課題名（和文） ヒルシュスプルング病の無神経節腸管の分子生理学からみた病態解析に関する研究
 研究課題名（英文） The molecular physiological analysis of aganglionic segment in Hirschsprung's disease

研究代表者
 秋吉 潤子（AKIYOSHI JUNKO）
 九州大学・大学病院・医員
 研究者番号：20380412

研究成果の概要：

消化管運動の最終的な組織である平滑筋について、Hirschsprung 病（以下 H 病）無神経節腸管ではこれまで着目されていなかった。そこで H 病モデルラットを用いて H 病無神経節腸管平滑筋の収縮特性について検討をおこなった。これまでに無神経節腸管平滑筋には Substance P（以下 SP）刺激による張力は低下しているが SP レセプターは正常に発現しているという報告がある。無神経節腸管平滑筋の SP に対する収縮特性について検討した。前述のように腸管を処理し、細胞内カルシウム濃度 張力の測定をおこなった。定常状態を 0%、高濃度カリウム溶液による脱分極による張力、細胞内カルシウムを 100% とした。正常腸管：SP 投与时張力 624.03%、 $[Ca^{2+}]_i$ 78.09%。Rho kinase inhibitor（Y-27632）前投与时張力 233.30%、 $[Ca^{2+}]_i$ 45.03%。無神経節腸管：SP 投与时張力 658.07%、 $[Ca^{2+}]_i$ 54.16%、Y-27632 前投与时張力 102.55%、 $[Ca^{2+}]_i$ 69.49%。正常腸管での SP による張力は 624% と有意に上昇したが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇度は変化がなかった。Y-27632 投与により、Rho kinase の関与する経路を遮断したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇度は変化せず、SP による張力のみが 233% に低下した。これにより H 病モデルラットの正常腸管収縮には Rho kinase が関与していることが判明した。次に Homo type の無神経節腸管では、SP 投与により 658% の張力がえられたが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認めなかった。Y-27632 を投与した場合には $[Ca^{2+}]_i$ は変化なく、張力は 102% に低下した。以上より無神経節腸管平滑筋の SP レセプター以下の収縮メカニズムは正常腸管と同様に Rho kinase を介した経路が存在することが判明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児外科

科研費の分科・細目：

キーワード：ヒルシュスプルング病、消化管平滑筋、細胞内カルシウム、Rho kinase、カルシウム感受性、生理学

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける Hirschsprung 病では、高度の排便障害をきたす。この疾患の患者では、敗血症をともなう重症腸炎や経口摂取障害による栄養障害(機能的短腸症候群)を認め、時として生命維持が脅かされることもある疾患である。排便障害の原因は直腸から口側に伸びる神経節細胞の存在しない無神経節腸管の蠕動不全が原因であることは既知の事実である。

消化管では主に副交感神経系の迷走神経(コリン作動性)、交感神経(アドレナリン作動性)が筋層間神経叢(Auerbach plexus)、粘膜下神経層(Meissner plexus)、Cajal 細胞(ICC)に伝達物質を放出し、消化管平滑筋運動を制御している。Hirschsprung 病無神経節腸管では筋層間神経叢および粘膜下神経層が欠如しているために副交感神経線維および交感神経線維が筋層、粘膜下層を貫き、粘膜固有層にまで増生している。これらをいわゆる外来線維と呼んでいるが、この外来線維の中には non-adrenergic non-cholinergic(NANC)神経線維と呼ばれるもの混在している。壁内神経における NANC 神経線維の分布に関しては前述したように多くの報告がなされており、弛緩作用をもつ vasoactive intestinal peptide(VIP)、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide(PACAP)、gastrin-releasing peptide(GRP)、calcitonin gene-related peptide(CGRP)陽性神経線維は減少しており、収縮作用をもつ substance P、galanin 陽性神経線維も減少しているという報告がある。増加している神経線維として、neuropeptide Y(NPY)陽性神経線維があり、これは腸管では adrenergic fiber を反映しているとされ、血管平滑筋に対しては収縮作用を持つが、消化管平滑筋に対しては弛緩作用を持っている。

