

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590252

研究課題名(和文) 神経ペプチドオレキシンの消化管運動調節機構とその意義

研究課題名(英文) The role and the mechanisms of orexin in modulating gastrointestinal function

研究代表者

野津 司 (Nozu, Tsukasa)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30312367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：オレキシンは胃収縮を促進し、また大腸収縮を促進させ便排出を促進させる。また迷走神経による胃運動促進効果は、内因性のオレキシンが関与することを明らかとした。さらにCRFの末梢投与は胃排出を抑制するが胃収縮を促進することをラットで示した。CRFはCRF1,2の2種類の受容体を介して作用するが、CRF1の刺激により胃収縮は促進し、CRF2はこれに拮抗する作用を持つことを初めて示すことができた。さらにwater-avoidance stressは胃排出に変化を与えないが、CRF1を介して胃収縮を促進させることを明らかにした。これらは、消化管機能障害の病態理解のために重要な結果である。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated orexin stimulates gastric and colonic contractions. In addition, enhanced gastric contractions induced by vagal stimulation is mediated through endogenous orexin signaling. We also showed peripheral administration of CRF inhibits gastric emptying but stimulates gastric contractions in rats. It is known CRF acts through stimulation of two CRF receptor subtypes, such as CRF1 and CRF2. Enhanced gastric contractions are mediated through CRF1, and CRF2 signaling inhibits CRF1-triggered stimulated response in gastric contractility. These results suggest the activity balance of CRF1/2 signaling determines the physiological response in gastric contractility. Moreover, water-avoidance stress enhances gastric contractions through CRF1 without altering gastric emptying. These results are thought to contribute to understanding the pathophysiology of functional gastrointestinal disorders.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：消化管運動 ストレス 胃収縮 大腸収縮

1. 研究開始当初の背景

機能性消化管障害 (FGID) は消化管の運動、感覚機能異常を病態の中心とする疾患であるが、ストレスや精神的な要因が、発病や症状の増悪に関わっていることが知られている。ストレスに関する生体反応の key mediator は corticotropin releasing factor (CRF) であり、その病態への関与が指摘されているが、オレキシンも CRF と同様ストレス関連ペプチドで、消化管運動に変化を与え、FGID の病態に関与する可能性が指摘されている。我々はこれまで CRF は胃排出を抑制し、便排出を促進させることを報告してきた。オレキシンは胃収縮を促進させ、また拘束ストレスによって誘導される胃収縮の促進に、内因性のオレキシンが関与することも報告されている。

2. 研究の目的

オレキシン、CRF の消化管運動、内臓感覚への作用とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

胃、大腸収縮をマノメトリー法で、意識下非拘束ラットで測定する。また内臓感覚の測定は、ラットに経肛門的に伸展バルーンを挿入し、伸展に伴う痛覚を、腹筋収縮の活動度を筋電図で測定することにより行った。

4. 研究成果

オレキシンの中枢投与は大腸収縮と便排出を促進した。また胃収縮を促進し、収縮パターンを空腹期から食後期へと変化させた。さらに迷走神経刺激による胃収縮作用は、内因性のオレキシンが関与することを明らかにした。

CRF の末梢投与は胃排出を抑制しつつ胃収縮を促進した。胃排出の抑制は CRF2 を介する作用であった。一方収縮促進作用は末梢 CRF1 受容体を介するもので、CRF2 の刺激はこの作用を減弱させ、CRF2 信号の抑制はこの作用を増強させた。また CRF1 の選択的な刺激は確かに胃収縮を促進させた。これに対して CRF2 の刺激、あるいはブロックだけでは、基礎状態の胃収縮には影響を与えなかった。これらの結果は、以下のように解釈される。基礎状態の胃収縮には、CRF 信号は関与していないが、CRF1 を刺激すると胃収縮の促進が起きる。CRF2 は CRF1 の作用に対して抑制的に働き、CRF1 信号を減弱させることによりその効果を発揮する。基礎状態では CRF1 信号の活動はないので、CRF2 を刺激しても変化は起きない。CRF を投与すると、CRF1/2 双方の受容体は活性化されるが、CRF は CRF1 受容体への親和性が高いため、CRF1/2 信号のバランスは CRF1 優位となる。その結果胃収縮は促進する。この状態で CRF2 信号をブロックすると、CRF1 信号への抑制がとれるために、さらに CRF1 優位となり収縮促進反応は増強する。CRF2 を刺激すると CRF による CRF1 信号に抑制がかかるため効果は減弱する。このように CRF1/2 信号のバランスが胃収縮変化のパタ

