

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20780206

研究課題名（和文） 胃食道逆流症モデル動物における食道運動の解析

研究課題名（英文） Studies on the esophageal motility in the gastroesophageal reflux disease-model animals

研究代表者

椎名 貴彦 (SHIINA TAKAHIKO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：90362178

研究成果の概要（和文）：

胃食道逆流症の病態と発症機序を解明する基礎的研究として、嘔吐する実験動物であるスunksを新たなモデル動物と位置づけて、その食道運動の制御機構を解析した。スunks食道筋層は横紋筋で構成されていること、横紋筋運動は外来神経（迷走）と内在神経によって制御されていることを明らかにした。さらに、食道運動を制御する神経系は逆流した酸によって活性化され、食道運動を異常化させる可能性を示した。今後、スunksを用いることにより、胃食道逆流症に関する研究がさらに発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the pathogenesis of Gastroesophageal reflux disease (GERD), the esophageal motility control in the house musk shrew (*Suncus murinus*), which is a new GERD-model animal. Morphological studies revealed that the inner and outer muscle layers of the shrew esophagus are entirely composed of the striated muscles. Functional examinations indicated that the esophageal motility in the shrew is regulated by both extrinsic (vagal) and intrinsic neurons. Reflux of acids might activate the esophageal neurons and then alter the motor activity. Future research using the shrew will explore issues of GERD further.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：獣医生理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：食道 胃食道逆流症 疾患モデル 神経 横紋筋

1. 研究開始当初の背景

食道は、消化管の入り口にあたり、摂取した食物を蠕動運動によって胃へと運ぶ器官である。そのため、食道の機能異常をもたらす疾患は、食物の摂取を妨げる原因

となり、健全な食生活を送る上で、大きなデメリットとなる。食道疾患の病態の解明と治療法の開発は、生活の質（QOL）の向上にとって、非常に重要である。

食道疾患には、食道狭窄、嚥下障害、ア

カラシア、巨大食道症、食道がんなど、様々なものがある。それらの中で、ヒトやコンパニオンアニマルで多く発生するようになり、問題となっている疾患のひとつが、胃食道逆流症 (Gastroesophageal Reflux Disease ; GERD) である。GERD は、胃内容物が頻回に食道内に逆流、もしくは食道内に長時間滞留することによって起こる疾患の総称である。

胃内容物の食道内への逆流が起こる要因はいくつか考えられる。ひとつは、胃液(酸)分泌の亢進である。ふたつめは、食道と胃の境界に存在する下部食道括約筋(LES)の機能不全である。胃内容物の逆流は、LESが収縮することによって阻止されているが、この括約筋の収縮力が低下することによって胃内容物の逆流が容易になってしまう。3つめは、食道クリアランスの低下である。胃内容物の逆流は生理的にも起こることがあるが、その際には、下部食道の蠕動や、食道腺からの分泌物、唾液によって胃内容物を食道から胃に「押し戻す」。この機能が低下することで、胃内容物の頻回の逆流や停滞が起こることがある。すなわち、GERDが起こる背景には、胃酸過多といった胃内容物そのものの増加に加えて、「食道運動の異常」があげられる。

また、GERDは、従来、胃酸が食道粘膜を物理的に刺激することで下部食道にびらん潰瘍性病変が生じる疾患(いわゆる「逆流性食道炎」と単純に考えられてきた。しかし、明瞭な肉眼病変がないにも関わらず、酸に対する高い感受性を示す「非びらん型」逆流症が報告され、これは「食道粘膜上に分布する知覚神経の異常過敏」が疑われる。すなわち、GERDには、胃酸の逆流に加えて、「食道を支配する神経系の異常」も関与する可能性がある。

GERDの病態は、実際のGERD患者を調べた臨床研究から説明しているものがほとんどであり、GERD患者で見られるLESや食道神経系の「異常」がGERDの原因なのか、それとも結果なのか、実はよくわかっていない。また、食道炎の症状が進行するのに従って、食道運動や知覚神経の反応性がどのように変化していくのか(経過)も明らかでない。さらに、正常な哺乳動物の食道運動および神経系に対して胃内容物の逆流がどのような影響を与えるのかを検討した研究もほとんど見当たらない。すなわち、発症機序を明らかにするための基礎的な研究は非常に少ないと言える。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では、食

