

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03558

研究課題名(和文)過敏性と炎症を映す消化管興奮連携の可視化による病態解明と治療戦略の開拓

研究課題名(英文) Visualization of micro-coordination in the GI tract reflecting irritability and inflammatory reactions: Elucidation of pathological conditions and development of treatment strategy

研究代表者

中山 晋介(Nakayama, Shinsuke)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30192230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：消化管は多くの役割を果たすユニークな臓器である。栄養素の消化吸収とともに、中枢神経を含め多臓器へ影響を与える。基礎リズムを発生するカハル間質細胞ネットワークが、消化管の連携的興奮にも重要な働きをすることが明らかとなってきた。

そこで本研究では、応募者が開発した透析膜補強・微小電極アレイ法を用いて、消化管の時空間連携興奮を可視化することで、過敏性・炎症性の影響を研究した。5-HTは小腸ペースメーカー活動伝搬を促進し、一方、トリプトファンから腸内細菌が合成する還元剤3-IPAは抑制効果を示したので、その客観性を機械学習により検証中である。また、細胞内Caを指標として消化管各部位の特性を調べている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

応募者は独自に開発した透析膜補強・微小電極アレイ法を用いて、消化管の時空間連携興奮を記録し、疑似カラー画像とすることで可視化した。このビデオ画像をもとに、微小領域のペースメーカー活動が、計測領域外部から移動してくるか、それとも計測領域内部で発生するかのパターン分類を可能にした。そこで、現在発達中の機械学習・深層学習を導入して、応募者の分類の正確さを客観的に検証している。このような手法は、微小電極アレイでの時空間興奮連携の評価法として利用される可能性がある。また、腸内細菌酵素を介し誘導される3-IPAの抑制効果は、5-HTの作用と拮抗的に働くので、腸内細菌叢による消化管運動調節の可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The gastrointestinal tract is a unique organ that affects functions of multiple organs including CNS, as well as to digest and absorb nutrients. Recently, it become clearer that the network of interstitial cells of Cajal generating basal rhythmicity plays an important role in cooperating spatial excitation.

In the present study, we thus investigate the impact of hyper-sensitivity and inflammation by visualizing spatio-temporal coordination of pacemaker activity. We found that 5-HT facilitates propagation of pacemaker activity in the ileum, but a tryptophan-derived reducing agent 3-IPA suppresses its occurrence. The results suggested a reciprocal control of gut motility via changes in intestinal flora that synthesize 3-IPA from tryptophan. We are now objectively validating by machine learning. In addition, we measured muscular and neuronal $[Ca^{2+}]_i$ to reinforce the region-specific mechanisms of the gut, particularly in the ileum, proximal and middle/distal regions of the colon.

研究分野：内科学一般、消化器病学、生理学

キーワード：消化管 過敏性腸症候群 炎症性腸疾患 ペースメーカー 平滑筋 内在神経 微小電極アレイ 細胞内Ca

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。

1. 研究開始当初の背景

近年の日本では、社会ストレスを背景に過敏性腸症候群(IBS)と炎症性腸疾患(IBD)患者が急増し、医療現場での適切な対応が迫られる重要疾患となっている。これら疾患は、それぞれ機能的病態と器質性病態に分けられ、別々に捉えられてきた。しかし近年の遺伝子疫学研究は、IBS患者群にはセロトニン(5-HT)関連遺伝子(5-HT₃/4受容体、5-HT輸送体プロモータなどの)異常のほかに、サイトカイン(IL-6, IL-10, TNFなど)遺伝子異常者など様々な遺伝子異常が含まれることを明らかにした。この事実は、腸の過敏性と炎症には強い関連があることを裏付けると共に、多様な病態の存在を示唆する。

消化管は機能状況を反映し、滑らかで多様な運動を造り出す。教科書では、蠕動運動、分節運動などごく少数の用語で、その運動様式が形容されるが、これら限られた用語で実際に観察される運動を十分に表現できない。本研究の代表者を含め複数のグループが、消化管の協調的運動では、従来の「腸の法則」：壁内の神経回路協調による反射的運動だけでなく、内在するペースメーカー細胞群(カハール間質細胞:ICC)の連携的興奮が重要な役割を果たすことを指摘している。従って、遺伝子疫学研究などが示唆する過敏性・炎症の多様な病態は、ペースメーカー細胞の連携興奮にも様々な変化を惹起し、消化管運動を修飾すると考えられる。

