

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380157

研究課題名（和文） グレリンの脊髄排便中枢を介する大腸運動促進作用の機序と大腸運動障害への関与

研究課題名（英文） The spinal defecation center-mediated prokinetic effect of ghrelin and its involvement in dysmotility of the large intestine.

研究代表者

志水 泰武（SHIMIZU YASUTAKE）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：40243802

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、中枢神経を介する消化管運動の制御機構を解明することである。中枢との神経連絡を保ったまま消化管運動を評価できる *in vivo* の実験系を用い、グレリンやドーパミンが脊髄排便中枢に作用し大腸運動を亢進させること、脊髄にグレリンやドーパミンに感受性のある神経が存在することを明らかにした。本研究で明らかとした中枢を介する大腸運動の調節機序は、ストレスに伴って発生する下痢や便秘の治療に応用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this work was to clarify the regulatory mechanism of the central nervous system on gut motility. By using *in vivo* experimental system in which gut motility can be assessed in the presence of intact neural connection between the central nervous system and gut, it has been demonstrated that ghrelin and dopamine injected into the spinal defecation center elicit large propulsive colorectal motility. In addition, neurons sensitive to ghrelin and dopamine have been identified in the spinal cord. These findings would provide a novel therapeutic strategy for stress-induced diarrhea and constipation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

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：グレリン、大腸運動、排便、脊髄、消化管、下痢、便秘

## 1. 研究開始当初の背景

（1）ストレスによって下痢と便秘という全く反対の消化管運動障害が発生する機序は不明である。それゆえに、治療は対症療法が主体となっている。病態を解明し新たな治療法を確立することが急務となっているため、多くの関連研究がなされている。しかし、ほ

とんどの研究が消化管内神経や内在性内分泌細胞の機能、あるいはそれらと平滑筋の関わりを対象としている。

（2）グレリンが脊髄排便中枢に作用し大腸運動を亢進させることを明らかにしたが、感覚神経からの情報を排便中枢で統合し、運動

神経を介して大腸運動に反映させるという一連の神経回路の中で、グレリンがどのように機能するかは不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 脊髄におけるグレリン作働性神経回路の成り立ちを明らかにする。

(2) 排便中枢から大腸へ至る神経連絡路を解明する。

(3) 脊髄のグレリン作働性制御系が、正常な排便反射にどのように寄与するか明らかにする。

(4) グレリン作働性制御系の乱れが、ストレスに伴う下痢や便秘と関連性するか追究する。

## 3. 研究の方法

(1) 脊髄の排便中枢との神経連絡を保ったまま大腸運動を評価できる *in vivo* の実験系を用いて、脊髄内のグレリン作働性機構の詳細を検討する。麻酔下のラットの下行結腸部と肛門にカニューレを設置し、結直腸の内腔圧変化と内腔液の推送量を測定する(図1)。腰仙髄部(L6-S1)にカテーテルを設置し、グレリンの脊髄内投与を行う。グレリン投与の前に、神経活動をブロックする薬剤を投与し、その効果を検証する。

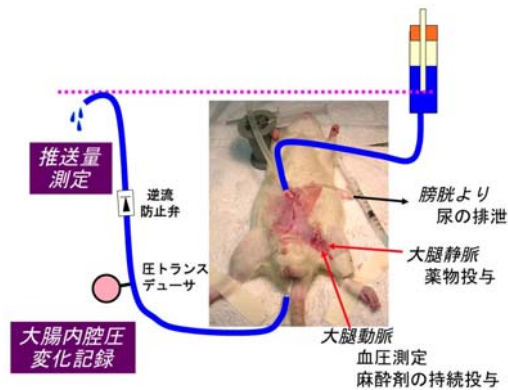


図1 : *in vivo* の大腸運動評価実験の概要

(2) 腰仙髄部(L6-S1)に設置したカテーテルから、様々な神経伝達物質を投与し、大腸運動を亢進させる作用のある生理活性物質の検索を行う。効果のあった物質については、グレリンとの相互作用を検討する。