ーンを決定することがわかった。またもう一つ重要な点は、CRF は胃排出を抑制しつつ収縮を促進することである。これまで、胃排出は胃運動機能の一般的な評価項目と認識されていたが、必ずしも胃排出が抑制されるときに胃収縮は低下するという事実の関連はないことを示した。胃排出は、胃収縮以外に十二指腸運動、幽門輪のコーディネーション等の様々な因子が関与する。一方、Functional Dyspepsia では、胃排出の低下とともに近位胃収縮の促進が起きている症例の存在が報告されているが、この現象の説明に CRF の関与を考えるとわかりやすい。胃排出が抑制され同時に収縮が促進すれば、結果的に胃壁の伸展が増強し、痛みが生じると考えられる。

次に実際にストレスをラットに負荷したときの、胃収縮をラットで測定してみた。Water-avoidance stress を負荷すると、胃収縮は直ちに促進することが明らかとなった。しかし、胃排出は変化を認めなかった。この胃収縮促進作用は、非選択的 CRF 受容体拮抗薬の末梢投与により阻止されることから、末梢 CRF 受容体を介する作用であり、また選択的 CRF2 受容体拮抗薬で阻止されないことから、CRF1 を介する作用と考えられた。CRF1 の胃運動での作用はこれまで全く指摘されていなかったが、CRF の投与、さらにストレス負荷の実験により、胃収縮を促進することを世界で初めて明らかとし、さらに CRF1/2 信号強度バランスが、胃収縮活動の変化パターンを決定するという新しい概念を報告した。これは FGID の病態理解だけではなく、新しい治療オプションの提供にもつながる概念である。

一方 FGID の病態には最近、局所の炎症、腸内細菌が重要な役割を持つことが指摘されてきている。そこで、我々が確立した消化管収縮活動測定系で、この点を検討することにした。腸内細菌の菌体成分 LPS の胃収縮への効果を検討した。LPS 投与により胃収縮は抑制され、この反応は IL-1 受容体拮抗薬の投与により阻止された。また IL-18 の末梢投与は、LPS と同じく胃収縮を抑制することが明らかとなった。炎症、サイトカインシグナルと末梢 CRF 受容体信号のリンクが最近指摘されている。そこで、今度はこの LPS の作用と CRF がリンクしないかを検討した。そして末梢 CRF2 信号を刺激すると、この LPS の反応をブロックすることが明らかとなった。一方 IL-18 の作用はこの処置でも阻止することができなかった。また LPS の作用は、インドメタシンの投与により阻止されることもわかった。つまり LPS の作用はプロスタグランジンを介するものであった。CRF2 信号の作用機序は明らかではないが、炎症と CRF 信号、消化管運動の関連を示す重要な知見であると考えられた。CRF2 信号は、消化管に存在するマクロファージから LPS によって分泌刺激を受ける IL-1 の分泌

を抑制することにより効果を発揮しているのかもしれない。さらなる検討が必要であるが、炎症に伴う消化管運動機能異常の治療として、CRF2 刺激薬の効果が考えられる。次に CRF1/2 信号のバランスが消化管機能変化を決めるという仮説が、大腸収縮、内臓知覚でも成立するかを確かめる実験を行った。CRF を末梢投与すると大腸収縮は促進した。この効果は、非選択的 CRF 受容体拮抗薬の前投与で完全に阻止されたことより、末梢 CRF 受容体を介する反応であることがわかった。選択的 CRF2 受容体拮抗薬の投与では阻止できなかったことから、CRF1 を介する作用である(現在存在する選択的 CRF1 受容体拮抗薬はすべて中枢に到達するため、末梢の CRF 効果を選択的にブロックすることは不可能であり、今回の実験には使用しなかった)。CRF1 の選択的アゴニストの投与により収縮は促進するが、CRF2 のアゴニストでは変化を認めなかった。一方選択的 CRF2 拮抗薬の投与そのものには大腸収縮への効果を認めなかったが、CRF の収縮増強効果をさらに増強した。以上の結果より、大腸収縮においても、CRF1 は収縮促進作用を示し、CRF2 は CRF1 信号を抑制することにより、抑制的に働いており、胃収縮と同様、CRF1/2 信号のバランスの仮説が成り立つことを証明した。

次に、内臓知覚の測定系で検討を行った。60mmHg の伸展圧で 10 分間伸展を行い、30 分後にもう一度同じ伸展を負荷するというプロトコルを採用した。一度目の伸展と二度目の伸展の腹筋収縮活動 (Visceromotor response; VMR) を比較すると、二度目が有意に増加していた。これは伸展というストレスによって内臓知覚過敏が誘導されたと解釈される(この結果はすでに他の研究者からも報告されている)。一度目の伸展直後に非選択的 CRF 受容体拮抗薬を投与すると、この増強反応は阻止された。また CRF1 アゴニストを投与するとこの反応はさらに増強され、CRF2 アゴニストを投与すると、反応は減弱した。一方 CRF を投与すると、この内臓知覚過敏に対して明確な変化を与えなかったが、選択的 CRF2 受容体拮抗薬と同時に CRF を投与すると、VMR をさらに増加させた。これは CRF を投与すると、CRF1/2 双方が活性化されるが、CRF2 を抑制することにより、CRF1 への抑制がとれて、CRF1 の VMR 増強作用が見えるようになったと考えられる。

以上の結果により、胃収縮、大腸収縮、内臓感覚において、CRF1/2 信号のバランスの仮説が成立することが明らかとなった。この結果は、たとえば、過敏性大腸症候群で下痢、内臓知覚過敏が起きているとすれば、それは CRF1 信号優位に状態が傾いていると考えられ、治療として CRF1 のブロックや CRF2 刺激が option として挙げられる。

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6件)

Nozu T, Takakusaki K, Okumura T. Urocortin 2 blocks the suppression of gastric antral contractions induced by lipopolysaccharide in freely moving conscious rats. *Regulatory Peptides* 2014 in press. 10.1016/j.regpep.2014.04.004. 査読有.

Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Okumura T. Water-avoidance stress enhances gastric contractions in freely moving conscious rats: role of peripheral CRF receptors. *J. Gastroenterol.* 2013 in press. 査読有.

Nozu T, Tsuchiya Y, Kumei S, Takakusaki K, Okumura T. Peripheral corticotropin-releasing factor (CRF) induces stimulation of gastric contractions in freely moving conscious rats: role of CRF receptor types 1 and 2. *Neurogastroenterol. Motil.* 25:190-197, 2013. 査読有.

Nozu T, Tsuchiya Y, Kumei S, Takakusaki K, Ataka K, Fujimiya M, Okumura T. Endogenous orexin-A in the brain mediates

2-deoxy-D-glucose-induced stimulation of gastric motility in freely moving conscious rats. *J. Gastroenterol.* 47:404-411, 2012. 査読有.

Tsuchiya Y, Nozu T, Kumei S, Ohhira M, Okumura T. IL-1 receptor antagonist blocks the lipopolysaccharide-induced inhibition of gastric motility in freely moving conscious rats. *Dig. Dis. Sci.* 57:2555-61, 2012. 査読有.

Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Ataka K, Fujimiya M, Okumura T. Central orexin-A increases colonic motility in conscious rats. *Neurosci. Lett.* 498:143-6, 2011. 査読有.

[学会発表](計3件)

末梢 CRF と胃運動 - FD の病態生理との関連について. 野津 司, 奥村 利勝. 日本消化器病学会ワークショップ 12 機能性ディスぺプシア - 診断と治療の現況を巡って - 2013 年 10 月 11 日 東京. Inhibition of corticotropin releasing factor (CRF) receptor type 2 signaling enhances peripheral CRF-induced stimulation of colonic contractions in conscious rats. Tsukasa Nozu, Toshikatsu Okumura. *Digestive Disease Week*, Orlando, Fla, USA, May 18-21, 2013.

オレキシンと消化管運動. 野津 司, 奥村 利勝. 日本消化器病学会 2012 年 10 月 10

日，神戸．
〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

野津 司（NOZU, Tsukasa）
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30312367

(2)研究分担者

奥村 利勝（OKUMURA, Toshikatsu）
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：60281903