消化管平滑筋の弛緩を最も司るとされている NO を合成する Nitric oxide synthase(NOS)陽性線維はほぼ欠損していると報告されている。しかし、これらの NANC 神経伝達物質が無神経節腸管において、その病態にどのように関与しているかはいまだ明らかではない。Hirschsprung 病無神経節腸管の平滑筋にはムスカリンレセプター、Substance P レセプター、VIP レセプターが存在しており、レセプターそのものには異常がない可能性について示唆する報告がある。平滑筋弛緩作用物質である NO の作用は無神経節腸管では起こらないという報告が多く、1997 年に当施設の Kamimura らも Electrical Field Stimulation(EFS)を用いて薬理学・生理学的に無神経節腸管平滑筋が NO の制御を受けていないことを報告しており、一見、過剰に収縮したようにみえる無神経節腸管の病態の主要な原因ではないかといわれている。しかし、無神経節腸管平滑筋細胞に NANC 神経伝達物質レセプターが正常腸管と同様に発現しているとすれば、増生している外来神経線維に混在しているとされる NANC 神経伝達物質の作用はどうなっているのか? 外来神経からの放出以外にも NANC 神経伝達物質は血中にも存在しているので、これらの作用を多少は受けている可能性もある。

2. 研究の目的

今後、Hirschsprung 病の病態解明のために、カルシウム - 張力同時測定法およびその他の手法を用いる。無神経節腸管で分布異常が報告されており、さらに血中にも存在し、炎症によりそのレセプターが up regulation される平滑筋収縮物質 substance P (以下 SP) に着目し、今後の実験をすすめていく予定である。無神経節腸管平滑筋の Substance P に対する細胞内カルシウムおよび張力の変化を検討し、SP による平滑筋収縮細胞内情報伝

達機構が正常なメカニズムと異なっているのか、違いがないのかを明らかにしていく。もし、違いが見られた場合、レセプターの発現、レセプター以下の平滑筋収縮メカニズムに関するリン酸化の差異の有無について Western blot 法、PCR 法を用いて検討をする。

3. 研究の方法

使用動物

本実験では疾患モデルとして Hirschsprung 病モデルラット（自然発症エンドセリンB受容体遺伝子欠損ラット）を用いる。このラットは Wild type では Hirschsprung 病の病態を呈さないが、Homo type では無神経節腸管がみられ、Hirschsprung 病の病態を呈す

Wild type



Homo type



生理学的実験

生後約 4 週目の Hirschsprung 病モデルラットの結腸輪走筋平滑筋条片を作成し、細胞内カルシウム濃度と平滑筋張力を同時に測定し、その収縮特性を解析する。

実際の測定方法を以下に示す。

[結腸輪走筋平滑筋条片]

ラットを犠牲させ、その結腸を摘出する。摘出した結腸の粘膜と腸間膜を除去する。その標本を輪走筋方向に長さ 6 mm、幅 2 mm の条片を作成する。

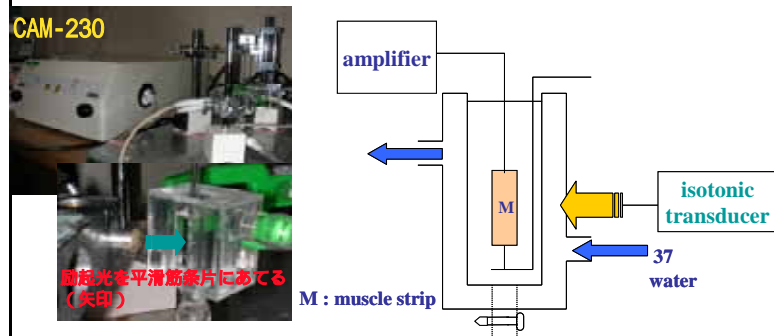
[細胞内カルシウム濃度 - 張力同時測定]

上記のごとく作成した平滑筋条片を蛍光カ

ルシウム指示薬 (Fura-2/AM) で、37 °C で 4 時間負荷させる。

平滑筋条片に 2 波長 (340nm と 380nm) の光を交互にあて、それぞれの蛍光反応の比を細胞内カルシウム濃度として捉えて測定することができる。

上記実験を Hirschsprung 病モデルラット (自然発症エンドセリンB受容体遺伝子欠損ラット) の Wild type (通常ラット) と Homo type (Hirschsprung 病の病態を呈するラット) の拡張部と狭小部で行い、細胞内カルシウム濃度と張力を比較検討し、その収縮特性の差異について解析する。