(3) 脊髄のスライス標本作製し、マイクロエレクトロード法あるいはパッチクランプ法により、グレリンに応答する神経の同定を行う。

(4) 脊髄の排便中枢から大腸への連絡経路となりうる神経を選択的に切断し、グレリンの作用が消失するか否か検討する。

(5) *in vivo* の実験系において、内腔圧を上昇させる(糞塊が貯留した状態を模倣)ことで大腸運動を亢進させ、脊髄内のグレリン作働性制御系の阻害(脱感作あるいは阻害剤)や連絡神経切除の効果を調べる。

(6) ストレス状態を再現するために、脳室内にCRHを投与し、大腸運動が亢進するか否か調べる。併せて、グレリン作働性制御系の阻害効果を調べる。

## 4. 研究成果

(1) *in vivo* における大腸の運動性評価実験から、グレリンは脊髄排便中枢に作用して極めて強力な大腸運動の促進作用を発揮するが、脂肪酸修飾のないデスアシルグレリンにはその作用がないことが明らかになった。この実験により、グレリンの脂肪酸修飾が作用発現に必須であることが判明した。

(2) 腰仙髄部(L6-S1)と大腸との神経連絡路となる骨盤神経を外科的に切除しておくことで、グレリンの大腸運動亢進作用は完全に消失した。

(3) 興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸で脊髄腔内の神経を興奮させることにより、グレリンと同様の反応が再現できた。また、高濃度のグルタミン酸で脱感作させると、グレリンの作用が発現しなくなった。神経の活動を阻害するテトロドトキシンやリドカインを前投与することによっても、グレリンの作用は消失した(図2)。これらの結果から、グレリンは脊髄内の神経をターゲットとすることが明らかとなった。

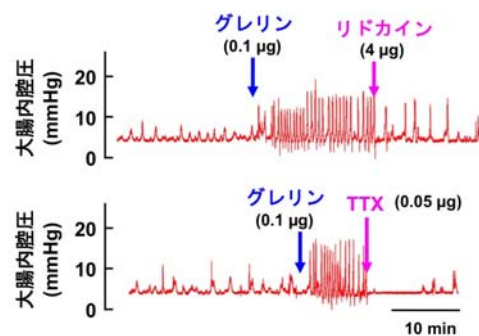


図2 : グレリン作用に対するリドカインおよびテトロドトキシンの効果

(4) グレリンが脊髄で作用する神経は、視床下部に存在するグレリン感受性神経と類

似の性質か否か検討した。視床下部の神経は、ニューロペプチド Y (NPY) を伝達物質として放出するが、NPY を脊髄腔内に投与しても、グレリン作用は再現されなかった (図 3)。また、NPY 受容体拮抗薬でグレリンの作用は阻害されなかった (図 3)。視床下部のグレリン感受性神経は、AMP キナーゼの活性化処置で活動亢進する性質を持つが、脊髄内でこの酵素を活性化させても大腸運動は変化しなかった。また視床下部の神経とは対照的に、レプチンによる拮抗作用も認められなかった (図 4)。これらのことから、脊髄内のグレリン感受性神経は、視床下部のグレリン感受性神経とは性質が異なることが明らかとなった。

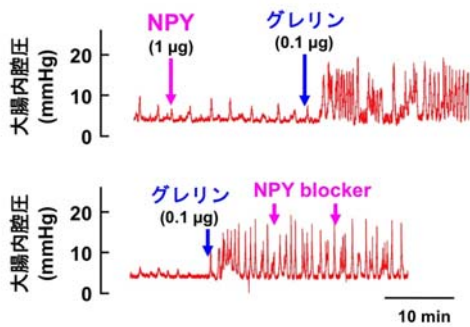


図 3 : グレリン作用に対する NPY の関与

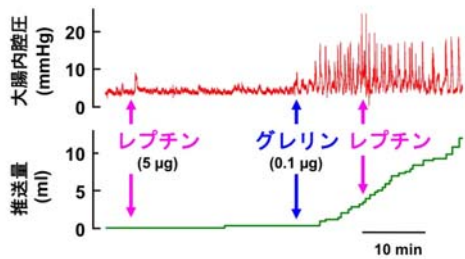


図 4 : グレリン作用に対するレプチンの効果

(5) 種々の神経伝達物質を排便中枢に投与し、大腸運動を亢進させる作用を持つ物質を検索する実験において、ドーパミンがグレリンに匹敵する作用を発揮することが明らかになった (図 5)。脱感作や阻害剤を用いた実験から、グレリンとドーパミンは独立した経路で大腸運動を亢進させることを見出した。パーキンソン病の患者がほぼ例外なく便秘になることが知られているが、グレリン作働性の機序を刺激することによって、これを改善できる可能性が示唆された。

(6) 脊髄のスライス標本を用いたパッチクランプ法では、グレリンやドーパミンに対して応答する神経が見出された。内向き電流が記録される神経と外向き電流が記録される

神経が存在しており、いずれの神経が大腸運動の亢進に寄与するかは今後解明すべき課題である。

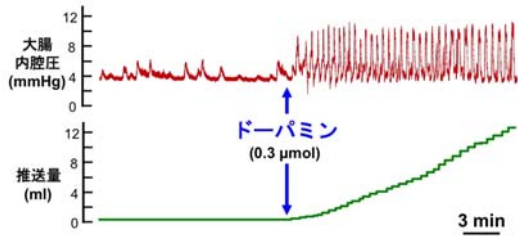


図 5 : ドーパミンによる大腸運動亢進作用

(7) 脊髄のグレリン作働性制御系が正常な排便反射に寄与するか否か検証する実験には、脱感作を活用した。脊髄内にグレリンを投与し亢進した大腸運動が定常レベルに復帰したときに、再びグレリンを投与しても大腸運動は亢進しなかった。この状態を、脊髄におけるグレリン作働性制御系の脱感作とみなした。脱感作させた状態で、大腸内腔圧の上昇 (糞塊が貯留した状態を模倣) させたところ、蠕動運動の亢進が認められた。この結果から、正常な排便反射には脊髄のグレリン作働性制御系が関与しないことが示された。

(8) 人為的に作出した術後大腸運動障害モデル (自発運動の消失と内腔圧上昇に伴う運動亢進の欠落) において、グレリンは強力な排便促進作用を発揮することが明らかとなった (図 6)。モルヒネ投与後の大腸運動の低下に対しても改善作用があることがわかった。これらの結果から、グレリンの大腸運動促進作用は、将来的に臨床応用できるものと期待される。

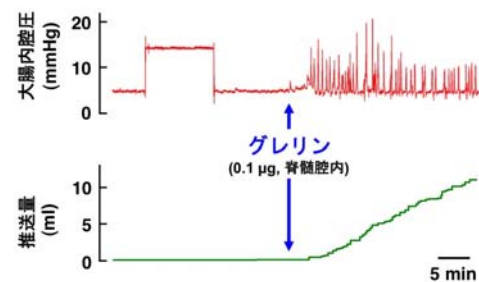


図 6 : 術後運動障害モデルにおけるグレリンの作用

(9) ストレス状態を模倣するために、脳室内に CRH を投与したが、この処置では大腸運動の亢進が認められなかった。多くの要素が関わるストレス時の大腸運動の変化を実験的に再現するために、更なる検討が必要である。

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 18 件)

- 1 Shiina T., Gurung Y.B., Suzuki Y., Takewaki T., Shimizu Y. Alteration of neuromuscular transmissions in the hamster colon following the resolution of TNBS-induced colitis. *J. Physiol. Sci.* 査読有, 印刷中.  
DOI: 10.1007/s12576-013-0256-9
- 2 Shiina T., Shima T., Suzuki Y., Shimizu Y. Inhibitory actions of a local neural reflex on propulsive activity of the esophageal striated muscle portion in rats. *Res. Vet. Sci.* 査読有, Vol 94, 2013, pp.331-335.  
DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.09.014
- 3 Shiina T., Shima T., Suzuki Y., Worl, J., Shimizu Y. Neural regulation of esophageal striated muscle in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Auton. Neurosci.* 査読有, Vol 168, 2012, pp. 25-31.  
DOI: 10.1016/j.autneu.2012.01.003.
- 4 Nakamori C., Shiina T., Shimizu Y. Postnatal changes in vagal control of esophageal muscle contractions in rats. *Life Sci.* 査読有, Vol 90, 2012, pp. 495-501.  
DOI: 10.1016/j.lfs.2012.01.004.
- 5 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.* 査読有, Vol 65, 2011, pp 89-94.  
DOI: 10.1007/s11418-010-0463-0.
- 6 Iwami M., Shiina T., Hirayama H., Shimizu Y. Intraluminal administration of zingerol, a non-pungent analogue of zingerone, inhibits colonic motility in rats. *Biomed. Res.* 査読有, Vol 32, 2011, pp. 181-185, DOI: <http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.32.181>
- 7 Alkayed F., Shiina T., Takewaki T., Shimizu Y. Postnatal development of excitatory innervations in longitudinal smooth muscle of the chicken anterior mesenteric artery. *Life Sci.* 査読有, Vol 88, 2011, pp. 400-405.  
DOI: 10.1016/j.lfs.2010.12.012.
- 8 Iwami M., Mahmoud F.A., Shiina T., Hirayama H., Shima T., Sugita J., Shimizu Y. Extract of grains of paradise and its active principle 6-paradol trigger thermogenesis of brown adipose tissue in rats. *Auton. Neurosci.* 査読有, Vol 161, 2011, pp. 63-67.  
DOI: 10.1016/j.autneu.2010.11.012.
- 9 Abe C., Iwata C., Shiina T., Shimizu Y., Morita H. Effect of daily linear acceleration training on the hypergravity-induced vomiting response in house musk shrew (*Suncus murinus*). *Neurosci Lett.* 査読有, Vol 502, 2011, pp 138-142.  
DOI: 10.1016/j.neulet.2011.06.041.
- 10 志水泰武, 平山晴子, 嶋剛士, 椎名貴彦, グレリンによる排便促進機構. *自律神経*, 査読無, Vol 48, 2011, pp. 86-88.  
J-GLOBAL ID : 201102231799603251
- 11 椎名貴彦, 志水泰武, 嘔吐する小型実験動物スunksの食道における内在神経性制御. *日本病態生理学学会雑誌*, 査読無, Vol 20, 2011, pp. 21-23.  
J-GLOBAL ID : 201202240274290364
- 12 Hirayama H., Shiina T., Shima T., Kuramoto H., Takewaki T., Furness J.B., Shimizu Y. Contrasting effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on the lumbo-sacral defecation center and regulation of colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 査読有, Vol 22, 2010, pp. 1124-1131.  
DOI: 10.1111/j.1365- 2982.2010.01553.x.
- 13 Ferens D.M., Yin L., Bron R., Hunne B., Ohashi-Doi K., Kitchener P.D., Sanger G.J., Witherington J., Shimizu Y., Furness, J.B. Functional and in situ hybridisation evidence that preganglionic sympathetic vasoconstrictor neurons express ghrelin receptors. *Neuroscience* 査読有, Vol 166, 2010, pp. 671-679.  
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.001.
- 14 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.* 査読有, Vol 2010, 2010, Article ID 459789, 7 pages.  
DOI: 10.1155/2010/459789
- 15 Mahmoud M.E., Nikami H., Shiina T., Takewaki T., Shimizu Y. Capsaicin inhibits IFN- $\gamma$ -induced MHC class II expression by suppressing transcription of class II transactivator gene in murine peritoneal macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 査読

有, Vol 10, 2010, pp. 86-90.  
DOI: 10.1016/j.intimp.2009.10.001.

16 Shiina T., Shima T., Hirayama H., Kuramoto H., Takewaki T., Shimizu Y. Contractile responses induced by physalaemin, an analogue of substance P, in the rat esophagus. *Eur. J. Pharmacol.* 査読有, Vol 628, 2010, pp. 202-206.  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.11.039.

