

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292164

研究課題名(和文) 脊髄排便中枢を介する大腸運動制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism for controlling colorectal motility via the spinal defecation center.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脊髄排便中枢による大腸運動の制御機構を解明し、下痢や便秘に対する新たな治療戦略を構築することである。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、ノルアドレナリン、セロトニン、ド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を明らかにした。排便中枢のある腰仙髄部において、これらのモノアミン類は下行性疼痛抑制経路の伝達物質として機能していることから、痛みの制御系と大腸運動調節系が連動することが浮き彫りになった。本研究で明らかとした脊髄排便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 for controlling colorectal motility via the spinal defecation center. 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 noradrenalin, serotonin and dopamine injected into the spinal defecation center elicit large propulsive colorectal motility. These monoamines are transmitters associated with the descending pain inhibitory pathway. Considering that nociceptive stimuli including visceral pain activate the descending inhibitory pathway to suppress noxious input in the spinal cord, our results provide a rationale for the concurrent appearance of chronic abdominal pain and colonic dysmotility in patients with irritable bowel syndrome. These findings would provide a novel therapeutic strategy for stress-induced diarrhea and constipation.

研究分野：神経生理学

キーワード：消化管 排便 脊髄 大腸運動 グレリン 下行性疼痛抑制 痛み モノアミン

### 1. 研究開始当初の背景

消化管には良く発達した内在神経系が存在し、消化管機能（分泌と運動）の調節を担っている。このような内在神経系の優位性により、明らかに中枢神経系が関与する下痢や便秘（例えば、ストレス時の下痢や便秘）であっても、末梢で作用する薬剤や処置の開発に主眼が置かれている。このような状況を解消するために、消化管運動の中枢性制御機構の解明が期待されている。

研究代表者は、消化管運動に対する中枢の影響を解析できる *in vivo* の実験系を確立し、グレリンの大腸運動促進作用を発見した。また、腰仙髄部にある排便中枢に薬剤を微量投与し、排便中枢と大腸運動の機能的連関を解析するとともに、排便中枢を刺激することにより、大腸の運動障害が改善することを明らかにした。このような成果から、排便中枢の成り立ちと調節機序を解明できれば、下痢や便秘に対する新しい対応策を提言できると確信するに至った。特に近年問題となっている過敏性腸症候群（ストレスに伴う下痢や便秘）に対する治療戦略を導けると考え、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

(1) 大腸運動制御に関与する脊髄の排便中枢の成り立ちを明らかにする。

(2) 排便中枢への入力情報を同定し、大腸運動を調節する反射弓を解明する。

(3) 排便中枢をターゲットとした大腸運動の調整効果を立証する。

### 3. 研究の方法

(1) 大腸運動の制御に関与する排便中枢の成り立ちを解析するために、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* の実験系を用いて検討する。

(2) これまで明らかにしてきた脊髄排便中枢におけるグレリン作働性の機序を詳細に検討する。視床下部にあるグレリン感受性神経との違いに着目し、脊髄内に阻害剤や活性化剤を投与する方法で調べる。

(3) さまざまな神経伝達物質や生理活性物質を排便中枢に設置したカニューレより微量投与し、大腸運動の変化を記録することによって、排便中枢に作用して大腸運動を変化させる物質を網羅的に検索する。

(4) 非特異反応を除外するために、脊髄排便中枢と大腸の連絡路となる骨盤神経を切断し、作用が消失することを確認する。阻害剤を用いた薬理実験を組み合わせ、排便中枢を構成する神経の成り立ちを調べる。

(5) 同定した大腸運動を変化させる伝達物質が、脊髄の腰仙髄部で機能していることを証明するために、伝達物質とその受容体が存在するか免疫組織化学的に調べる。また、逆行性トレーサーを大腸に適用し、大腸と連絡する脊髄内の神経（脊髄副交感神経核ニューロン）を染め出した後、スライス標本を作製して同定した伝達物質に反応するか検証する。