道運動とそれを制御する筋細胞および神経系の機能に注目して、GERDの病態や発症機序解明の基礎的知見を得ることを目的とした。まず、胃液の主成分である酸に暴露された食道筋の運動および神経系の反応を解析することで、胃内容物の逆流が食道機能に与える影響を調べた。

さらに本研究では、新たなGERD疾患モデル動物の確立も目指した。現在汎用されているラットやマウスなどのげっ歯類は、ヒトやイヌ、ネコと異なり、嘔吐しないという特徴がある。そのため、げっ歯類を用いた従来の実験を疑問視する研究者もいる。嘔吐現象と胃内容物の逆流には関係があることは容易に予想できるため、GERDの病態解明や治療法の開発には、嘔吐する実験動物を応用することが有利であると考えられる。そこで、本研究では、生理的に嘔吐する能力を持つ実験動物として知られるスunks(ジャコウネズミ)を新たなGERDモデル動物として位置づけ、その食道運動の制御機構を調べることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 食道運動の *in vitro* (*ex vivo*) 記録法

実験動物から食道を摘出し、図1に示したような実験装置に食道をセットした。食道を支配する迷走神経を電気刺激して食道標本の収縮運動を惹起させ、この運動を記録した。薬物投与前後で食道運動がどのように変化(増強または抑制)するのかを調べた。そうすることによって、酸暴露による食道の運動性の変化を同定した。また、様々な神経伝達物質の阻害薬や促進薬を用いることにより、食道運動の制御機構に関与する神経系を解明した。

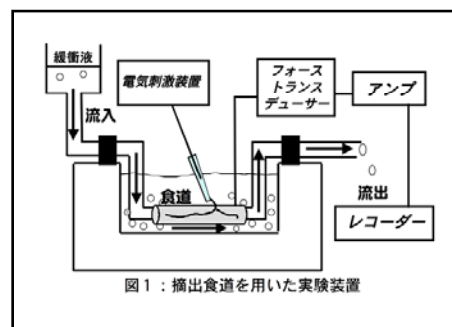


図1: 摘出食道を用いた実験装置

(2) 組織学的検索

HE染色によって食道筋層の構造を解析した。また、免疫染色を行うことで、食道を支配する神経系を同定した。

4. 研究成果

○研究の主な成果

(1) 酸暴露の食道運動機能に対する影響

胃内容物成分の急性暴露モデルとして、摘出食道標本への酸暴露を試みた。

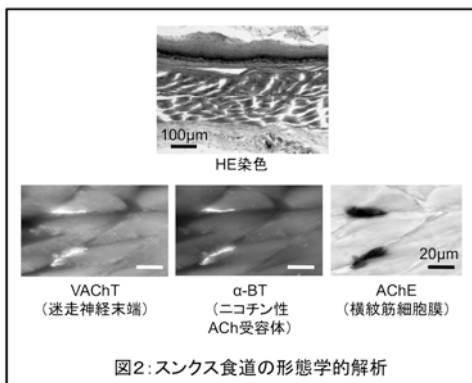
ラットおよびマウスから食道を摘出し、食道を支配する迷走神経を電気刺激して食道標本の収縮運動を惹起させた。胃内容物の逆流を想定して、食道へ酸性緩衝液を投与したところ、まず、食道運動の抑制反応が引き起こされた。さらに、強酸性条件下では、食道筋の収縮反応が誘発された。この結果は、酸は食道運動の異常化を誘導することを示唆しており、胃食道逆流症の症例で見られる食道運動不全の一因であることが考えられる。