分子生物学的実験

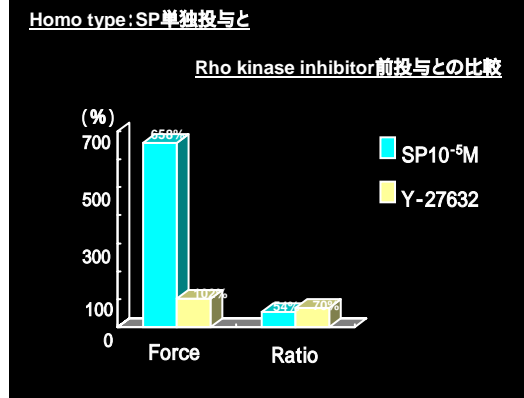
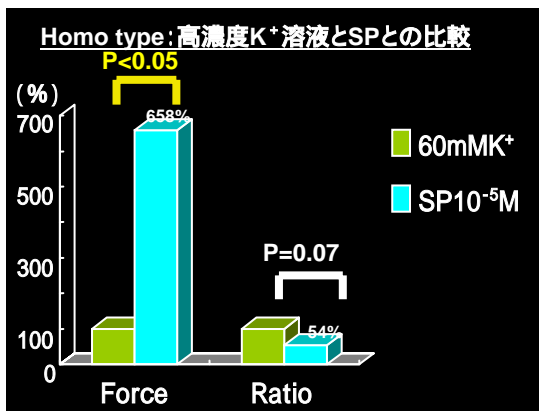
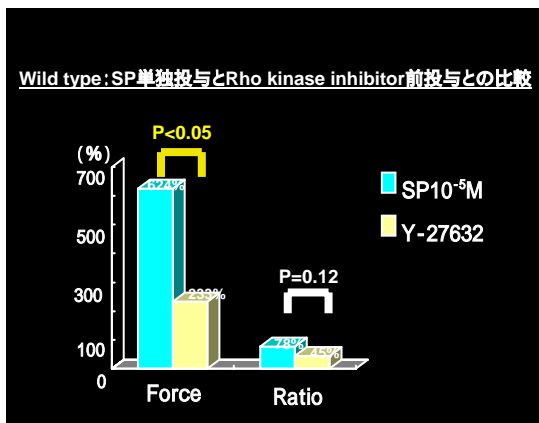
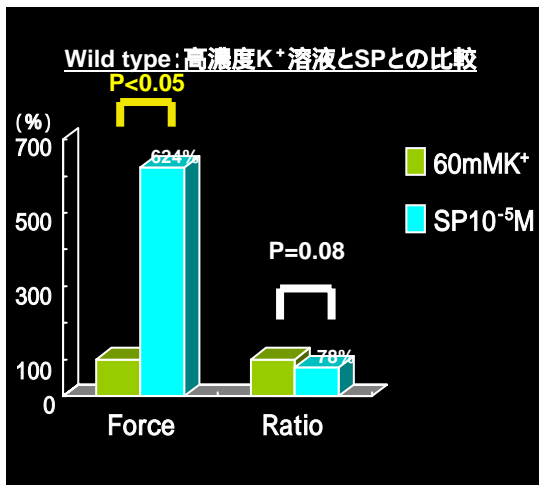
Hirschsprung 病モデルラットの Wild type の結腸、Homo type の拡張部および狭小部腸管の SP レセプターおよび、SP による収縮時の収縮メカニズムに関するタンパクのリン酸化を Western blot 法を用いて確認する。

