

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591491
 研究課題名（和文） モサプリドを利用した腸管再生・新生法
 研究課題名（英文） Enteric neural regeneration and neurogenesis by mosapride

研究代表者

藤井 久男 (Fujii Hisao)
 奈良県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：40156823

研究成果の概要（和文）：直腸癌切除手術を想定した直腸切離吻合モデルを作成し、セロトニン₄受容体（5-HT₄R）刺激薬であるクエン酸モサプリドの投与による腸壁内神経再生・新生作用を検討した。投与2週間後で手術により切断された腸壁内神経は再生して再びつながり、創傷治癒過程でできた吻合部の肉芽組織中に腸壁内神経細胞が新生していた。5-HT₄R阻害薬がこの効果を拮抗したことから、5-HT₄Rを介する作用であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In rat models those underwent rectal transection and anastomosis simulating rectal cancer surgery, effects of a 5-HT₄ receptor agonist, mosapride citrate on enteric neural regeneration and neurogenesis were investigated. Two weeks after administration of mosapride, enteric nerves dissected by the surgery were regenerated and connected at the anastomosis and enteric new neurons were observed at the granulation tissue formed during the injury-curing processes. A 5-HT₄ receptor blocker antagonized these effects, indicating that the effect of mosapride is mediated via 5-HT₄ receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景

（1）排便反射に関与する神経は直腸壁、内肛門括約筋部に分布する壁内神経系と外来神経である自律神経（交感神経である下腹神経、腰部結腸神経と副交感神経の骨盤神経）があり、後者の神経活動はさらに上位の橋排便中枢に支配されていることは、研究分担者高木都のこれまでの研究によって明らかになっている。

申請者らはモルモットを用いて、排便反射の求心路、遠心路の切断や腰・仙髄の排便反

射中枢を破壊したモデルで排便反射を測定することによって、腰部結腸神経が排便反射に強い抑制をかけているが、その抑制は排便反射が起こる時には橋排便中枢から強い抑制を受けているため働かないこと、しかもこれらの調節系は、直腸-直腸収縮反射、直腸-内肛門括約筋弛緩反射を統合的に制御していることを明らかにした（AJP GI Physiol 283:G148-156, 2002）。ついで、自律神経からなる反射経路を全て除去した急性腰・仙髄損傷モデルにおいては、壁内神経系を介する

直腸-直腸反射、直腸-内肛門括約筋反射は顕著に弱くなるが、反射指標は40%の残存にとどまり (AJP GI Physiol 285: G389-G395, 2003)、一方、慢性腰・仙髄損傷モデルにおいては、壁内神経系を介する直腸-直腸収縮反射、直腸-内肛門括約筋弛緩反射は術後4日経過すると反射指標の値は変わらないという結果を示した (AJP GI Physiol 289: G351-G360, 2005)。

(2) これらの研究成果を踏まえ、臨床で実際に行われている直腸癌手術に近いモルモット直腸切離吻合モデルを作製し、腸管切除に伴う壁内神経の切離吻合術後の変化を排便反射に注目して測定した。損傷された壁内神経は自然に再生するのに術後8週間もかかった。しかし、BDNF (brain-derived neurotrophic factor) を局所投与すると、術後2週間で排便反射の回復と吻合部を跨いだ腸壁内神経系の再生が起こった。また、直腸切離吻合部において、BDNFにより神経幹細胞からの神経新生が起こっており (AJP GI Physiol. 294: G1084-1093, 2008)、立派な新しい壁内神経節が複数形成されていた。この成果は日本経済新聞にも掲載され臨床現場の外科医からの手紙を初め、大きな反響を呼んだ。

しかし、BDNFは、吻合部位に炎症反応を惹起し、さらに直腸癌の転移に係わる tyrosine kinase receptor B (TrkB) の発現を増強するという臨床適応には致命的な欠陥が見つかった。

(3) そこで、本研究では、排便反射を促進する作用を有する低分子化合物である 5-HT₄ 受容体刺激薬、クエン酸モサプリド (AJP GI Physiol 285: G389-395, 2003; AJP GI Physiol 289: G351-360, 2005) の、世界で初めて発見された腸壁内神経系再生促進作用 (Neurogastroenterol Motil 22: 806-13, 2010) のメカニズムの解明や、病態モデルにおける腸壁内神経再生・新生作用を、生理学の専門家との共同研究にて明らかにし、臨床における治験研究の基盤となるエビデンスを得ることが求められていた。