(6) 大腸運動を調節する反射弓を同定するために、脊髄排便中枢を内在的に活性化させる刺激を検討する。大腸内に侵害刺激を与え、大腸運動が亢進するか否か *in vivo* の実験系で明らかにする。排便中枢を活性化する刺激が同定できたら、脊髄内に阻害剤を微量投与し、反応が消失することを確認する。脊髄や神経の切除を組み合わせ、反射弓の全体像を浮き彫りにする。

### 4. 研究成果

(1) 脊髄排便中枢に作用して大腸運動を促進するグレリンについて詳細な検討を行った。グレリンを脊髄排便中枢に微量投与すると、肛門側への内容液の送り出しを伴った激しい大腸圧の変動が観察された（図1A）。神経の電位依存性ナトリウムチャンネルを阻害するテトロドトキシンを排便中枢に微量投与しておくこと、グレリンの大腸運動亢進作用が消失した（図1B）ので、グレリンのターゲットは神経であることが明らかとなった。グレリン作働性神経は視床下部に存在しているため、脊髄におけるグレリン作働性神経と比較する実験を行うこととした。

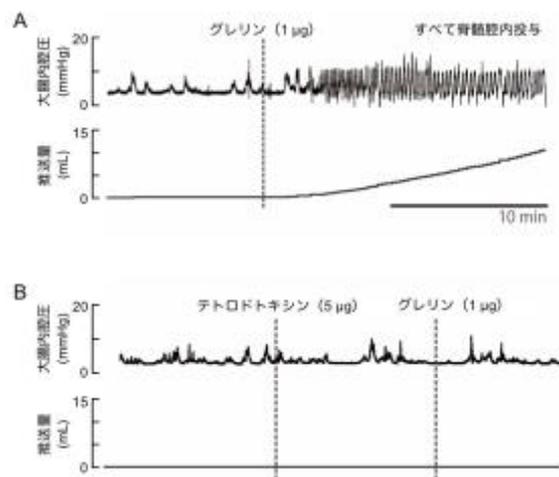


図1 グレリンの大腸運動促進作用に対するテトロドトキシンの効果

(2) 視床下部のグレリン感受性神経は、AMP キナーゼを介して活性化されることが知られている。また、レプチンにより拮抗されること、ニューロペプチドYが作用に関与することが知られている。しかしながら、脊

髄に存在するグレリン感受性神経は、AMPキナーゼを介する活性化機構がない(図2A)、レプチンによる拮抗作用がない(図2B)、ニューロペプチドYの関与がない(図2C)という点で脊髄のグレリン作働性神経は視床下部にある神経とは異なっていた。

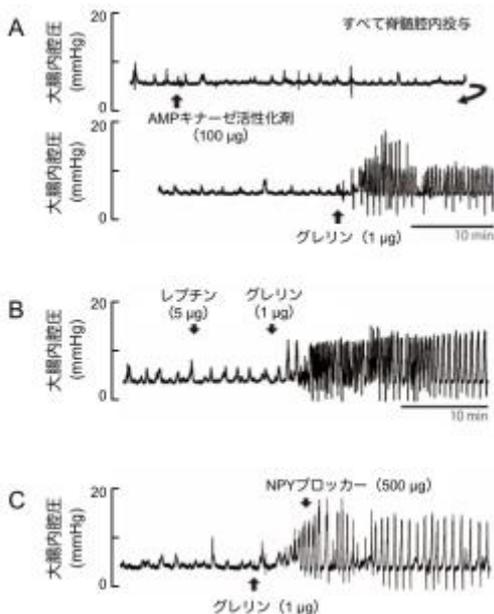


図2 脊髄排便中枢におけるグレリン感受性神経の性質

(3) グレリン以外に排便中枢に作用する生理活性物質が存在するかを検索する実験から、ノルアドレナリンが顕著に大腸運動を促進することが新たに判明した(図3)。ノルアドレナリンは下行性疼痛抑制経路のメジャーな神経伝達であり、脊髄のレベルで過剰な痛みの情報を抑制するシグナルが、大腸運動を変化させるという新規のセオリーを提唱するに至った。従来から、過敏性腸症候群において腹部の痛みや不快感と大腸運動の異常(下痢や便秘)が同時に発生することが知られていたが、この2つの症状が共存する理由については不明であった。この成果により、痛みと大腸運動障害が同時に発生することについて科学的な論拠が与えられたことになり、今後治療戦略を構築する上で大きな一歩となるものと考えられる。