17 Shiina T., Shima T., Worl J., Neuhuber W.L., Shimizu Y. The neural regulation of the mammalian esophageal motility and its implication for esophageal diseases. *Pathophysiology* 査読有, Vol 17, 2010, pp. 129-133.  
DOI: 10.1016/j.pathophys.2009.03.008.

18 平山晴子, 椎名貴彦, 嶋剛士, 石見百江, 志水泰武, グレリンによる大腸運動促進機構, 日本病態生理学会雑誌, 査読無, Vol 19, 2010, pp. 28-33.  
J-GLOBAL ID : 201102252499826990

[学会発表] (計 30 件)

1 池田あずさ, 椎名貴彦, 古江秀昌, 井本敬二, 志水泰武, Enhancement of colorectal motility by dopamine through an activation of lumbo-sacral defecation center in rats. 第 90 回日本生理学会大会 (東京) 2013.3.29

2 池田あずさ, 椎名貴彦, 古江秀昌, 井本敬二, 志水泰武, 脊髄排便中枢の活性化を介した大腸運動促進作用におけるドパミンとグレリンの相互作用 第 155 回日本獣医学会学術集会 (東京) 2013.3.28

3 椎名貴彦, 志水泰武, Cholinergic and non-cholinergic regulatory system in the esophageal motility of Suncus murinus (a house musk shrew). 第 90 回日本生理学会大会 (東京) 2013.3.28

4 志水泰武, in vivo の実験系を用いた消化管運動の解析, 東海医学会セミナー (伊勢原) 2013.1.9

5 中森裕之, 杉田理子, 池田あずさ, 平山晴子, 椎名貴彦, 志水泰武, 脊髄を介したラット大腸運動亢進におけるグレリンの作用機序, 第 59 回中部日本生理学会 (岡崎) 2012.11.17

6 椎名貴彦, 安田昇平, 志水泰武, 嘔吐する小型実験動物スunksの食道運動を制

御するコリン作動性および非コリン作動性機構, 第 59 回中部日本生理学会 (岡崎) 2012.11.17

7 池田あずさ, 椎名貴彦, 古江秀昌, 井本敬二, 志水泰武, 脊髄排便中枢を介したラット大腸運動調節機構に対するドパミンの関与, 第 154 回日本獣医学会学術集会 (盛岡) 2012.9.15

8 安田昇平, 椎名貴彦, 志水泰武, ヒスタミンによるハムスター胃運動調節機構, 第 154 回日本獣医学会学術集会 (盛岡) 2012.9.15

9 椎名貴彦, 志水泰武, ラット食道横紋筋運動に対する硫化水素の抑制効果, 第 154 回日本獣医学会学術集会 (盛岡) 2012.9.15

10 椎名貴彦, 池田あずさ, 鈴木隼人, 安田昇平, 志水泰武, 硫化水素によるラット食道横紋筋運動の抑制性制御, 第 22 回日本病態生理学会大会 (大分) 2012.8.4

11 椎名貴彦, 志水泰武, 嘔吐する小型実験動物スunksの食道縦走方向運動に対する制御機構, 第 54 回日本平滑筋学会総会 (東京) 2012.8.2

12 椎名貴彦, 志水泰武, Extrinsic and intrinsic neural regulatory mechanisms of esophageal motility in Suncus murinus (a house musk shrew). 第 89 回 日本生理学会大会 (松本) 2012.3.31

13 鈴木勇司, 赤羽真理恵, 平山晴子, 椎名貴彦, 志水泰武, Effects of ghrelin on intestinal motility in various rat models having intestinal dysmotility. 第 89 回 日本生理学会大会 (松本) 2012.3.31

14 杉田理子, 平山晴子, 椎名貴彦, 志水泰武, グレリンによる脊髄排便中枢を介した大腸運動亢進の作用機序, 第 152 回日本獣医学会学術集会 (大阪) 2011.9.19

