

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16964

研究課題名（和文）消化管蠕動運動における内因性ドパミンの新規制御機構の解明

研究課題名（英文）Roles of endogenous enteric dopamine in regulating gastrointestinal peristaltic contractions

研究代表者

中森 裕之（Nakamori, Hiroyuki）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：60824349

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラットの摘出近位結腸標本を用いて蠕動運動におけるドパミン神経の役割を調べた。D1様受容体拮抗薬およびドパミン神経毒の適用は蠕動運動の発生を阻害した。免疫組織化学的検査では、D1様受容体は一酸化窒素作動性およびコリン作動性神経に発現し、平滑筋細胞やカハールの間質細胞、PDGFR陽性細胞には発現していなかった。ドパミン再取込阻害薬によりシナプス間隙のドパミン量を増やすことで認められる弛緩作用は、一酸化窒素合成酵素阻害薬により抑制されるため、ドパミン神経のターゲットは主に一酸化窒素作動性神経であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、消化管内ドパミンが大腸の蠕動運動に関与すること、ドパミン神経の機能を抑制すると運動が阻害されることを明らかにし、消化管ドパミン神経の変性を認めるパーキンソン病患者における便秘の発生機序の一端を解明した。慢性的に末梢のドパミンを枯渇させても代償機構により蠕動運動は回復するため、パーキンソン病患者の便秘の初期には消化管神経系が、その後中枢神経系が関与していると示唆される。この知見は消化管運動障害の治療戦略に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Roles of dopaminergic neurons in peristaltic contractions were investigated using isolated colonic segments of rats. Application of the D1-like receptor antagonist or the dopaminergic neurotoxin inhibited the generation of colonic peristalsis. In sections of rat proximal colon, D1-like receptors were expressed in nitrergic and cholinergic neurons but not smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal or PDGFR-positive cells. The dilatatory effect of the dopamine reuptake inhibitor that would increase synaptic dopamine concentrations was inhibited by nitric oxide synthase inhibitors, suggesting that enteric dopaminergic neurons project to nitrergic neurons.

研究分野：消化管運動

キーワード：近位結腸 ドパミン神経 蠕動運動 パーキンソン病 D1様受容体 消化管壁内神経系 SCH23390

1. 研究開始当初の背景

ドパミン神経が変性するパーキンソン病患者において、便秘は 70-80%の症例で認められ、運動症状発症前の前駆期から起こることから、ドパミン神経が消化管運動制御において重要な役割を果たしていると考えられる。パーキンソン病患者では、脳内ドパミン神経の変性のみならず、消化管壁内神経系のドパミン神経も変性することが知られているが、消化管ドパミン神経の変性と便秘症状との因果関係は明らかではない。

ドパミン神経変性により便秘が起こることからは、ドパミン神経が消化管蠕動運動を促進させることが示唆される。しかしながら我々は、ラット近位結腸においてドパミン D1 様受容体の拮抗薬による阻害および外因性ドパミンによる活性化が共に蠕動運動の抑制を導くことを明らかにした。

これまで、ドパミンの大腸平滑筋切片に対する弛緩作用は非神経性であること、D1 受容体は大腸平滑筋に発現していることが示唆されていたため、ドパミンは平滑筋細胞に直接作用していると考えられていた。しかしながら、以前の研究は核マーカーである DAPI との二重染色をしており、平滑筋細胞、カハールの間質細胞、platelet derived growth factor receptor- (PDGFR) 陽性細胞の区別はできていなかった。我々は平滑筋マーカーである α -smooth muscle actin を使用することで、平滑筋自体には D1 受容体が発現していないことを明らかにした。この結果を受けて、ドパミンがカハールの間質細胞もしくは PDGFR 陽性細胞に作用している可能性が浮上した。

2. 研究の目的

以前の我々の検討から、ラット近位結腸において内因性ドパミンは D1 様受容体を介して促進的に蠕動運動を調節していることが示唆された。消化管平滑筋切片による収縮実験において D1 様受容体拮抗薬による収縮増強作用はテトロドトキシン非感受性であることから、非神経性の作用であると考えられている。これに一致して、本実験系における D1 様受容体拮抗薬による非伝播性持続収縮はテトロドトキシン存在下でも認められた。D1 受容体は平滑筋に発現していないことから、カハールの間質細胞もしくは PDGFR 陽性細胞が内因性ドパミンによる蠕動制御機構において重要な鍵を握ると考えられる。

そこで本研究計画では、『消化管運動における内因性ドパミンの標的細胞を同定し、その細胞を介した消化管運動調節機序を明らかにする』ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的手法