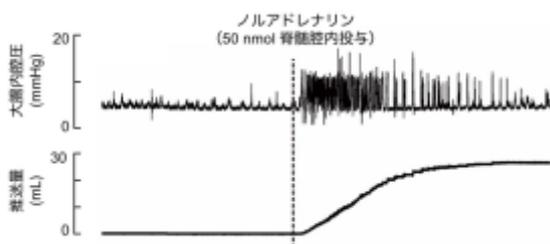


図3 脊髄排便中枢を介するノルアドレナリンの大腸運動促進作用

(4) アドレナリン作働性神経とともに、下行性疼痛抑制経路を構成するセロトニン作働性神経、ドパミン作働性神経にも同様の作用があるか否か検証した。in vivo で大腸運動を評価する実験系を用いて検証した結果、排便中枢のある腰仙髄部に微量投与したセロトニンやドパミンが、大腸運動を強く亢進することが明らかとなった(図4)。このような大腸運動亢進作用は、脊髄と大腸を繋ぐ骨盤神経の切断で消失した。薬理的な検討から、セロトニンは5HT2受容体および5HT3受容体、ドパミンはD2-like受容体を介して作用を発現することが明らかとなった。

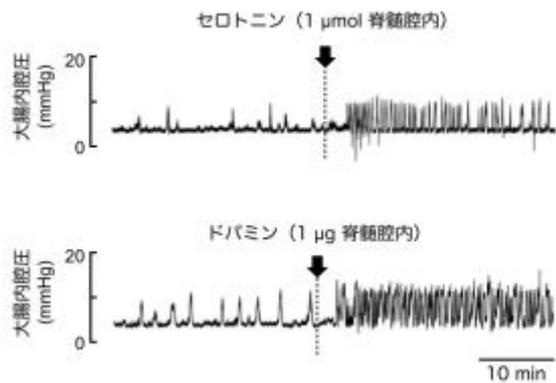


図4 脊髄排便中枢を介するセロトニンとドパミンの大腸運動促進作用

(5) さらにドパミンについて詳細な検討を行い、骨盤神経の細胞体にドパミン D2-like受容体が存在することが免疫組織化学的な実験により明らかとなった(図5)。逆行性トレーサーを大腸に適用し、大腸と連絡する脊髄内の神経(脊髄副交感神経核ニューロン)を染め出した後、スライス標本を作製しパッチクランプ法でドパミンに応答する神経を調べた(図6)。その結果、ドパミンがD2-like受容体を介して神経活動を亢進させることがわかった。このように下行性疼痛抑制経路と大腸運動の関係が、脊髄内での作用機序を含めて明らかとなった。