15 椎名貴彦, 藏本博史, 志水泰武, 嘔吐する小型実験動物スunksの食道運動に対する内在神経による制御機構, 第 152 回日本獣医学会学術集会 (大阪) 2011.9.19

16 椎名貴彦, 志水泰武, 嘔吐する小型実験動物スunksの食道における内在神経性制御, 第 21 回 病態生理学会 (東京) 2011.8.20

17 志水泰武, 杉田理子, 川口敬之, 赤羽真

- 理恵、平山晴子、椎名貴彦、脊髄排便中枢を介したグレリンの大腸運動促進作用、第10回生体機能研究会（徳島）2011.7.31
- 18 平山晴子、椎名貴彦、藏本博史、志水泰武、脊髄を介したグレリンによる大腸運動調節機構、第151回日本獣医学会学術集会（東京）2011.3.31
- 19 志水泰武、赤羽真理恵、平山晴子、椎名貴彦、術後結腸運動障害モデルラットにおけるグレリンの消化管運動促進作用、第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会合同大会（J. Physiol. Sci. 誌上）2011.3.28
- 20 平山晴子、椎名貴彦、藏本博史、志水泰武、ラット脊髄排便中枢におけるグレリンの大腸運動促進作用、第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会合同大会（J. Physiol. Sci. 誌上）2011.3.28
- 21 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・第116回日本解剖学会総会合同大会（J. Physiol. Sci. 誌上）2011.3.28
- 22 藏本博史、金子由美、森井真美、アクマ、ムスリム、椎名貴彦、志水泰武、ラット食道における  $\alpha$ -synuclein 含有神経の支配と由来、第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会合同大会（J. Physiol. Sci. 誌上）2011.3.28
- 23 志水泰武、平山晴子、嶋剛士、椎名貴彦、消化管運動の神経性制御機構、第63回自律神経学会（横浜）2010.10.22
- 24 平山晴子、椎名貴彦、藏本博史、志水泰武、ラットにおけるグレリンの大腸運動促進機構：脊髄を介した作用経路の検討、第150回日本獣医学会（帯広）2010.9.17
- 25 赤羽真理恵、平山晴子、椎名貴彦、志水泰武、グレリンは術後の排便障害モデルラットにおいて大腸運動を促進するか？ 第150回日本獣医学会（帯広）2010.9.17
- 26 椎名貴彦、Juergen Woerl、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（帯広）2010.9.17
- 27 藏本博史、金子由美、森井真美、椎名貴彦、志水泰武、ラット食道における  $\alpha$ -synuclein の分布と由来、第150回日本獣医学会（帯広）2010.9.17
- 28 椎名貴彦、志水泰武、新生仔ラット食道筋に対する神経制御機構および筋細胞の収縮特性、第9回生体機能研究会（箱根）2010.7.30
- 29 志水泰武、平山晴子、嶋剛士、椎名貴彦、in vivo の実験系を用いた消化管運動の解析、CBSM (Cell Biology Summer Meeting) 2010（箱根）2010.7.4
- 30 椎名貴彦、中森智昭、平山晴子、嶋剛士、藏本博史、志水泰武、Neuronal controls and contractile properties of esophageal muscle in neonatal rats、第87回日本生理学会大会（盛岡）2010.5.20
- 〔図書〕（計1件）
- 1 Shiina T., Shimizu, Y. Neural regulatory mechanisms of esophageal motility and its implication for GERD. In Gastroesophageal Reflux Disease (ISBN: 978-953-51-0314-1) Bortolotti, M., ed. InTech. 3-20, 2012. DOI: 10.5772/1200
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
志水 泰武 (SHIMIZU YASUTAKE)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：40243802
- (2) 研究分担者  
藏本 博史 (KURAMOTO HIROSHI)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授  
研究者番号：30153373  
(H22年度)
- 山本 欣郎 (YAMAMOTO YOSHIO)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：10252123  
(H23-24年度)
- 平山 晴子 (HIRAYAMA HARUKO)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教  
研究者番号：40635257  
(H24年度)
- (3) 連携研究者  
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