

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06714

研究課題名(和文)サーカディアンリズムによる消化管運動調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of gastrointestinal motility by circadian rhythms

研究代表者

坂井 貴文(SAKAI, TAKAFUMI)

埼玉大学・その他部局等・学長

研究者番号：40235114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、概日リズムと消化管運動の関係を明らかにすることを目的に研究を行った。胃運動調節機構に重要なホルモンであるグレリン発現は、日内変動を示すこと、また時計遺伝子REV-ERBによって制御されていることを明らかにした。また、大腸運動は制限給餌によって収縮パターンが変化すること、及び時計遺伝子発現も変動することを明らかにした。また、迷走神経と交感神経が大腸運動の日内リズムに関与していることを明らかにした。本研究の結果は、消化管運動の日内リズムの理解に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、消化管運動を制御するホルモン及び自律神経と、時計遺伝子や摂食との関連について新しい知見を得た。これまで、時差ボケやナイトワーカーのヒトでの消化管運動機能不調の原因は明らかではなかったが、本研究によって基盤的知見を得ることができたことは、当該分野において学術的意義が高いと考えられる。また、今後トランスレーショナル研究に展開していくことで、ヒトの消化管機能疾患患者に対する治療法や薬剤の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the relationship between circadian rhythms and gastrointestinal motility. We found that mRNA expression of ghrelin, a stomach derived hormone important for the gastric motility, exhibited diurnal variation and was regulated by the clock gene REV-ERB. We also found that colonic motility is affected by restricted feeding, and that the expression of the clock gene in colon was also fluctuated. We also revealed that vagal and sympathetic nerves were involved in the diurnal rhythm of colonic motility. The results of this study are expected to contribute to our understanding of the diurnal rhythm of gastrointestinal motility.

研究分野：消化管生理学

キーワード：消化管運動 サーカディアンリズム ホルモン 時計遺伝子 スンクス

1. 研究開始当初の背景

体内の細胞の大半には約 24 時間周期の「サーカディアンリズム (概日リズム)」が備わっており、睡眠、覚醒、ホルモンの分泌などの多様な生理機能を調節している。それぞれの細胞が行う代謝や神経活動、免疫といった働きは、それぞれ時間帯によって異なる活動をする細胞の働きに起因する。細胞内では約 24 時間の周期で働く時計遺伝子がサーカディアンリズムを司っており、脳内の視交叉上核が末梢の細胞の遺伝子をコントロールし細胞内の時計遺伝子を同調させている。一方、数十分から数時間単位のリズムは「ウルトラディアンリズム」と呼ばれ、その一つに空腹時に 90 分から 120 分間隔で胃から小腸へと伝播する伝播性空腹期収縮 (migrating motor complex; MMC) などが知られる。これまで、MMC の強収縮の惹起には消化管ホルモンのモチリンが必要であり、血中モチリン濃度も MMC と同様のリズムを示すことがわかっていたが、げっ歯類はモチリンを欠失しているため MMC 及びモチリンに関する研究は遅滞していた。研究代表者は、モチリンを産生する小型哺乳類のスンクス (*Suncus murinus*) を用いて MMC が示すウルトラディアンリズムの分子的機構の解明を試み、これまでに十二指腸管腔内の pH 変化によるモチリン分泌促進などがこの機構に重要であることを明らかにした。一方、生体リズムの乱れが消化管機能不全の起因となることは経験的に知られているが、その制御機構は全く分かっておらず、サーカディアンリズムがウルトラディアンリズムを示す MMC にどのように影響を及ぼすのかについては不明であった。

2. 研究の目的

サーカディアンリズムは睡眠覚醒や体温、血圧、代謝、行動などの様々な生理作用に重要であり、ジェットラグや生活リズムの破綻などによる体内リズムの乱れは種々の病態症状を引き起こす。消化管運動は、空腹期と食後期収縮の 2 種類の収縮パターンから構成されるが、空腹期では胃の強収縮が 90 から 120 分周期で起こるウルトラディアンリズムを示す。一方、時差ボケなどの生体リズムが崩れると、腹部の不快感、便秘、吐き気など症状を起こし、これは消化管運動機能低下によるものと考えられるが、ウルトラディアンリズム周期を示す消化管運動とサーカディアンリズムの関連性は不明である。本研究では、食虫目スンクスを用いて脳腸関連機構と「ウルトラサーカディアン」軸の機能連関による消化管運動調節機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胃運動調節因子であるグレリン発現変動の検討

概日リズムとグレリン遺伝子発現を検討するために、マウス胃を経時的にサンプリングして、グレリン遺伝子及び時計遺伝子発現を定量 PCR 法で測定した。また、グレリン産生細胞株を用いて、REV-ERB α 及び β の合成アゴニストである SR9009 を添加し培養し、グレリン遺伝子及び時計遺伝子発現を定量 PCR 法で測定した。

(2) 制限給餌下における大腸時計遺伝子 mRNA 発現変動

制限給餌 (ZT1~10) を 4 日間続けたスンクスから、5 つのタイムポイント (ZT 0、6、12、18、24) で大腸の採取を行い、時計遺伝子発現を定量 PCR 法で測定した。

(3) 大腸の日内収縮運動における自律神経の関与

スunksの大腸にひずみゲージフォーストランスデューサーを縫着し、薬剤投与による空腹期消化管運動への影響を検討した。また、迷走神経切除による関与を検討した。さらに、交感神経の関与については、交感神経遮断薬であるレセルピンを投与して大腸運動を測定した。

4. 研究成果

(1) 胃運動調節因子であるグレリン発現変動の検討

概日リズムとグレリン遺伝子発現を検討した結果、REV-ERB α mRNA 発現は ZT0 から ZT6 まで上昇した後 ZT9 で低下し、REV-ERB β mRNA 発現は ZT0 から ZT9 まで上昇した。一方、グレリン mRNA 発現に日内変動は見られなかった。グレリン産生細胞株 (SG-1 細胞) に REV-ERB α 及び β の合成アゴニストである SR9009 を添加し培養した結果、SR9009 濃度依存的 (0 ~40 μ M) にグレリン mRNA 発現が減少した。また、siRNA を用いて REV-ERB α と β をダブルノックダウンすると、グレリン mRNA 発現は有意に上昇した。さらに、転写因子結合予測サイト JASPAR を用いてグレリン遺伝子の転写開始点より 2.5 kb 上流のプロモーター領域における転写因子結合配列を解析した結果、REV-ERB α 結合配列は 2 か所、REV-ERB β 結合配列は 4 か所予測された。

(2) 制限給餌下における大腸時計遺伝子 mRNA 発現変動

制限給餌 (ZT 1-10) した際のスunks大腸における時計遺伝子発現をリアルタイム PCR 法によって検討した。Clock mRNA の発現量は、両群で一日を通じて変化がなかった。自由給餌群の Bmal1 mRNA 発現は ZT24 でピークを示した。一方、明期制限給餌群では一日を通じた発現量の増減が緩やかになり、自由給餌群と比較して暗期の発現が減少する傾向が見られた。Per1 mRNA 発現は、自由給餌群で ZT12 にピークを示したが、明期制限給餌群では ZT6 で発現ピークを示し、また、Bmal1 と同様に一日の発現量の増減が緩やかになった。自由給餌群の Cry1 mRNA 発現は ZT18 でピークが見られ、明期よりも暗期で発現量が多い傾向が見られた。一方、明期制限給餌群では、自由給餌群と比較して暗期での発現量が低下する傾向があり、ZT6 で発現ピークを示した。

(3) 大腸の日内収縮運動における自律神経の関与

大腸運動への自律神経系の関与について検討するため、迷走神経切除を行った。偽手術群では、無処置のスunksと同様に、CMC と GMC は暗期に多く見られたが、明期ではほとんど見られなかった。迷走神経切断したスunksでも同様に、CMC と GMC は暗期に多く観察され、明期にはほとんど見られなかった。偽手術群では、全ての個体が ZT17 までに給餌した餌を食べ終えたが、迷走神経切断群では、食べ終わるまでに偽手術スunksよりも時間がかかる個体があった。GMC の持続時間および振幅は、両群間に有意差はなかった。また、一日を通して 4 時間ごとの排便と GMC の頻度を解析したが、どの時間帯においても差はなかった。排便を伴わない GMC は、偽手術群ではわずかに見られたが (GMC 全体の約 10%)、迷走神経切断群では 25~30% と偽手術群よりも高頻度であった。迷走神経切断群では、短時間に強い収縮が連続して起こるようなクラスター状の GMC が観察されたが、偽手術群では見られな

かった。

大腸運動への交感神経の働きを検討するために、交感神経遮断薬であるレセルピンを腹腔内投与し、大腸運動測定と行動観察を24時間行った。vehicle群では、無処理のシクスで観察されたように、暗期にGMCが多く発生し、明期にはCMCとGMCはほとんど見られなかった。一方、レセルピン群では明暗周期に関わらず、明期でもGMCが多く観察された。各GMCの振幅は、vehicle群ではほぼ同じであったが、レセルピン群ではまばらであり、GMCの振幅の半分程度の収縮強度が観察された。また、レセルピン群では暗期の後半にCMCは観察されなかった。レセルピン群では、vehicle群と比べて、暗期(ZT16-20, 20-24)の排便回数が有意に減少した。また、レセルピン群のGMCは、vehicle群と比べて明期(ZT0-4, 4-8)で有意に増加し、暗期(ZT16-20, 20-24)で減少する傾向にあった。vehicle群における排便を伴わないGMCの割合は22.9%であった。一方で、レセルピン群は66.7%であり、vehicle群の約3倍であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 Kobayashi Yuki, Takemi Shota, Sakai Takafumi, Shibata Chikashi, Sakata Ichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Diurnal changes of colonic motility and regulatory factors for colonic motility in <i>Suncus murinus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology & Motility	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nmo.14302	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 Iijima Mio, Takemi Shota, Aizawa Sayaka, Sakai Takafumi, Sakata Ichiro	4. 巻 90
2. 論文標題 The suppressive effect of REVERBs on ghrelin and GOAT transcription in gastric ghrelin-producing cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropeptides	6. 最初と最後の頁 102187 ~ 102187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.npep.2021.102187	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 竹見 祥大、坂田 一郎、坂井 貴文	4. 巻 118
2. 論文標題 消化管収縮運動研究の基礎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11405/nisshoshi.118.107	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 -
1. 著者名 Kimura Risa, Kondo Daisuke, Takemi Shota, Fujishiro Miyuki, Tsukahara Shinji, Sakai Takafumi, Sakata Ichiro	4. 巻 33
2. 論文標題 The role of central corticotrophin releasing factor receptor signalling in plasma glucose maintenance through ghrelin secretion in calorie restricted mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jne.12961	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 竹見 祥大、坂田 一郎、坂井 貴文	4. 巻 118
2. 論文標題 消化管収縮運動研究の基礎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.118.107	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 -

1. 著者名 Sekiya Haruka, Yokota Naho, Takemi Shota, Nakayama Keiji, Okada Hiroki, Sakai Takafumi, Sakata Ichiro	4. 巻 56
2. 論文標題 The inhibitory effect of somatostatin on gastric motility in Suncus murinus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Smooth Muscle Research	6. 最初と最後の頁 69 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1540/jsmr.56.69	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 Sakata Ichiro, Takemi Shota	4. 巻 28
2. 論文標題 Ghrelin-cell physiology and role in the gastrointestinal tract	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity	6. 最初と最後の頁 238 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MED.0000000000000610	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

埼玉大学理学部生体制御学科
http://seitai.saitama-u.ac.jp/

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	坂田 一郎 (SAKATA ICHIRO) (80610831)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	
研究分担者	竹見 祥大 (TAKEMI SHOTA) (70871440)	埼玉大学・理工学研究科・助教 (12401)	

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
---------	---------