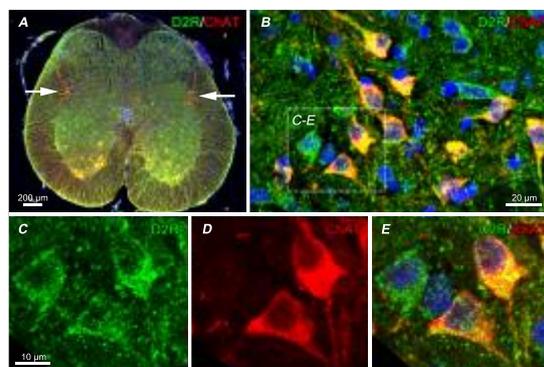


図5 脊髄排便中枢におけるドパミン受容体の存在

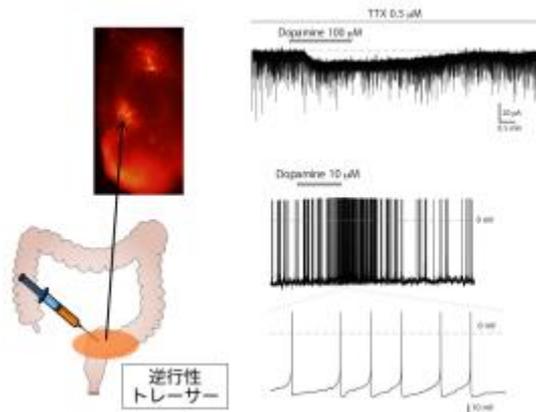


図6 大腸と連絡する脊髄神経のドーパミンによる活性化

(6) 実験的に下行性疼痛抑制経路を活性化させ、大腸運動が亢進するか否か追究することにより、脊髄のレベルで過剰な痛み情報を抑制するシグナルが大腸運動を変化させるという新規のセオリーの立証を試みた。大腸内に侵害受容器を活性化させるカプサイシンを投与したところ、大腸運動が亢進した(図7A)。このような大腸運動の亢進は、脊髄と大腸の連絡路となる骨盤神経を切除しておくで観察されなくなる(図7B)ので、大腸の粘膜下あるいは筋層間にある内在神経に起因するものではないことがわかった。また、脊髄と脳の連絡路となる胸髄の切断でも大腸運動の亢進が消失した(図7C)ので、脳を介する応答であることが示された。

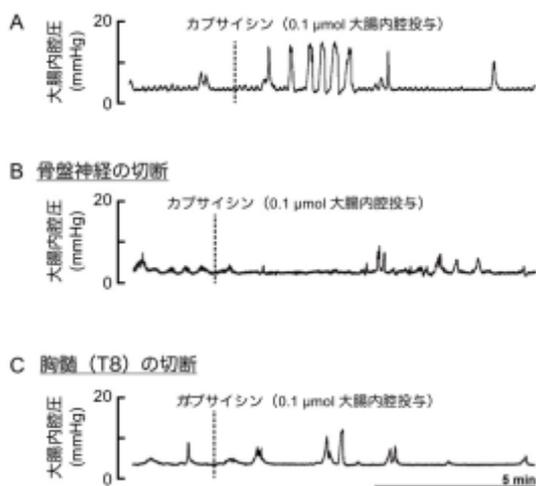


図7 大腸への侵害刺激に応答した大腸運動の亢進

(7) 脊髄排便中枢にモノアミン受容体のブロッカーを投与する実験を行ったところ、大腸内にカプサイシンを投与することで誘発される大腸運動の亢進は、ドーパミン D2-like

受容体のブロッカーおよび5HT<sub>2/3</sub>受容体のブロッカーで抑制されることが判明した。これらの結果から、大腸に起因する痛み情報が下行性疼痛抑制経路を活性化し、結果として大腸運動を亢進させることが証明された。

## 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 Naitou K, Shiina T, Nakamori H, Sano Y, Shimaoka H, Shimizu Y. Colokinetic effect of somatostatin in the spinal defecation center in rats. *J. Physiol. Sci.* 印刷中. 査読有  
doi: 10.1007/s12576-017-0524-1
- ② Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Suzuki Y, Horii K, Sano Y, Shimaoka H, Shimizu Y. Serotonin-induced contractile responses of esophageal smooth muscle in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Neurogastroenterol. Motil.* 28(11): 1641-1648, 2016. 査読有  
doi: 10.1111/nmo.12863.
- ③ Naitou K, Nakamori H, Shiina T, Ikeda A, Nozue Y, Sano Y, Yokoyama T, Yamamoto Y, Yamada A, Akimoto N, Furue H, Shimizu Y. Stimulation of dopamine D2-like receptors in the lumbosacral defecation centre causes propulsive colorectal contractions in rats. *J. Physiol.* 594(15): 4339-4350, 2016. 査読有  
doi: 10.1113/JP272073.
- ④ Shima T, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Sano Y, Shimizu Y. Does the capsaicin-sensitive local neural circuit constitutively regulate vagally evoked esophageal striated muscle contraction in rats? *J. Physiol. Sci.* 66(2): 105-111, 2016. 査読有  
doi: 10.1007/s12576-015-0401-8.
- ⑤ Shiina T, Shima T, Horii K, Naitou K, Nakamori H, Sano Y, Shimizu Y. Inhibitory action of hydrogen sulfide on esophageal striated muscle motility in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 771: 123-129, 2016. 査読有  
doi: 10.1016/j.ejphar.2015.
- ⑥ Shiina T, Shima T, Naitou K, Nakamori H, Sano Y, Horii K, Shimakawa M, Ohno H, Shimizu Y. Actions of probiotics on trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats *BioMed Research International*. Article ID 528523, 8 pages, 2015. 査読有  
doi: 10.1155/2015/528523.