(2) 新たな GERD モデル動物における食道運動の制御機構の解明

嘔吐する実験動物として知られるスunksを新たな GERD モデル動物と位置づけ、その食道運動を制御する仕組みを形態学および機能学的に解析した。

① スunks食道の形態学的特徴

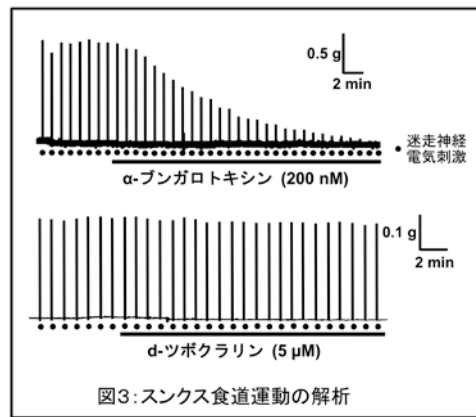
HE染色および免疫染色により、スunks食道の筋細胞および神経系を形態学的に解析した。スunksの食道は、ラットやマウスと同じく横紋筋で構成されていること、食道筋は迷走神経の支配を受けていること、さらに、主な神経伝達物質としてアセチルコリンを用いていることを形態学的に明らかにした (図2)。



② スunksの食道運動を支配する神経系

図1に示したような実験系を用いて、スunksの食道運動に関わる神経成分を調べた。スunks食道に分布する迷走神経を電気刺激したところ、食道標本の収縮運動が惹起された。この反応は、神経筋接合部の遮断薬で阻害された (図3)。この結果は、スunks食道筋は、迷走運動神経によって支配されていることを示

唆している。



③ スunksの食道筋細胞の特性

スunksの食道筋は、形態学的に横紋筋であり、この特徴は、ラットやマウスと類似していた。一般的に、横紋筋の収縮反応は、神経筋接合部の遮断薬であるd-ツボクラリンで容易に阻害できる。しかしながら、スunks食道横紋筋の収縮反応性は、ラットやマウスにおける有効濃度のd-ツボクラリンでは阻害されなかった (図3)。これは、スunks食道筋細胞上の受容体の薬理学的特徴が、ラットやマウスとは異なっていることを意味しており、スunks食道筋細胞の種特異性が示唆された。

④ スunksの食道運動に対する感覚神経刺激薬の効果

スunksの食道運動を制御する神経成分、特に胃食道逆流に関わる神経回路について調べた。迷走神経を電気刺激したところ、食道標本の収縮運動が惹起された。この収縮反応は、感覚神経の刺激薬であるカプサイシンによって抑制された。カプサイシンは酸と共通の受容体を活性化することから、スunks食道には、逆流した酸の食道への暴露によって運動を減弱させる神経回路が存在する可能性が示唆された。

⑤ 食道運動の制御系に関与する抑制性神経成分

消化管運動における主な抑制性神経伝達物質である一酸化窒素 (NO) が、前述した神経回路 (結果④) に関わると予想して、薬理学的実験を行った。NO合成酵素の阻害薬をあらかじめ処置しておいたところ、カプサイシンによる抑制効果が減弱した。このことは、スunks食道運動はNO作動性神経による制御を受けており、逆流した酸がNO神経を活性化して、食道運動を異常化する

る可能性が示唆された。

○得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究により、嘔吐する実験動物であるスunksの食道運動の基本的な制御機構が解明された。ラットやマウスといったげっ歯類（嘔吐できない）以外の動物において食道実験系を確立したインパクトは大きい。また、スunksは、GERDのみならず、他の食道疾患のモデル動物となる可能性も秘めており、国内外の食道（疾患）研究の発展に寄与できると思われる。

○今後の展望

スunksを用いることにより、GERDの発症機序や病態に関する研究がさらに発展することが期待される。このことは、食道運動や神経系をターゲットとした新たなGERD治療法の開発にも貢献するものである。

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6件）

- (1) Boudaka, A., Wörl, J., Shiina, T., Shimizu, Y., Takewaki, T., and Neuhuber, W.L.: Galanin modulates vagally induced contractions in the mouse esophagus. *Neurogastroenterol. Motil.* 21: 180-188, 2009 査読有
- (2) Hempfling, C., Seibold, R., Shiina, T., Heimler, W., Neuhuber, W.L., Wörl, J.: Enteric co-innervation of esophageal striated muscle fibers: A phylogenetic study. *Auton. Neurosci.* 151: 135-141, 2009 査読有
- (3) Shiina, T., Shima, T., Hirayama, H., Kuramoto, H., Takewaki, T. and Shimizu, Y.: Contractile responses induced by physalaemin, an analogue of substance P, in the rat esophagus. *Eur. J. Pharmacol.* 628: 202-206, 2010 査読有
- (4) Shiina, T., Shima, T., Masuda, K., Hirayama, H., Iwami, M., Takewaki, T., Kuramoto, H., Shimizu, Y.: Contractile properties of esophageal striated muscle: comparison with cardiac and skeletal muscles in rats. *J. Biomed. Biotech.* vol. 2010, Article ID 459789, 7 pages, 2010 査読有
- (5) Shiina, T., Shima, T., Wörl, J., Neuhuber, W.L., Shimizu, Y.: The neural regulation of the mammalian