4. 研究成果

前述のように腸管を処理し、細胞内カルシウム濃度 張力の測定をおこなった。

定常状態を 0%、高濃度カリウム溶液による脱分極による張力、細胞内カルシウムを 100% とした。正常腸管 : SP 投与時張力 624.03%、 $[Ca^{2+}]_i$ 78.09%。Rho kinase inhibitor (Y-27632) 前投与時張力 233.30%、 $[Ca^{2+}]_i$ 45.03%。無神経節腸管 : SP 投与時張力 658.07%、 $[Ca^{2+}]_i$ 54.16%、Y-27632 前投与時張力 102.55%、 $[Ca^{2+}]_i$ 69.49%。正常腸管での SP による張力は 624% と有意に上昇したが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇度は変化がなかった。Y-27632 投与により、Rho kinase の関与する経路を遮断したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇度は変化せず、SP による張力のみが 233% に低下した。これにより H 病モデルラットの正常腸管収縮には Rho kinase が関与していることが判明した。次に Homo type の無神経節腸管では、SP 投与により 658% の張力がえられたが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認めなかった。Y-27632 を投与した場合には $[Ca^{2+}]_i$ は変化なく、張力は

102%に低下した。以上より無神経節腸管平滑筋の SP レセプター以下の収縮メカニズムは正常腸管と同様に Rho kinase を介した経路が存在することが判明した。



Wild type では SP 刺激により低い[Ca²⁺]_i 上昇により、有意に高い張力がえられた。Homo type でも同様の結果であった。Wild type では Rho kinase inhibitor(Y-27632)により、[Ca²⁺]_i 上昇の低下を伴わない、有意な張力低下がみられた。Homo type でも同様の傾向がみられた。

Wild type、Homo type ともに SP 刺激にてカルシウム感受性が上昇する。Wild type、Homo type ともに Rho kinase を介した経路が SP 刺激による収縮メカニズムに参与している。無神経節腸管平滑筋の SP レセプター以下の収縮メカニズムは正常腸管平滑筋のそれと同様である可能性が示唆された。

以上の結果より、ヒルシュスプルング病の無神経節腸管では、平滑筋収縮メカニズムの主たるカルシウム流入経路である電位依存性カルシウムチャネルの発現低下により、カルシウムイオンの流入が関与しない Rho kinase を介した経路が代償的に活性化されている可能性が考えられた。

この研究結果より、ヒルシュスプルング病の無神経節腸管において、平滑筋収縮を引き起こす経路が作用していることが明らかとなったため、これらの経路に着目し、平滑筋収縮を引き起こす物質を投与すれば、無神経節腸管でも蠕動を引き起こすことができる可能性が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 16 件)

Nakatsuji T, Ieiri S, Masumoto K, Akiyoshi J, Taguchi T, et al, Intracellular calcium mobilization of the aganglionic intestine in the endothelin B receptor gene-deficient rat., *J Pediatr Surg*, 42(10), 1663-1670, 2007, 有
Masumoto K, Nakatsuji T, Taguchi T et al, Clinical features of selenium deficiency in infants receiving long-term nutritional support., *Nutrition*, 23(11-12), 782-787, 2007, 有
Matsuura T, Masumoto K, Ieiri S,

Akiyoshi J, Taguchi T et al, Morphological and physiological changes of interstitial cells of Cajal after small bowel transplantation in rats., *Transpl Int*, 20(7), 616-624, 2007, 有

Masumoto K, Taguchi T et al, Effectiveness of diaphragmatic repair using an abdominal muscle flap in patients with recurrent congenital diaphragmatic hernia., *J Pediatr Surg*, 42(12), 2007-2011, 2007, 有

Nagata K, Masumoto K, Taguchi T et al, Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice., *Pediatr Surg Int*, 23(10), 953-959, 2007, 有

Masumoto K, Taguchi T et al, Risk factors for sensorineural hearing loss in survivors with severe congenital diaphragmatic hernia., *Eur J Pediatr*, 166(6), 607-612, 2007, 有

Masumoto K, Taguchi T et al, Improvement in the QOL using both Bianchi's procedure and the closure of a jejunostomy in a case with short bowel syndrome., *Pediatr Surg Int*, 23(3), 285-288, 2007, 有

Tsukimori K, Masumoto K, Morokuma S, Yoshimura T, Taguchi T et al, The lung-to-thorax transverse area ratio at term and near term correlates with survival in isolated congenital diaphragmatic hernia., *J Ultrasound Med*, 27, 707-713, 2008, 有

Oda Y, Kohashi K, Yamamoto H, Tamiya S, Kohno K, Kuwano M, Iwamoto Y, Tajiri T, Taguchi T, Tsuneyoshi M, Different expression profiles of Y-box-binding protein-1 and multidrug resistance-associated proteins between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma., *Cancer Sci*, 99(4), 726-732, 2008, 有

Morioka T, Hashiguchi K, Yoshida F, Matsumoto T, Masumoto K, Taguchi T, Sasaki T, Neurosurgical management of occult spinal dysraphism associated with OEIS complex., *Childs Nerv Syst*, 24, 723-729, 2008, 有

Taguchi T, Current Progress in Neonatal Surgery (Review Article)., *Surg Today*, 38, 379-389, 2008, 有

Kusuhara K, Saito M, Sasaki Y, Hikino S, Taguchi T et al, An echovirus type 18 outbreak in a neonatal intensive care unit., *Eur J Pediatr*, 167, 587-589,

有

Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Oshiro Y, Izumi T, Taguchi T, Tsuneyoshi M, SMARCB1/INI1 protein expression in round cell soft tissue sarcoma associated with chromosomal translocations involving EWS: A special reference to SMARCB1/INI1 negative variant extraskeletal myxoid chondrosarcoma., *Am J Surg Pathol*, 32, 1168-1174, 2008, 有

Ochiai M, Nakayama H, Sato K, Iida K, Hikino S, Ohga S, Tsukimori K, Wake N, Masumoto K, Taguchi T, Hara T, Head circumference and long-term outcome in small-for-gestational age infants., *J Perinat Med*, 36, 341-347, 2008, 有

Hachisuga M, Tsukimori K, Hojo S, Hidaka N, Yoshimura T, Masumoto K, Taguchi T, Wake N, Prenatal diagnosis of a retroperitoneal lymphangioma: a case and review., *Fetal Diagn Ther*, 24, 177-181, 2008, 有

Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Takahira T, Takahashi Y, Tajiri T, Taguchi T et al, Alterations of RB1 gene in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma: special reference to utility of pRB immunoreactivity in differential diagnosis of rhabdomyosarcoma subtype., *J Cancer Res Clin Oncol*, 134, 1097-1103, 2008, 有

〔学会発表〕(計7件)

秋吉潤子、免疫抑制剤 FK506 が小腸移植グラフト腸管血流に与える影響に関する大動物を用いた実験的研究 腸間膜動脈平滑筋の細胞質カルシウム濃度と張力変化からみた検討、第107回日本外科学会定期学術集会、2007/4/11-4/13、大阪府大阪市

秋吉潤子、FK506 がブタ小腸移植グラフト腸管の血流に与える影響に関する実験的研究 血管平滑筋細胞質カルシウム濃度と張力からみた検討、第44回日本小児外科学会学術集会、2007/5/31-6/2、東京

秋吉潤子、細胞内カルシウム動態からみた Hirschsprung 病モデルラット無神経節腸管の Substance P による収縮特性に関する研究、第37回日本小児消化管機能研究会、2007/2/18、愛知県大府市

秋吉潤子、Tacrolimus がブタ小腸移植グラフト腸管の血流に与える影響に関する実験的研究 血管平滑筋細胞質カルシウム濃度と張力からみた検討、第19回日

本小腸移植研究会、2007/3/10、北海道札幌市

秋吉潤子、直腸肛門内圧測定における反射誘発方法の相違による検討、第38回日本小児消化管機能研究会、2008/2/16、徳島県鳴門市

秋吉潤子、生体腎移植後に腹腔鏡補助下肛門形成術を施行した高位鎖肛の一例、第45回日本小児外科学会、2008/6/28-30、茨城県つくば市

Akiyoshi J、Mechanism of Rho-kinase mediated Ca^{2+} independent contraction in aganglionic smooth muscle of Hirschsprung's disease model rat、41th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons、2008/6/29-7/3、Jackson, Wyoming, USA

〔図書〕(計 1 件)

増本幸二 水田祥代他、医学書院、医師のための臨床栄養学、2007

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋吉 潤子 (AKIYOSHI JUNKO)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：20380412

(2)研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI TOMOAKI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20197247

増本 幸二 (MASUMOTO KOUJI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20343329

家入 里志 (IEIRI SATOSHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00363359

中辻 隆徳 (NAKATSUJI TAKANORI)

九州大学・医学研究院・寄付講座助教

研究者番号：90448423

宗崎 良太 (SOUZAKI RYOUTA)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10403990