

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19580337

研究課題名(和文) 胃から産生される新しいペプチドによる消化管運動の調節機序

研究課題名(英文) Mechanism for control of gastrointestinal motility by a novel peptides released from the stomach.

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)：最近、食欲を変化させるグレリンと呼ばれるホルモンが胃から分泌されることが発見された。この研究の目的は、グレリンに消化管の運動を調節する作用があるか明らかにすることである。ラットを用いた実験から、グレリンは胃だけではなく脊髄の中でも作られていて、脊髄で作られるグレリンが自律神経を活発にして、大腸の運動を強くすることがわかった。ストレスによる下痢や便秘を改善するために応用可能な現象であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, a novel peptide hormone termed ghrelin has been discovered. The aim of this work was to clarify regulatory roles of the peptide on gastrointestinal motility. Experiments using rats showed that ghrelin is generated in the spinal cord, in addition to the stomach, and the ghrelin released in the spinal cord activates autonomic nerves promoting a strong propulsive motility of the colon. Results of this work may contribute to establish therapeutic approaches for stress-induced disorder in the gut.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、デスアシルグレリン、消化管運動、排便中枢、骨盤神経、過敏性腸症候群、脊髄

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃から分泌されるホルモンであるグレリンは、成長ホルモンの分泌亢進、食欲亢進、あるいはエネルギー消費の抑制など中枢作用を発揮するが、消化管に対する作用がは

きりしていなかった。

(2) グレリンが消化管に直接働くか否か検討した研究は散見されたが、中枢に働き外来神経を經由して消化管の運動調節を行うかど

うか検討した研究はなかった。

2. 研究の目的

(1) グレリンが消化管運動にどのような作用を持つか、in vivoの実験により明確にする。

(2) グレリンの作用点が脊髄の排便中枢であることを証明する。

(3) 消化管に対するグレリンの直接作用を摘出標本で検討する。

(4) グレリンの脂肪酸修飾が作用に必須であるか調べる。

(5) 脊髄を介するグレリン作用の生理学的意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 消化管各部位の運動性に対するグレリンの作用は、in vivoの実験系を用いて調べる。麻酔下のラットの消化管にカニューレションを施し、消化管内腔圧の変化と内腔液の推送量を測定する。

(2) グレリンの作用部位を明らかにする実験では、グレリンの投与経路を変える。血中投与、脳室内投与、脊髄内投与を行うとともに、脊髄からの神経連絡を切断する手技を組み合わせ、末梢での作用か中枢を経由する作用か判断する。

(3) 脊髄部にホルモンの作用部位があると予想された場合には、PCR法、免疫組織化学法により、その部位に受容体が存在するか否か調べる。

(4) 消化管の摘出標本を作製し、組織に直接グレリンを作用させることによって、直接作用の有無を検証する。

(5) 脂肪酸修飾のあるグレリンと、脂肪酸修飾の欠失したデスアシルグレリンを準備し、作用を比較検討する。また、相互作用があるかどうか調べる。

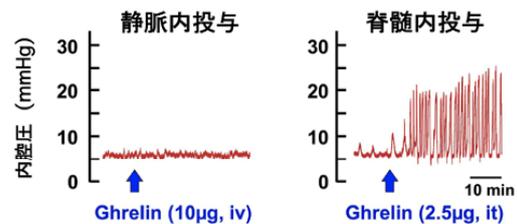
(6) グレリン受容体のブロッカーを投与し、消化管運動が影響を受けるか否か検討することによって、生理的な運動制御にグレリンが寄与するか調べる。

4. 研究成果

(1) 中枢へ容易に移行するグレリン受容体アゴニストを静脈内に投与した場合は、極めて強い結直腸の蠕動運動の亢進が引き起こされたが、ペプチドのグレリンを投与した場合には、消化管運動に変化は認められなかった。この結果から、グレリンが直接大腸に作用する可能性は低いと予想された。実際に摘出標本にグレリンを作用させても、運動性に変化は認められなかった。