esophageal motility and its implication for esophageal diseases (review). *Pathophysiology.* 17: 129-133, 2010 査読有

- (6) Iwami, M., Shiina, T., Hirayama, H., Shima, T., Takewaki, T., Shimizu Y.: Inhibitory effects of zingerone, a pungent component of *Zingiber officinale* Roscoe, on colonic motility in rats. *J. Nat. Med.* 65: 89-94, 2011 査読有

〔学会発表〕（計12件）

- (1) 椎名貴彦, 嶋 剛士, バウダカ アッマール, 武脇 義, 志水泰武: ラット食道粘膜炎筋板平滑筋の収縮を制御する神経伝達物質. 第55回中部日本生理学会大会(愛知), 2008
- (2) 椎名貴彦, 嶋 剛士, 武脇 義, 志水泰武: ラット食道運動におけるカプサイシン感受性神経の役割. 第19回日本病態生理学会大会(埼玉), 2009
- (3) Shiina, T., Shima, T., Hirayama, H., Boudaka, A., Wörl, J., Neuhuber, W.L., Takewaki, T. and Shimizu, Y.: Modulatory actions of tachykinins on the striated and smooth muscle motility in the rat esophagus. The XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) (Kyoto, Japan), 2009
- (4) Shiina, T., Wörl, J., Neuhuber, W.L., Shima, T., Takewaki, T. and Shimizu, Y.: Neuronal regulation of the esophageal motility in *Suncus murinus* (a house musk shrew). 6th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN 2009) (Sydney, Australia), 2009
- (5) 椎名貴彦, Jurgen Wörl, 平山晴子, 嶋剛士, Winfried Neuhuber, 武脇義, 志水泰武: スunks (*Suncus murinus*) 食道運動における神経性制御. 第148回日本獣医学会学術集会(鳥取), 2009
- (6) 椎名貴彦, 平山晴子, 嶋剛士, 志水泰武: 嘔吐する小型実験動物スunksの食道筋構造と神経支配. 第20回日本病態生理学会大会(奈良), 2010
- (7) 椎名貴彦, 嶋剛士, 藏本博史, 武脇義, 志水泰武: スunks食道の形態学および薬理学的特徴. 第82回日本薬理学会年会(大阪), 2010
- (8) 椎名貴彦, 武脇義, 志水泰武: ラット食道横紋筋の収縮特性および内在神経系による運動調節機構. 第149回日本獣医学会学術集会(東京), 2010
- (9) 椎名貴彦, 中森智昭, 平山晴子, 嶋剛士,

- 藏本博史, 志水泰武: 新生子ラット食道筋に対する神経支配および収縮制御機構. 第 87 回日本生理学会大会 (盛岡), 2010
- (10) 椎名貴彦, Jürgen Wörl, Winfried Neuhuber, 嶋剛士, 志水泰武: ハムスター食道横紋筋における神経筋接合部の形態および機能的特徴. 第 150 回日本獣医学会学術集会 (帯広), 2010
- (11) 椎名貴彦: 嘔吐する小型実験動物スunks (*Suncus murinus*) の食道の特徴 日本病態生理学会第 2 回サテライトセミナー (神戸), 2011
- (12) 椎名貴彦, 嶋剛士, 藏本博史, 志水泰武: 局所神経経路によるラット食道横紋筋運動に対する抑制性制御 第 88 回日本生理学会大会 (誌上にて開催), 2011

[その他]

ホームページ等

http://www1.gifu-u.ac.jp/~yshimizu/physiology/top_page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎名 貴彦 (SHIINA TAKAHIKO)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 90362178

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: