

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16120

研究課題名（和文）中枢神経系による排便制御に関わる脳領域および神経回路の特定とその機能の解析

研究課題名（英文）Identification of brain regions and neural circuits involved in defecation control by the central nervous system and analysis of their functions

研究代表者

内藤 清惟（NAITOU, Kiyotada）

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：30794903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では逆行性トレーサーを用いた排便制御に関わる脳領域の特定を行なった。感染した神経に蛍光タンパク質を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを、脊髄の排便中枢が存在する腰仙髄部に投与し、脊髄排便中枢に投射する神経を蛍光タンパク質で標識した。組織切片を作成し、蛍光タンパク質で標識された神経が存在する脳の領域を検索した。さらに、免疫蛍光染色を行うことで、蛍光タンパク質で標識された神経の性質を検討した。また、脊髄で作用する神経伝達物質の検索およびその作用メカニズムの検討を行なった。これらの結果を、英文の科学論文および国内学会にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、排便制御に関わる脳領域の一部が示唆された。また、脊髄排便中枢で作用する神経伝達物質が複数明らかになった。これまで知られていなかった、脊髄排便中枢で作用する神経伝達物質が明らかになったことで、脊髄排便中枢における排便制御メカニズムの一端が明らかになった。このことは、中枢神経系による排便制御の仕組みを解明するために必要な基礎的な情報を提供し、この分野の研究の進展に貢献するものだと考えている。また、本研究の成果は、ストレス性の腹痛や下痢など、中枢神経系が深く関わる排便障害の病態を解明するために必要となる、基礎的な情報を提供しており、社会的な意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used retrograde tracers to identify brain regions involved in defecation control. Adeno-associated viral vectors expressing fluorescent proteins in infected neurons were injected into the lumbosacral spinal cord, where the spinal defecation center is located, and the neurons projecting to the spinal defecation center were labeled with fluorescent proteins. Tissue sections were prepared and brain regions with fluorescent protein-labeled nerves were searched. The characteristics of the fluorescent protein-labeled nerves were further investigated by immunofluorescence staining. We also searched for neurotransmitters that act in the spinal cord and examined their mechanisms of action. These results were presented in scientific papers in English and at domestic conferences.

研究分野：獣医生理学

キーワード：脊髄 排便 脳

1. 研究開始当初の背景

近年、「外出ができない・うつ病になりやすい」など、著しい QOL の低下をもたらすことから、ストレスによって引き起こされる排便障害である過敏性腸症候群が大きな問題となっている。過敏性腸症候群では消化管に器質的な変化が認められないことから、脳や脊髄といった中枢神経系に原因があると想定されている。そのため、過敏性腸症候群の病態を解明するためには、中枢神経系による大腸運動の調節メカニズムを知る必要があると思われる。中枢神経系による排便の制御には、脳にある上脊髄排便中枢と脊髄の腰仙髄部にある脊髄排便中枢が重要な役割をもつと考えられている。脳にある上脊髄排便中枢が脊髄の排便中枢を促進性または抑制的に制御し、脊髄の排便中枢が自律神経系を介して大腸の運動を制御していると考えられている。しかしながら、上脊髄排便中枢と脊髄排便中枢の詳細については、今のところ不明な部分がかかり残されているのが現状であった。

2. 研究の目的

中枢神経系による大腸運動の調節メカニズムの解明が遅れている理由として、中枢神経系における基礎的な情報が不足していることが挙げられる。例えば、どのような神経伝達物質が中枢神経系での大腸運動制御に関わっているのか、脳のどのような領域が排便制御にかかわるのかなどである。そこで本研究では、中枢神経系による大腸運動の制御メカニズムを解明するために、中枢神経系で大腸運動の制御に関わる脳の領域と神経伝達物質について検討し、中枢神経系による大腸運動の制御メカニズムにおける基礎的な情報を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