カハールの間質細胞 (c-kit 抗体)、PDGFR 陽性細胞 (PDGFR 抗体)、コリン作動性神経 (ChAT 抗体) もしくは一酸化窒素 (NO) 作動性神経 (nNOS 抗体) に特異的なマーカーを用いて、近位結腸における D1 受容体発現細胞を同定した。ドパミン神経が標的細胞に投射していることを、ドパミン輸送体 (DAT) 抗体を用いて確認した。

(2) ビデオイメージング法

ラット近位結腸の摘出標本を用いてビデオイメージングによる蠕動運動の解析を試みた。内因性ドパミンの

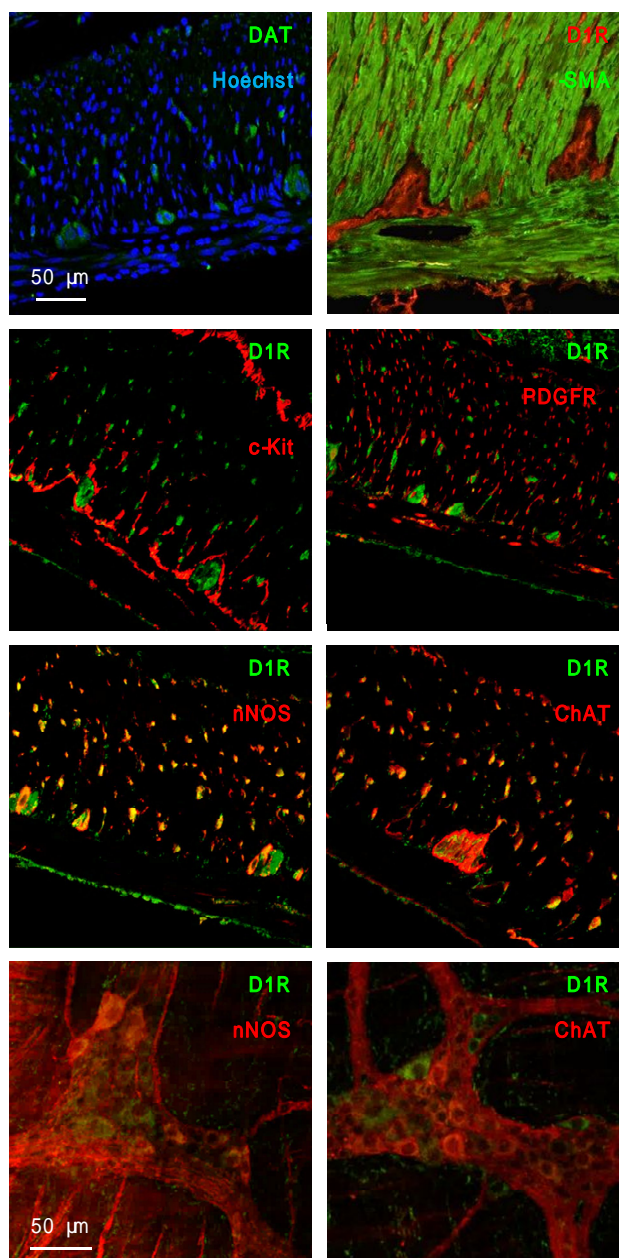


図 1. ラット近位結腸における D1 受容体の分布

効果を検討するために、ドパミン再取込阻害薬である GBR 12909 を使用した。

(3) 末梢ドパミン枯渇ラット作製

腸管神経内のドパミンを枯渇させ、パーキンソン病様の状態を作成し、コントロールの蠕動運動と比較した。また、消化管 D1 様受容体が構成的活性化受容体であるかを調べるために、6-hydroxydopamine (6-OHDA) 処理した標本を用いて蠕動運動を測定後、D1 様受容体拮抗薬の作用の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) ラット近位結腸における D1 受容体の分布

ラット近位結腸切片において、D1 受容体はカハールの間質細胞および PDGFR 陽性細胞に発現していなかった。一方、ラット近位結腸切片およびホルマウント標本において、コリン作動性神経と NO 作動性神経に D1 受容体が発現していた (図 1)。

(2) 蠕動運動における内因性ドパミンの役割

ドパミン再取込阻害薬 GBR 12909 によりシナプス間隙のドパミン量を増やすと、最大腸管径の増加が認められた。この GBR 12909 による弛緩作用は、NO 合成酵素阻害薬の L-nitro arginine (L-NA) もしくは神経毒であるテトロドトキシンの前投与で阻害された。また、D1 様受容体拮抗薬 SCH 23390 は蠕動頻度を減少させ、最大腸管径を小さくさせた。GBR 12909 の作用は NO ドナーである sodium nitroprusside を適用した時と類似しており、SCH 23390 の作用は L-NA の作用と同様であった (図 2)。