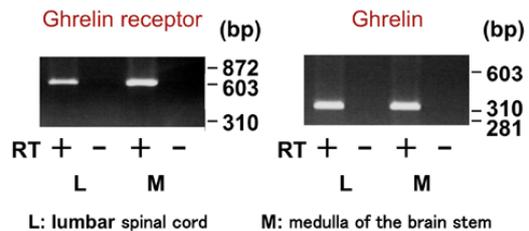
(2) ペプチドのグレリンを排便中枢のある腰仙髄部への微量投与したところ、アゴニストの静脈内投与で観察された大腸運動の亢進が再現された。第四脳室への投与は強い反応を惹起しなかった。静脈内投与が無効であることを考え合わせると、脊髄内で産生されるグレリンが排便中枢を刺激し、大腸運動を促進させることが予想された。

グレリンの末梢投与と中枢投与



(3) RT-PCR法、およびin situハイブリダイゼーション法によって、脊髄内にグレリン受容体が存在することが明らかになった。これは、脊髄内にグレリンの作用点があることを裏付けるものである。しかしながら特異抗体を用いた免疫組織学的手法では、陽性像を捉えることができなかった、今後の課題と言える。

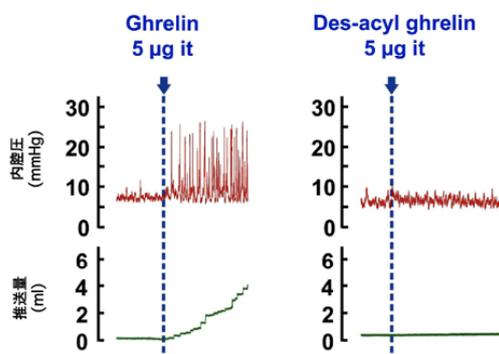
RT-PCRによるグレリン受容体およびグレリンの発現の検索



(4) 腰仙髄部から結直腸へ情報を伝える骨盤神経を切断すると、グレリンの大腸運動促進作用が消失した。この結果により、グレリンの作用点が脊髄にあることがさらに支持される。

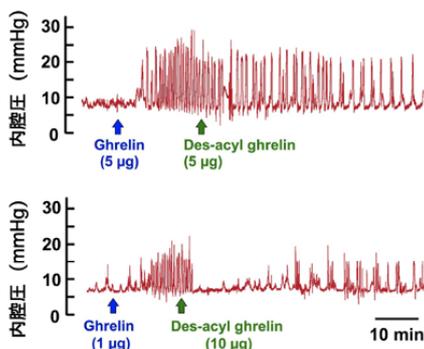
(5) グレリンの脂肪酸による修飾を欠落させたデスアシルグレリンを静脈内に投与したが、消化管運動に変化は認められなかった。また、デスアシルグレリンは脊髄内に投与した場合にも、大腸運動には影響を与えなかった。これまでの報告と良く一致して、脊髄内で作用するグレリンも脂肪酸修飾が必須であることがわかった。

グレリンとデスアシルグレリンの作用



(6) デスアシルグレリンは単独では作用がないものの、グレリンと同時に脊髄内に投与した場合には、グレリンの大腸運動促進作用を減弱させることが判明した。グレリンで予め大腸運動を活性化させておいた状態で、デスアシルグレリンを投与しても抑制作用は発揮された。デスアシルグレリンがグレリンの作用に拮抗するという報告はほとんどないので、重要な知見であると言える。

グレリンとデスアシルグレリンの相互作用



(7) グレリンの脊髄内投与は血圧を上昇させるが、この作用に対してはデスアシルグレリンの影響はなかった。この結果は、グレリンによって活性化された大腸運動を抑制するデスアシルグレリン作用は、単純な受容体レベルでの拮抗ではなく、別の機序が存在することを示唆する。