2. 研究の目的

これまで研究代表者たちは、消化管の協調的な運動、興奮連携についての一連の研究を行った。最近では、ペースメーカー細胞電位の微小領域での伝搬様式が、いくつかパターン分類できることをビデオとして報告した。この連携・伝搬パターンは、蠕動や分節など、消化管の協調的運動の基礎を構築するもので、消化管の協調的運動には、壁内神経だけでなく「ペースメーカー細胞も共に働く」という概念の証明となった。

学問的背景と代表者達たちの研究の経緯から：

- (1) 生理的機能や病態を反映し多様な連携運動・興奮が創り出されるならば、逆にその基幹となるペースメーカー細胞などの動的連携を可視化し、発展中の画像解析技術を導入することで、消化管の機能状況や様々な病態を映すダイナミックな評価指標を創出できないか？
 - (2) 日本社会で増加する過敏性腸症候群や炎症性腸疾患の病態を、この連携性指標を介して評価することで、予防、診断、治療、創薬開発などへの応用へ繋げることができないか？
- という問いが生まれる。

研究代表者達は、消化管の多様な連携活動は、内在する神経だけでなく、ペースメーカー細胞や機能的合胞体平滑筋組織などの連携が重要な働きをすると考える。そこでマウスなどのモデル動物消化管組織における微小空間での時空間解析のために、透析膜を併用した低インピーダンス微小電極アレイ法を開発し、小腸ペースメーカー活動の時空間的連携をパターン分類した。本研究では、この独自技術をもとに、高ストレス日本社会で問題となっている過敏性腸症候群(IBS)・炎症性腸疾患(IBD)に関連するセロトニン(5-HT)など腸ホルモンや神経伝達物質および炎症性因子が、消化管組織の興奮連携へどのように影響するかを明らかにし、医療および社会に貢献したい。細胞内Ca²⁺は電気的活動に同期するので、興奮の時空間連携理解の補強としてその動態を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 電気興奮の時空間的計測：

低インピーダンスの8×8微小電極アレイ(MEA)を使用して、マウス消化管筋層(主に小腸と結腸)の発生する細胞外電位(フィールドポテンシャル)を微小領域(~1mm²・電極間距離=

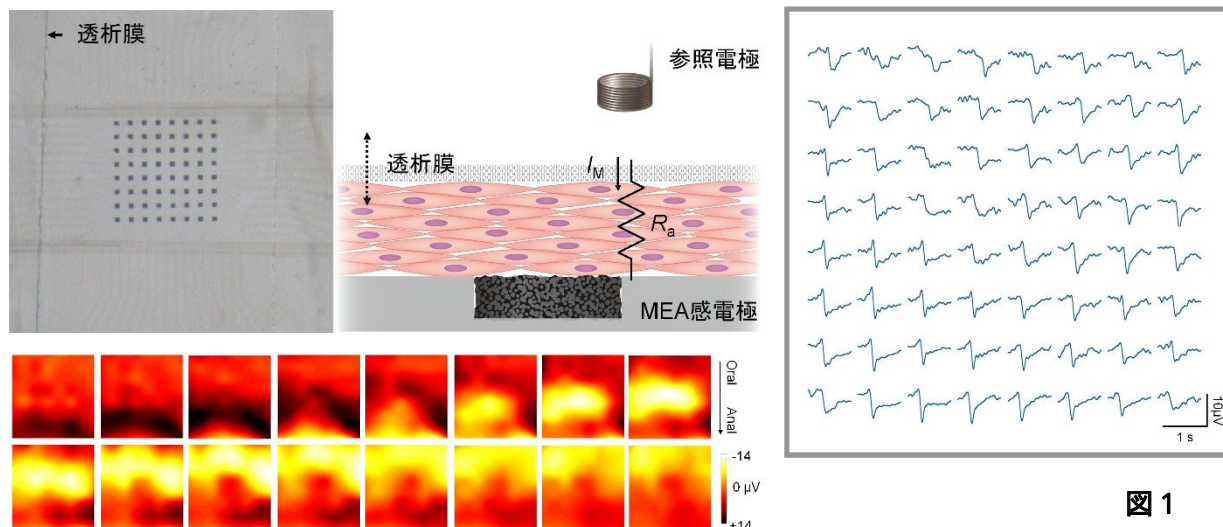


図1

150μm)で計測した。これは関心領域の細胞が発生する膜電流(I_M)が、MEA感電極と参照電極の

間のアクセス抵抗(R_a)を流れることで発生する電位($I_M \times R_a$)である。使用する電極（白金黒粒子で表面積拡大）の低インピーダンス特性を利用し、50 μm 四方の電極微小領域においても広帯域の電位変動を記録した。さらに透析膜下に固定することで、長時間電氣的に安定な計測(R_a 安定)を実現した（図1：マウス小腸筋層の発生するペースメーカー電位の時空間連携）。

各微小電極で記録される8 \times 8アレイデータをもとに、そのデータの各時点の電位強度を疑似カラーで再構築し、画像シリーズのように興奮連携・伝搬の様子を可視化した（図1下部）。8 \times 8のデータポイントは、50点でスプライン補間し、また各ポイント（電極）間の感度差は信号のリニアスペクトル強度を用いて補正し、滑らかな電位画像を作成した。この電位画像において、伝搬する細胞膜興奮領域（高輝度）と細胞間電流伝搬領域（低輝度）を特定し、電氣的伝導体の伝搬特性を解析した。

(2) 細胞内 Ca^{2+} の時空間モニタリング

消化管運動に参与する細胞群は、興奮時に細胞内 Ca^{2+} が上昇するので、補助指標とできる。そこで平滑筋と神経細胞に蛍光Ca指示タンパクを発現させたマウス[Parvalbmin-tetracycline transactivator::tetO-YC-Nano50 (PVYC)マウス及び Thy1-G6-2A-mCherry (Thy1-G6)マウス]の消化管を使用して、細胞内 Ca^{2+} 活動の時空間モニタリングを行った。

PVYCマウスの消化管では平滑筋に YC-Nano50 が発現するため、1波長励起2波長測定(図2)を行った(W-VIEW Gemini, Hamamatsu Photonics)。一方、Thy1-G6マウスでは壁内神経細胞に G-CaMP6 が発現するため、1波長励起1波長測定を行った。筋層標本の運動は画像追跡ソフトウェア(市販、及び自作)を使用して、縦走筋と輪走筋方向に分離して検出した。特に神経細胞において Ca^{2+} の経時変化を描出するとき、神経細胞の大きさに比べ運動による移動距離が大きいので、画像追跡して得た空間移動量をもとに ROI を補正して、正確な細胞内 Ca^{2+} 活動を検出した(研究成果に後述)。

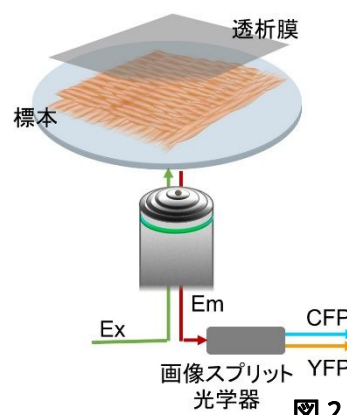


図2

4. 研究成果

(1) 電気興奮の時空間的計測：

小腸(マウス)筋層にはペースメーカー細胞がネットワーク状に分布している。そのペースメーカー活動の時空間連携を8 \times 8MEAを用いて計測し、疑似カラー化し画像解析した。その伝搬特性は以下の4つのパターンに分類できた(図3)。

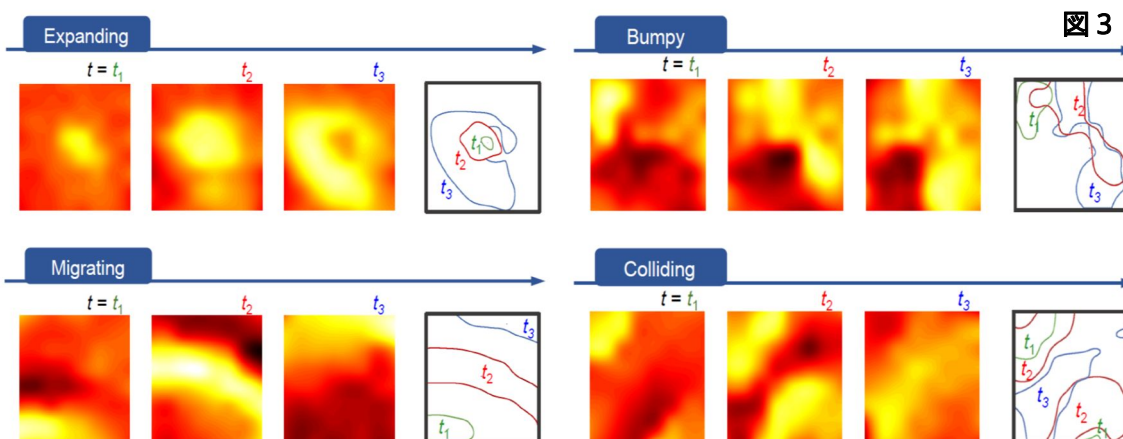
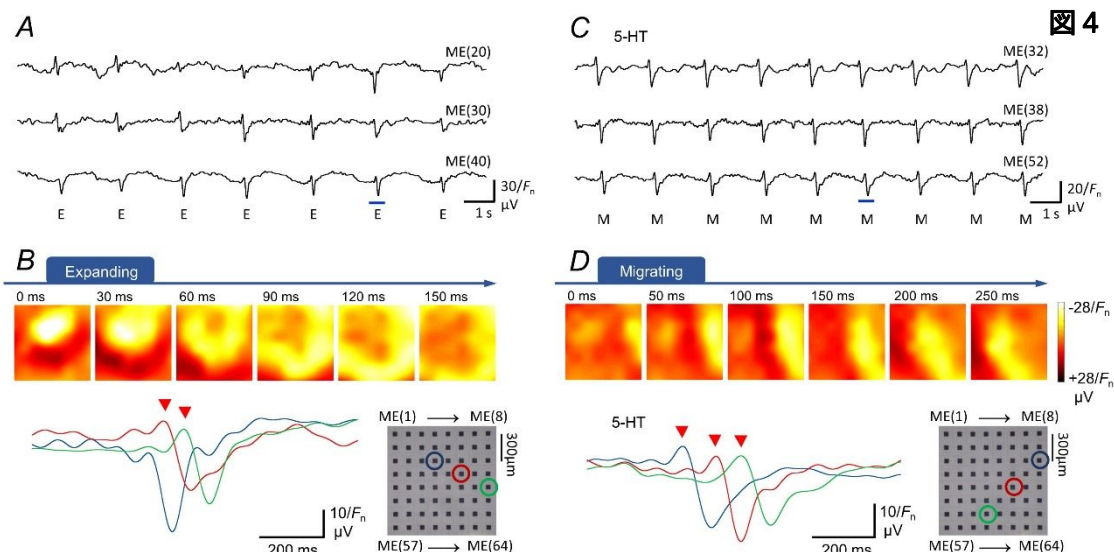


図3

Expanding と Migrating パターンは、ペースメーカー活動のその部分での発生と別の領域からの移動・伝搬する事象を表している。Bumpy/Aberrant パターンは伝搬が大きく不整合な微小領域活動で、局所的伝搬不全を示唆する。Colliding パターンは、MEA 領域で複数の活動が同時に観察され衝突/収束する。典型的な Expanding パターンは、拡大し後半にドーナツ状の形態に見える。一方、Migrating パターンでは横長の活動領域がその長軸とほぼ直交して伝搬する。

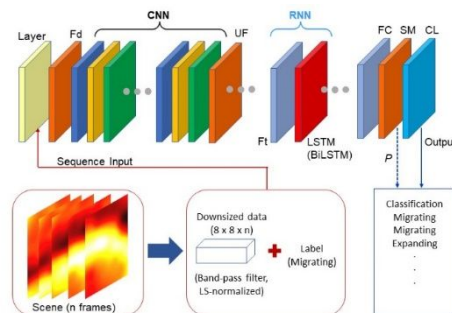
AI による客観的な評価を今後進めるため、MEA 観察領域で発生するペースメーカー活動を Expanding、MEA 観察領域外で発生し MEA 領域へ移動してきて観察される活動を Migrating と定義を簡略化して、セロトニン(5-HT)の効果を調べた。次ページの図4は、コントロールでの観察(A, B)の後に5-HTを投与(C, D)した1例を示す。ペースメーカー活動の活動頻度はコントロール時に1分間に20回程度であったが、5-HT投与により1分間に約5回程度上昇した。Migrating 活動と Expanding 活動の頻度差($F_M - F_E$)をパターン分布の指標としたところ、5-HT投与は、 $F_M - F_E$ の値を有意に上昇させた(A, Cのトレースにおいて、Expanding = E, Migrating =

M と表示)。この結果は、5-HT によるペースメーカ活動伝搬範囲の拡大を意味している。5-HT は蠕動のような協調的な運動を促進することが知られるが、ペースメーカ活動連携の促進は、腸



の協調的運動の滑らかな運動性に寄与する可能性がある。一方、腸内細菌の酵素で同じトリプトファンから合成される 3-IPA は、ペースメーカ電位発生を抑制した。腸内細菌を介した消化管運動の拮抗的な調節が示唆された。

パターン分類を現在のところ、擬似カラービデオによる観察で行っている。そこでこの分類結果の客観化のために、AI (深層学習) を応用した評価を試みている。ラベル付けにはビデオデータを人が見て決定する必要があるため、電極間を補間した大きなデータとなるが、機械学習でのニューラルネットワークのトレーニングには、 8×8 データアレイの数百ミリ秒程度のフレームでつくる 3 次元データとしてダウンサイズできる。ビデオ分類の標準的な構成である畳み込み及び再帰型ネットワーク(CNN, RNN)の組み合わせにより分類を行っている。予測分類の精度向上のために、回転・フリップによる強化学習、最適な畳み込み層パラメータ設定、時系列仕様の活性化層、データ信頼性による重みづけのための回帰層、不適合データ除去プロトコルなどの工夫を試行している。

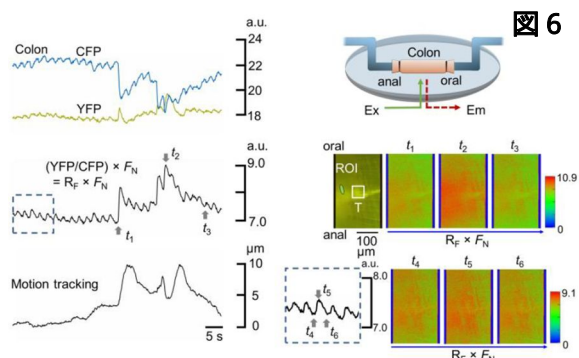


(2) 細胞内 Ca^{2+} の時空間モニタリング :

神経と平滑筋細胞の活動を、主に小腸・結腸において調べた。特に結腸平滑筋において部位依存的な細胞内 Ca^{2+} 活動と対応する運動が観察できた。結腸近位部の筋層標本では、約 4 秒周期に緩徐な Ca^{2+} オシレーションが発生し、それに連動した輪走筋方向への繰り返し運動があった。この周期はペースメーカ活動と考えられる。結腸の中部から遠位部では、現在も基礎メカニズムが解明されていない結腸伝搬性運動複合体(CMMC: Colonic Migrating Motor Complex)に相当する Ca^{2+} 活動が数十秒の周期で観察された。このとき同期して、主に縦走筋方向へ大きく運動した。この2つの運動の違いは、結腸近位部での塊形成と中部から遠位部での固形・反固形内容物の推進に相当する運動と考えられた。後者の運動は、蠕動というよりも、固形物の特性を利用し管を短くすることで内容物の位置を推進すると考えられた。

結腸筋層標本で神経細胞内 Ca^{2+} 活動 (細胞体部) を計測したところ、平滑筋の Ca^{2+} 活動と運動とは必ずしも同期しなかった (運動により Ca^{2+} 活動の評価が影響されないように、Template Matching 及び Image Registration で対象部位の移動を精密に評価し、運動により Ca^{2+} 活動の評価が影響されないように、 Ca^{2+} 活動計測の ROI を移動させて解析した)。CMMC 活動についてはさらに基礎メカニズムの追求が必要と考えられた。