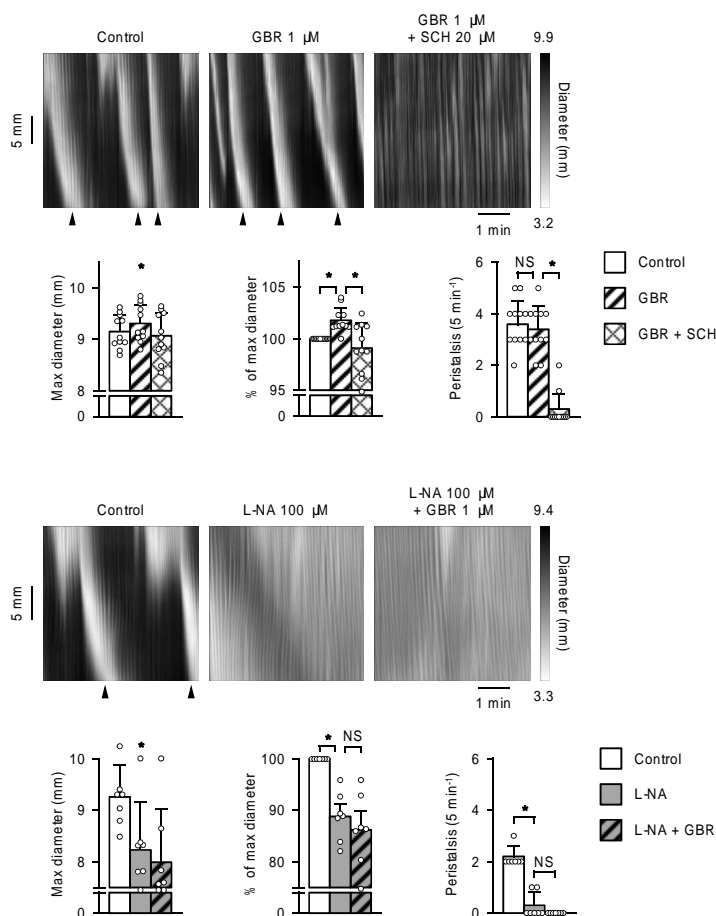


図 2. 蠕動運動における内因性ドパミンの役割

D1 様受容体拮抗薬 SCH 23390 の収縮作用は、NO 合成酵素阻害薬およびテトロドトキシンを前投与しても発揮された。

血管作動性腸ペプチド (VIP) 神経およびプリン作動性神経も結腸において弛緩作用を示すので、拮抗薬を用いてドパミン作動性神経との関連を検討した。VIP 受容体拮抗薬の VIP10-28 および P2Y1 受容体拮抗薬の MRS 2500 は GBR 12909 の弛緩作用および SCH 23390 の収縮作用を阻害しなかった。

これらの結果から、消化管ドパミン神経のターゲットは NO 作動性神経であることが明らかになった。ドパミンは非伝播性持続収縮を抑制することで、律動的な蠕動運動の発生を促していると考えられた。また、非神経細胞に発現する消化管 D1 様受容体が発現しなくても活性化状

態にある構成的活性化受容体の可能性が示唆された。

(3) ドパミン枯渇標本におけるドパミン再取込阻害薬および D1 様受容体拮抗薬の効果

摘出結腸標本にドパミン神経毒である 6-OHDA を 3 時間適用すると蠕動運動の頻度が低下した。その後、GBR 12909 を投与しても無効であったが、SCH 23390 は腸管径を減少させた(図 3)。

6-OHDA を週 1 回、計 3 回腹腔内投与し慢性的に末梢のドパミンを枯渇させたラットを作製した。6-OHDA 処置ラットから摘出した結腸標本は生理食塩水処置ラットの標本と同様な蠕動運動を示した。6-OHDA 処置ラットの摘出標本では、GBR 12909 の弛緩作用は認められなかったが、SCH 23390 の収縮作用は維持されていた。

以上の結果から、ドパミンが無くても活性化されている構成的活性化受容体の D1 様受容体が存在していることが明らかとなった。また、消化管ドパミン神経が機能しなくなっても、代償性機構により蠕動運動は回復することが示唆された。