- ⑦ Naitou K, Shiina T, Kato K, Nakamori H, Sano Y, Shimizu Y. Colokinetic effect of noradrenaline in the spinal defecation center: implication for motility disorders. *Sci. Rep.* 5: 12623, 2015. 査読有  
doi: 10.1038/srep12623.
- ⑧ Naitou K, Shiina T, Sugita R, Nakamori H, Shimizu Y. Characterization of ghrelin-sensitive neurons in the lumbosacral defecation center in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 27(1):147-155, 2015. 査読有  
doi: 10.1111/nmo.12492.
- ⑨ Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Sakai H, Shimizu Y. Regulation of longitudinal esophageal motility in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Auton. Neurosci.* 189:37-42, 2015. 査読有  
doi: 10.1016/j.autneu.2015.02.003.
- ⑩ Shima T, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Shimizu Y. Functional roles of capsaicin-sensitive intrinsic neural circuit in the regulation of esophageal peristalsis in rats: in vivo studies using a novel method. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306(9): G811-818, 2014. 査読有  
doi: 10.1152/ajpgi.00250.2013.
- ⑪ Aoki H, Hara A, Oomori Y, Shimizu Y, Yamada Y, Kunisada T. Neonatal lethality of neural crest cell-specific Rest knockout mice is associated with gastrointestinal distension caused by aberrations of myenteric plexus. *Genes Cells.* 19(10):723-742, 2014. 査読有  
doi: 10.1111/gtc.12172.
- ⑫ 平山晴子、樫木勝巳、椎名貴彦、志水泰武 グレリンの大腸運動促進作用, *日本薬理学雑誌* 143(6) 270-274, 2014. 査読無
- [学会発表] (計 24 件)
- ① 志水泰武、消化管運動の調節機構、第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2017.3.28
- ② 堀井和広、椎名貴彦、内藤清惟、中森裕之、佐野有希、島岡弘樹、志水泰武、A novel method for evaluating esophageal peristalsis in vivo in rats. 第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2017.3.28
- ③ 澤田梨花、内藤清惟、中森裕之、佐野有希、島岡弘樹、椎名貴彦、志水泰武、Fecal pellet at a specific part of the colorectum may differentially affect propulsive motility in upstream and downstream segments in rats. 第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2017.3.28
- ④ 内藤清惟、中森裕之、佐野有希、島岡弘樹、椎名貴彦、志水泰武、中枢神経系による排便制御における下行性モノアミン神経経路の関与、第 63 回中部日本生理学会 (岡崎) 2016.11.4
- ⑤ 椎名貴彦、嶋川真木、大野裕史、志水泰武、炎症性腸疾患モデルの病態に対するプロバイオティクスの作用、第 159 回日本獣医学会学術集会 (神奈川) 2016.9.7
- ⑥ 江原優花、中森裕之、内藤清惟、佐野有希、島岡弘樹、椎名貴彦、志水泰武、侵害刺激によるラット大腸運動の亢進作用における性差、第 159 回日本獣医学会学術集会 (神奈川) 2016.9.7
- ⑦ 中森裕之、内藤清惟、佐野有希、島岡弘樹、椎名貴彦、志水泰武、ラット脊髄排便中枢におけるモノアミン神経伝達物質の相互作用、第 159 回日本獣医学会学術集会 (神奈川) 2016.9.7
- ⑧ 中森 裕之、内藤 清惟、佐野 有希、島岡弘樹、椎名 貴彦、志水 泰武、ラット脊髄排便中枢のモノアミン神経伝達物質による大腸運動制御機構、第 58 回日本平滑筋学会総会 (仙台) 2016.8.18
- ⑨ 中森 裕之、内藤 清惟、佐野 有希、島岡弘樹、椎名 貴彦、志水 泰武、ラット大腸運動制御における脊髄モノアミン神経伝達物質の相互作用、第 26 回日本病態生理学会大会 (石川) 2016.8.6
- ⑩ 椎名貴彦、グルンゲ ヤン、内藤清惟、中森裕之、佐野有希、堀井和広、志水泰武、Alteration of neuromuscular transmissions in the colon following the onset and resolution of inflammation. 第 93 回日本生理学会大会・(札幌) 2016.3.23
- ⑪ 中森裕之、内藤清惟、佐野有希、椎名貴彦、志水泰武、Mechanism of the colokinetic effect of spinal serotonin in rats. 第 93 回日本生理学会大会・(札幌) 2016.3.23
- ⑫ 内藤清惟、中森裕之、佐野有希、椎名貴彦、志水泰武、Descending adrenergic pathways activate the spinal defecation center in rats. 第 93 回日本生理学会大会・(札幌) 2016.3.23
- ⑬ 中森裕之、内藤清惟、佐野有希、椎名貴彦、志水泰武、Colokinetic effect of serotonin is mediated by activation of lumbosacral 5-HT2 and 5-HT3 receptors in rats. 第 8 回アジア・オセアニア生理学会連合大会 (8th FAOPS Congress) (タイ・バンコク) 2015.11.23

- ⑭ 内藤清惟、中森裕之、佐野有希、椎名貴彦、志水泰武、ノルアドレナリンによる脊髄排便中枢の制御メカニズム、第 62 回中部日本生理学会（富山）2015.11.13
- ⑮ 志水泰武、内藤清惟、中森裕之、佐野有希、椎名貴彦、中枢を介する消化管運動の制御機構（シンポジウム「摂食・代謝・エネルギー調整機構研究の新たな展開」）、第 158 回日本獣医学会学術集会（十和田）2015.9.8
- ⑯ 加戸くるみ、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、佐野有希、志水泰武、ラット大腸管腔内カプサイシン投与による大腸運動亢進反応と下行性疼痛抑制系の関連、第 158 回日本獣医学会学術集会（十和田）2015.9.8
- ⑰ 椎名貴彦、内藤清惟、中森裕之、佐野有希、池田あずさ、平山晴子、志水泰武、Roles of peptides and amines in the regulation of the colorectal motility via the spinal cord. 第 92 回日本生理学会大会（神戸）2015.3.22
- ⑱ 内藤清惟、加戸くるみ、中森裕之、佐野有希、椎名貴彦、志水泰武、Intrathecal administration of capsaicin enhances the colorectal motility in rats. 第 92 回日本生理学会大会（神戸）2015.3.22
- ⑲ 中森裕之、内藤清惟、椎名貴彦、志水泰武、ラット脊髄排便中枢を介した大腸運動制御に関するセロトニンの作用機序、第 157 回日本獣医学会学術集会（北海道）2014.9.10
- ⑳ 野末祐大、池田あずさ、中森裕之、内藤清惟、椎名貴彦、志水泰武、ドパミンによる脊髄排便中枢を介したラット大腸運動亢進の作用経路、第 157 回日本獣医学会学術集会（北海道）2014.9.10
- ㉑ 内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、脊髄腰仙髄部における大腸運動制御メカニズムへのノルアドレナリンの関与、第 157 回日本獣医学会学術集会（北海道）2014.9.10
- ㉒ 内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、脊髄排便中枢におけるノルアドレナリンの作用、第 24 回日本病態生理学会大会（北九州）2014.8.9
- ㉓ 中森裕之、内藤清惟、椎名貴彦、志水泰武、ラットの脊髄排便中枢に存在するセロトニン応答性神経の作用経路、第 24 回日本病態生理学会大会（北九州）2014.8.9

- ㉔ 志水泰武、池田あずさ、古江秀昌、井本敬二、中森裕之、内藤清惟、椎名貴彦、ドパミンは脊髄排便中枢に作用してラット大腸運動を促進する、第 56 回日本平滑筋学会総会（横浜）2014.8.7

## 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

山本 欣郎 (YAMAMOTO, Yoshio)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：10252123

古江 秀昌 (FURUE, Hidemasa)  
生理学研究所・神経シグナル研究部門・准教授  
研究者番号：20304884

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

### (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