排便制御に関わる脳領域を特定するために、排便制御において重要な働きをもつ脊髄排便中枢に投射する脳の神経を検索した。ラットを用いて脊髄排便中枢のある腰仙髄部脊髄に逆行性トレーサーを投与した。投与後一定期間後に脳を採取し、組織切片にして観察することで、脊髄排便中枢に投射する神経が集まっている領域を調べた。さらに、蛍光標識されている神経の性質を調べるために免疫染色を行い、蛍光標識と免疫染色による蛍光が重なるかを検討した。

排便制御に関わる神経伝達物質の検討では、これまでの研究で利用してきた、麻酔下ラットの結直腸の運動を記録できる *in vivo* 実験系を用いて検討を行った(図1)。麻酔をしたラットの結直腸にカニューレをつなぎ、マリオットボトルを用いて一定の圧力で生理食塩水を結直腸に供給し、結直腸の収縮によって押し出される生理食塩水の圧力と排出量を記録した。この実験系を用いて、脊髄に様々な生理活性物質を投与し、大腸運動が変化するかを記録することで、脊髄排便中枢で作用する伝達物質のスクリーニングを行った。さらに、スクリーニングによって作用が認められた物質に関して、その作用についてより詳細な検討を行った。

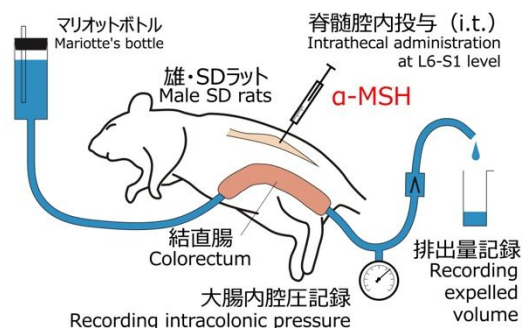


図1. 麻酔下ラットでの大腸運動記録

4. 研究成果

(1) 脊髄排便中枢のある L6-S1 領域に逆行性トレーサーを投与し、脊髄排便中枢に投射する脳の領域を調べたところ、A11 神経核領域のドーパミン作動性および延髄縫核領域のセロトニン作動性の神経が排便を制御する脊髄腰仙髄部に投射していることが明らかとなった。これらの領域を光遺伝学的および化学遺伝学的に活性化することで、大腸運動が亢進する事を明らかにした。

(2) α -メラノサイト刺激ホルモンを脊髄排便中枢に投与することで大腸運動が亢進することを見出したため、 α -メラノサイト刺激ホルモンの作用メカニズムについて詳細な検討を行った。生理食塩水を脊髄排便中枢のある L6-S1 領域に投与しても大腸の運動は変化しなかったが、 α -メラノサイト刺激ホルモンを投与したところ大腸の運動が亢進した(図2)。脊髄排便中枢に投与した α -メラノサイト刺激ホルモンが、血液を介して末梢性に作用している可能性を考えて、 α -メラノサイト刺激ホルモ

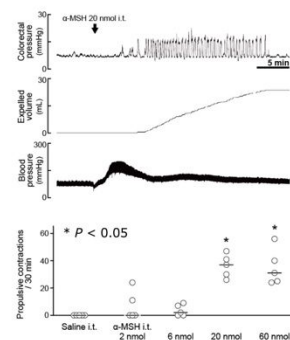


図2. α -MSHの大腸運動亢進作用

ンを静脈内投与した。-メラノサイト刺激ホルモンを静脈内投与しても大腸運動の亢進はみられなかった(図3左)。このことから、-メラノサイト刺激ホルモンは末梢ではなく、中枢で作用していることが明らかとなった。続いて、-メラノサイト刺激ホルモンの作用に脳と脊髄排便中枢の連絡が必要かを検討した。脊髄排便中枢と脳をつなぐ胸髄を切断した状態で脊髄に-メラノサイト刺激ホルモンを投与した。胸髄を切断した状態で-メラノサイト刺激ホルモンを脊髄に投与しても、大腸運動が亢進した(図3右)。これらのことから、-メラノサイト刺激ホルモンは脊髄排便中枢に直接作用しており、その作用には脳を介した神経回路は必要ないことが明らかとなった。