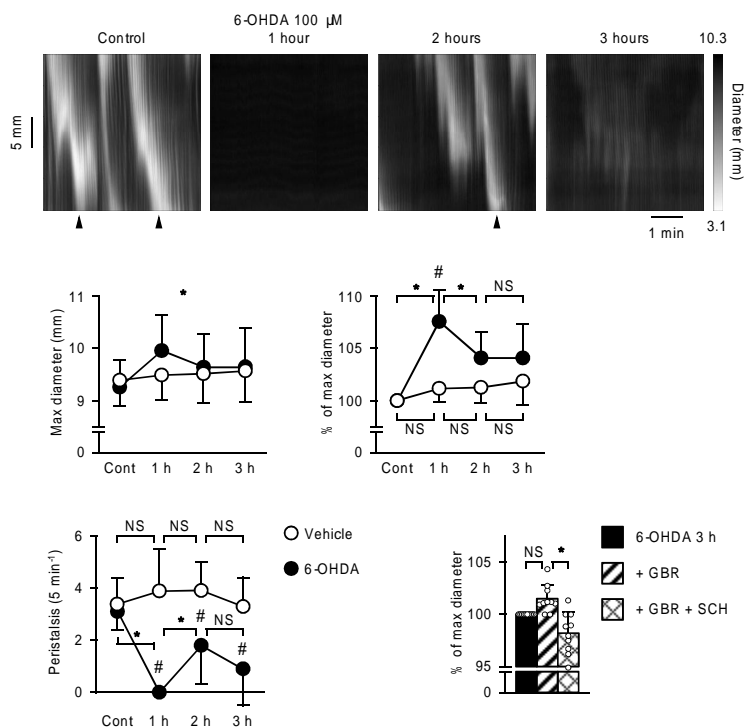


図 3. ドパミン枯渇標本におけるドパミン再取込阻害薬および D1 様受容体拮抗薬の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamori Hiroyuki, Hashitani Hikaru	4. 巻 475
2. 論文標題 Neural targets of the enteric dopaminergic system in regulating motility of rat proximal colon	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1315 ~ 1327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-023-02849-1	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Nakamori Hiroyuki, Iida Koji, Hashitani Hikaru	4. 巻 321
2. 論文標題 Mechanisms underlying the prokinetic effects of endogenous glucagon-like peptide-1 in the rat proximal colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G617 ~ G627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00175.2021	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ueda Hiromi H., Naitou Kiyotada, Nakamori Hiroyuki, Horii Kazuhiro, Shiina Takahiko, Masatani Tatsunori, Shiraishi Mitsuya, Shimizu Yasutake	4. 巻 11
2. 論文標題 -MSH-induced activation of spinal MC1R but not MC4R enhances colorectal motility in anaesthetised rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80020-x	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Horii Kazuhiro, Ehara Yuka, Shiina Takahiko, Naitou Kiyotada, Nakamori Hiroyuki, Horii Yuuki, Shimaoka Hiroki, Saito Shouichiro, Shimizu Yasutake	4. 巻 599
2. 論文標題 Sexually dimorphic response of colorectal motility to noxious stimuli in the colorectum in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1421 ~ 1437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP279942	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakamori Hiroyuki, Noda Kenta, Mitsui Retsu, Hashitani Hikaru	4. 巻 33
2. 論文標題 Role of enteric dopaminergic neurons in regulating peristalsis of rat proximal colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology & Motility	6. 最初と最後の頁 e14127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nmo.14127	査読の有無 有
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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中森裕之、橋谷光
2. 発表標題 ラット近位結腸の運動制御に関わるドパミン機構の標的神経
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田裕康、中森裕之、三井烈、橋谷光
2. 発表標題 雌モルモット脛骨栄養動脈における神経性収縮に対する外因性セロトニンの作用
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中森裕之、新美敦子、橋谷光
2. 発表標題 リボ多糖によるグルカゴン様ペプチド1放出を介したラット近位結腸の蠕動運動促進作用
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三井烈、矢守瑞、中森裕之、橋谷光
2. 発表標題 ラット直腸細動脈の神経性収縮制御機構およびストレス負荷によるその変容
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中森裕之、橋谷光
2. 発表標題 Neural targets of dopamine in regulating motility of rat proximal colon
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中森裕之、飯田孝二、橋谷光
2. 発表標題 ラット近位結腸におけるグルカゴン様ペプチド1の蠕動運動亢進メカニズム
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中森裕之、三井烈、橋谷光
2. 発表標題 ラット近位結腸の蠕動運動制御におけるドパミンの機能解析
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中森裕之、野田拳汰、三井烈、橋谷光
2. 発表標題 ラット近位結腸の蠕動運動制御におけるドパミンの役割
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田孝二、中森裕之、橋谷光
2. 発表標題 ラット近位結腸におけるGLP-1投与による蠕動運動亢進メカニズム
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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