(8) 今回の成果より、脊髄におけるグレリンの脂肪酸修飾の度合いにより、大腸運動を促進する作用が微調整されている可能性が示唆された。この制御系のアンバランスが、ストレスに伴う下痢や便秘の原因になりうるので、本研究の成果はこの病態の解明に寄与し、有効な治療法の開発につながることを期待される。

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 12 件)

- ① 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.
- ② 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, Article ID 459789, 7 pages, 2010
- ③ 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.
- ④ 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.
- ⑤ Shafton, A.D., Sanger, G.J., Witherington, J.,

- Brown, J.D., Muir, A., Butler, S., Abberley, L., Shimizu, Y., Furness, J.B. Oral administration of a centrally-acting ghrelin receptor agonist to conscious rats triggers defecation. *Neurogastroenterol. Motil.*, 査読有, Vol.21, 2009, pp.71-77.
- ⑥ Boudaka A, Worl J, Shiina T, Shimizu Y, Takewaki T., Neuhuber WL Galanin modulates vagally induced contractions in the mouse esophagus. *Neurogastroenterol. Motil.* 査読有, Vol.21, 2009, pp.180-188.
- ⑦ Shimizu, Y., Matsuyama, H., Shiina, T., Takewaki, T. and Furness, J.B. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.*, 査読有, Vol.65, 2008, pp.295-311.
- ⑧ Shafton AD, Bogeski G, Kitchener P, Sanger GJ, Furness JB, Shimizu Y. Effects of NMDA receptor antagonists on visceromotor reflexes and on intestinal motility, in vivo. *Neurogastroenterol. Motil.*, 査読有, Vol.19, 2007, pp.617-624.
- ⑨ Boudaka A, Worl J, Shiina T, Neuhuber WL, Kobayashi H, Shimizu Y, Takewaki T. Involvement of TRPV1-dependent and -independent components in the regulation of vagally induced contractions in the mouse esophagus. *Eur J Pharmacol.*, 査読有, Vol.556, 2007, pp.157-165.
- ⑩ Gurung, Y.B., Shimizu, Y., Shiina, T., Mahmoud, M.E., Saito, S. and Takewaki, T. Impairment and restoration of spontaneous contractile activity of longitudinal smooth muscles in the TNBS-inflamed hamster distal colon. *Biomed. Res.*, 査読有, Vol.28, 2007, pp.301-308.
- ⑪ Boudaka A, Worl J, Shiina T, Saito S, Atoji Y, Kobayashi H, Shimizu Y, Takewaki T. Key role of mucosal primary afferents in mediating the inhibitory influence of capsaicin on vagally mediated contractions in the mouse esophagus. *J Vet Med Sci.*, 査読有, Vol.69, 2007, pp.365-372.
- ⑫ Shiina T, El-Mahmoudy A, Khalifa M, Draid M, Shimizu Y, Takewaki T. Purinergic control of the quail rectum: Modulation of adenosine 5'-triphosphate-mediated contraction with acetylcholine. *Res. Vet. Sci.*, 査読有, Vol.82, 2007, 246-251.
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 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:グレリンの脊髄排便中枢を介する大腸運動促進作用、(シンポジウム「消化管の機能・疾病・治療薬の先端研究」演題) 第149回 日本獣医学会(武蔵野) 2010年3月27日
- ② 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(武蔵野) 2010年3月27日
- ③ 平山晴子、椎名貴彦、志水泰武、グレリン、デスアシルグレリンおよびオベスタチンがラット大腸運動に及ぼす影響、第20回病態生理学会(奈良) 2010年1月23日
- ④ Haruko Hirayama, Takehiko Toda, Takahiko Shiina, Hirofumi Kuramoto, Tadashi Takewaki, John B Furness and Yasutake Shimizu, The role of ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin in the regulation system of colorectal motility in rats. 2009 International Symposium on Ghrelin (東京) 2009年11月19日
- ⑤ 平山晴子、戸田壮彦、椎名貴彦、藏本博史、志水泰武、グレリンによるラット大腸運動促進効果に対するデスアシルグレリンおよびオベスタチンの拮抗作用、第148回 獣医学会(鳥取) 2009年9月26日
- ⑥ 山川友佳、椎名貴彦、志水泰武、TRPV1はマウス大腸炎に伴う消化管運動の低下に関与する、第148回 獣医学会(鳥取) 2009年9月26日
- ⑦ H. Hirayama, T. Toda, T. Shiina, H. Kuramoto, T. Takewaki, J. B. Furness and Y. Shimizu, Antagonistic effects of des-acyl ghrelin and obestatin on ghrelin-induced enhancement of colorectal motility at the lumbo-sacral defecation center in rats., 国際自律神経学会 (ISAN2009: シドニー) 2009年9月3日
- ⑧ T. Shiina, J. Worl, W. L. Neuhuber, T. Shima, T. Takewaki and Y. Shimizu, Neuronal regulation of the esophageal motility in *Suncus murinus* (a house musk shrew)., 国際自律神経学会 (ISAN2009: シドニー) 2009年9月3日