脊髄に投与した-メラノサイト刺激ホルモンが脊髄排便中枢に作用して大腸運動が亢進することが明らかになったため、脊髄排便中枢が大腸の運動を活性化する神経経路を調べた。脊髄から大腸へと伸びる神経経路は、自律神経系の交感神経である結腸神経と副交感神経の骨盤神経がある(図4左)。そこで、結腸神経または骨盤神経を切断した状態で-メラノサイト刺激ホルモンを脊髄に投与し、大腸運動が亢進するかを検討した。その結果、結腸神経を切断した状態でも-メラノサイト刺激ホルモンの大腸運動促進作用はみられたが、骨盤神経を切断した状態では-メラノサイト刺激ホルモンの大腸運動促進作用はみられなくなった(図4右)。このことから、脊髄に投与した-メラノサイト刺激ホルモンは仙髄の副交感神経である骨盤神経を活性化することで大腸運動を促進していることが示された。

-メラノサイト刺激ホルモンが作用する受容体としてメラノコルチン受容体が知られている。メラノコルチン受容体は1から5型までのサブタイプがあり、-メラノサイト刺激ホルモンは1、3、4、5型メラノコルチン受容体を介して作用を発揮する。そこで、脊髄排便中枢のある腰仙髄部脊髄で発現するメラノコルチン受容体のサブタイプを調べた。腰仙髄部脊髄からmRNAを抽出し、RT-PCRによって発現している受容体サブタイプを検討したところ、1型および4型メラノコルチン受容体のmRNAが検出された(図5上)。このことから、腰仙髄部脊髄には1型および4型メラノコルチン受容体が発現していると考えられる。そこで、1型または4型メラノコルチン受容体のどちらが-メラノサイト刺激ホルモンの大腸運動促進作用に関わるかを調べた。1型メラノコルチン受容体の選択的作動薬であるBMS470539または4型メラノコルチン受容体の選択的作動薬であるTHIQを腰仙髄部脊髄に投与し、大腸運動促進作用がみられるかを検討した。その結果、1型メラノコルチン受容体の選択的作動薬であるBMS470539を脊髄に投与すると大腸運動の亢進がみられたが、4型メラノコルチン受容体の選択的作動薬であるTHIQを投与しても大腸運動の亢進はみられなかった(図5下)。さらに、この結果を確かめるために、1型メラノコルチン受容体の作動薬でありかつ4型メラノコルチン受容体の拮抗薬であるSHU9119を脊髄に投与したところ、大腸運動促進作用がみられた。これらの結果から、腰仙髄部脊髄に投与した-メラノサイト刺激ホルモンは、1型メラノコルチン受容体を介して大腸運動促進作用を発揮していると考えられる。

本研究の結果から、腰仙髄部脊髄において-メラノサイト刺激ホルモンが1型メラノコルチン受容体を介して骨盤神経を活性化し、大腸運動を促進することが明らかとなった。-メラノサイト刺激ホルモンは摂食の制御に関わるホルモンとしてよく知られている。脊髄における-メラノサイト刺激ホルモンの供給元として、摂食の制御に深く関わる視床下部の弓状核が報告されている。これらのことから、本研究の結果は摂食と排便の関わりについて示唆する新しい知見だと考えられる。また、これまで脊髄で発現するメラノコルチン受容体は4型メラノコルチン受容体だと考えられてきた。本研究は脊髄で機能的な1型メラノコルチン受容体が発現することを示す初めての研究であり、その意義は大きいと考えられる。