管状の標本(内部に細胞外液)においても細胞内 Ca^{2+} 活動の記録に成功した(図 6 右上参照)。図 6 左には YC-Nano50 の FRET 蛍光 (上)、そのレシオ (YFP/CFP) (中) と同時計測された運動 (下) が示されている。ペースには約 4 秒周期の小さな Ca^{2+} オシレーションがあり、その後 CMMC 様の Ca^{2+} 活動が発生し、それに伴い収縮が発生している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwata, N., Takai, C., Mochizuki, N., Yamauchi, M., Kaji, N., Kasahara, Y., Nakayama, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Classification of Pacemaker Dynamics in the Mouse Intestine by Field Potential Microimaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics X:	6. 最初と最後の頁 1001111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biosx.2022.100111	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 Takai, C., Iwata, N., Kanemaru, K., Tanaka, K., Yu, Y., Iino, S., Nakayama, S.	4. 巻 364
2. 論文標題 Ratio-metric Measurement of Intracellular Calcium in Visceral Muscles via Selective Expression of a Yellow Cameleon Calcium Sensor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 131756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.snb.2022.131756	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 Yoshimaru, K., Yamaza, Y., Kajioka, S., Sonoda, S., Yanagi, Y., Matsuura, T., Yoshizumi, J., Oda, Y., Iwata, N., Takai, C., Nakayama, S., Taguchi, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Dental pulp stem cells as a therapy for congenital entero-neuropathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10077-3.	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 中山晋介	4. 巻 26
2. 論文標題 平滑筋組織のペースメーカー：管腔臓器はなぜ内容を輸送できるのか	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hormone Frontiers in Gynecology	6. 最初と最後の頁 177-184
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 無
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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山晋介, 岩田尚子, 高井千穂
2. 発表標題 セロトニンによるマイクロ領域ペースメーカー電位パターンの伝搬性変動
3. 学会等名 日本神経消化器病学会（第22回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山晋介, 埜村友香, 岩田尚子, 高井千穂
2. 発表標題 ペースメーカー活動マイクロ連携におけるイオンチャネル群の役割
3. 学会等名 日本神経消化器病学会（第23回）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山晋介, 岩田尚子, 高井千穂, 埜村友香
2. 発表標題 マイクロ領域での腸ペースメーカー興奮連携のパターン分類による解析
3. 学会等名 中部日本生理学会（第68回）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 于 堯, 中山 晋介, 高井 千穂, 岩田 尚子
2. 発表標題 NO作動性神経伝達作用を調べるための筋層の輪走・縦走方向収縮の計測
3. 学会等名 日本生理学会（第99回）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺本英己、中山晋介
2. 発表標題 高速MRIを利用したブドウ糖溶液摂取濃度の違いによる胃排出能の検討
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田 尚子、森下 博隆、高井 千穂、望月 直人、中山 晋介
2. 発表標題 透析膜下微小電極アレイ計測法による小腸筋層の電位活動パターン解析
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井千穂、山田尚那、岩田尚子、金丸和典、田中謙二、飯野哲、飯野正光、中山晋介
2. 発表標題 マウス結腸筋組織におけるカルシウムオシレーション複合体と収縮
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田尚子、高井千穂、中山晋介
2. 発表標題 小腸ペースメーカー電位の伝搬パターン解析
3. 学会等名 第66回中部日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山晋介、吉丸耕一朗、山座孝義、梶岡俊一
2. 発表標題 神経節細胞僅少症マウス結腸の時間空間的電気活動研究
3. 学会等名 第97回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中山晋介、岩田尚子、高井千穂	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 2
3. 書名 メディカルサイエンスダイジェスト 46/10	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者総覧 詳細 中山晋介 https://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/html/100001208_ja.html 研究者総覧 https://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/html/100001208_ja.html</p>

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	梶 典幸 (Kaji Noriyuki) (20779318)	麻布大学・獣医学部・助教 (32701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 治彦 (Suzuki Haruhiko) (90283431)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

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