- ⑨ T. Shima, T. Shiina and Y. Shimizu, Roles of a capsaicin-sensitive neural circuit in peristaltic motility of the rat esophagus., 国際自律神経学会 (ISAN2009 : シドニー) 2009年9月3日
- ⑩ Y. Shimizu, H Hirayama, T Shiina, JB Furness, T Takewaki, Enhancement of colorectal motility by ghrelin, but not des-acyl ghrelin, through an activation of lumbo-sacral defecation center in rats., 国際生理学会 (京都) 2009年7月29日
- ⑪ T Shiina, T Shima, H Hirayama, A Boudaka, J Woerl, WL Neuhuber, T Takewaki, Y Shimizu, Modulatory actions of tachykinins on the striated and smooth muscle motility in the rat esophagus., 国際生理学会 (京都) 2009年7月29日
- ⑫ 平山晴子、椎名貴彦、志水泰武、アシル化グレリンおよびデスアシルグレリンのラット大腸運動に対する作用、第51回日本平滑筋学会 (名古屋) 2009年7月22日
- ⑬ 平山晴子、椎名貴彦、武脇義、志水泰武、脊髄排便中枢を介するグレリンの結直腸運動促進作用、第55回中部日本生理学会 (愛知) 2008年10月17日
- ⑭ Shimizu Y, Hirayama H, Shiina T, Furness JB, Takewaki T, Acylated ghrelin, but not des-acyl ghrelin, enhances colorectal motility by activating lumbo-sacral defecation center in rats., 第81回薬理学会 (横浜) 2008年2月18日
- ⑮ 志水泰武、椎名貴彦、グレリンの排便中枢を介する結直腸運動亢進作用、第18回病態生理学会 (神戸) 2008年1月26日
- ⑯ Shimizu, Y, Evidence that activation of ghrelin receptors of autonomic preganglionic neurons stimulates autonomic outflows. 国際自律神経学会 (ISAN2007 : 京都) 2007年10月7日
- ⑰ Y. Shimizu, A.D. Shafton, D.M. Ferens, B. Hunne, J.B. Furness, Evidence that activation of ghrelin receptors of preganglionic neurons in the spinal cord stimulates colorectal motility and defecation 国際シンポジウム「Gastrointestinal motility and Functional gastrointestinal disorders, Basic to Clinical」(名古屋) 2007年8月28日

- ⑱ 志水泰武、S Anthony、椎名貴彦、武脇義、Furness JB. 脊髄の排便中枢を介するグレリンの結直腸運動亢進作用、第49回日本平滑筋学会 (奈良)、2007年7月5日

〔図書〕 (計1件)

- ① Furness, J.B., Nguyen, T.V., Nurgali, K., Shimizu, Y. Chapter 2: The enteric nervous system and its extrinsic connections. In Textbook of Gastroenterology 5th edition (Yamada, T., Alpers, D., Owyang, C., Powell, D.W., Silverstein, F. eds.) Lippincott, Philadelphia. 15-39, 2008.

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