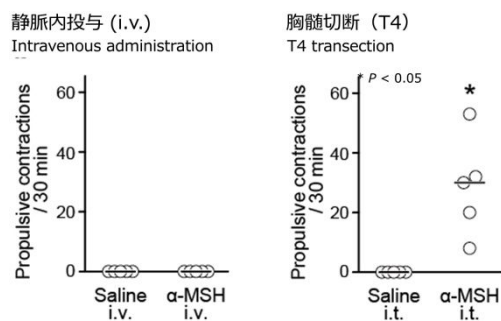


図3. α-MSHは脊髄排便中枢で作用する

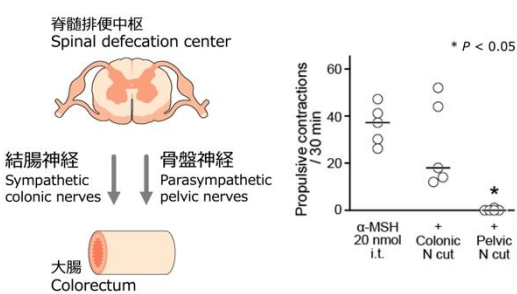


図4. α-MSHは副交感神経を活性化する

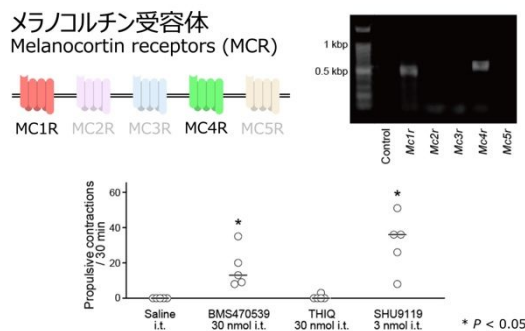


図5. α-MSHは1型メラノコルチン受容体に作用する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naitou Kiyotada, Iwashita Honoka, Ueda Hiromi H., Shiraishi Mitsuya, Fujimoto Yoshikazu, Horii Kazuhiro, Sawamura Tomoya, Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 323
2. 論文標題 Intrathecally administered substance P activated the spinal defecation center and enhanced colorectal motility in anesthetized rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G21 ~ G30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00342.2021	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 Horii Kazuhiro, Sawamura Tomoya, Onishi Ayaka, Yuki Natsufu, Naitou Kiyotada, Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 323
2. 論文標題 Contribution of sex hormones to the sexually dimorphic response of colorectal motility to noxious stimuli in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G1 ~ G8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00033.2022	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 Ueda Hiromi H., Naitou Kiyotada, Nakamori Hiroyuki, Horii Kazuhiro, Shiina Takahiko, Masatani Tatsunori, Shiraishi Mitsuya, Shimizu Yasutake	4. 巻 11
2. 論文標題 -MSH-induced activation of spinal MC1R but not MC4R enhances colorectal motility in anaesthetised rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80020-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Horii Kazuhiro, Ehara Yuka, Shiina Takahiko, Naitou Kiyotada, Nakamori Hiroyuki, Horii Yuuki, Shimaoka Hiroki, Saito Shouichiro, Shimizu Yasutake	4. 巻 599
2. 論文標題 Sexually dimorphic response of colorectal motility to noxious stimuli in the colorectum in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1421 ~ 1437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP279942	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内藤清惟
2. 発表標題 排便制御に関わる中枢神経系の神経回路の解明
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤清惟、岩下朋乃樺、植田大海、白石光也、藤本佳万、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 脊髄排便中枢におけるサブスタンスPの大腸運動促進作用
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植田大海、内藤清惟、白石光也、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 in vivo大腸運動記録を用いた -MSHによる排便促進作用メカニズムの検討
3. 学会等名 第10回 名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kiyotada NAITOU, Hiromi UEDA, Mitsuya SHIRAIISHI, Tatsunori MASATANI, Hiroyuki NAKAMORI, Kazuhiro Horii, Takahiko SHIINA, Yasutake SHIMIZU
2. 発表標題 Activation of melanocortin 1 receptor in the spinal defecation center enhanced colorectal motility in rats.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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