2. 研究の目的

(1) 22年度には、ラットで腸管切離吻合モデルを作成し、5-HT₄ 受容体刺激薬、クエン酸モサプリド (以下、モサプリド) の壁内神経系再生促進作用の起こるメカニズムを解明する研究を、免疫組織化学的研究と並行して進める。さらに、腸壁内神経新生作用についても免疫組織化学的研究と並行して、そのメ

カニズムの解明もラットを使って進める。

(2) 23-24年度には、モサプリドを局所投与や飲水によって全身性に投与し、腸管切離吻合モデル、老齢や糖尿病のモデルラットで神経再生・新生促進作用を発揮するかどうかを検討する。さらに、再生・新生した神経系の性質やそのネットワークの生理的機能を *in vivo* で評価する。ポジティブな結果が得られたならば、臨床治験研究へと展開するための基盤となりうる。

3. 研究の方法

(1) 平成22年度

腸管切離吻合モデルで5-HT₄ 受容体刺激薬、モサプリドの局所投与による壁内神経系再生・新生促進作用とそのメカニズムの解明を GFP ラットや免疫組織化学的評価法を用いて行う予定であったが別のアプローチを考えた。すなわち、モサプリドを含ませたスポンゼを皮下に植え込み3日間放置してスポンゼを回収して動員されてきた細胞の免疫組織学的検索と RT-PCR による mRNA の分子生物学的検討を行う。

再生した神経の由来を検討するためには、まず、ラットの直腸切離吻合部にモサプリドを含ませたスポンゼを巻いて局所投与する (AJP GI Physiol 294:G1084-1093, 2008)。ついで、1-2-4週間後に摘出してホルマウント標本をつくり、固定後、neurofilament (NF) 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡下で観察する。また、吻合部の肉芽組織の切片を作成し、抗 NF 抗体、抗 PCNA (細胞増殖マーカー) 抗体、抗 p75 (神経堤由来神経幹細胞マーカー) 抗体、または抗 DLX2 (神経幹細胞マーカー) 抗体で染色し、神経幹細胞がどこから由来するかを明らかにする。

さらに、術後2週間 BrdU を飲ませたラットの吻合部の肉芽組織の切片を作成し、NF と二重染色することにより神経の新生を確認する (AJP GI Physiol. 294:G1084-1093, 2008)。

(2) 平成23-24年度

①老齢や糖尿病や脊髄損傷モデルラットにおけるモサプリドの局所投与の効果を調べる。

老齢や糖尿病モデルラットにおいては、腸壁内神経細胞の数がアポトーシスにより減少することはよく知られている。最近、我々に続いて他のグループからも、異なった 5-HT₄ 受容体刺激薬が老齢マウスにおいて抗アポトーシス作用で腸壁内神経細胞の数の減少を阻害し、逆に増加させたという報告がなされている (J Neurosci 29:9689-9699, 2009)。

そこで、老齡ラットまたは糖尿病モデルラットを購入し、モサプリドを注入したミニオスモポンプを腹腔内に植え込み、2週間持続投与して腸壁内神経細胞の細胞数が増加するかどうかを調べる。さらに、DMSO 0.2%を注入したミニオスモポンプの効果と比較検討し、下部結腸・直腸を摘出固定後、切片を作製し、NF抗体で染色後、細胞数を数える。TUNEL染色も合わせて行う予定であったが、予備的に行った老齡マウスでは、モサプリドによる細胞数の増加効果はあまり顕著でなかったため、延期した。

また、最近、脊髄損傷ラットモデルにおいて、脊髄損傷4週後の回復と5-HT transporterと5-HTの免疫活性の回復が関連しているという報告がなされている(Arch Orthop Trauma Surg 129: 1279-1285, 2009)。そこで、腰仙髄の椎骨を除去し露出した硬膜を動脈用のクリップで3秒間圧迫刺激を加えて脊髄損傷を生じさせる。モサプリド10-100 μM またはDMSO 0.2%をしみこませたスポンゼルを損傷部位にあてて、脊髄損傷による排尿障害の回復と腰仙髄の5-HT transporterと5-HTの免疫活性の回復を免疫組織化学的検索によって明らかにする。しかし、これは排尿障害が起こり、ラットのケアが必要なため計画を延期した。

②腸管切離吻合モデル、老齡や糖尿病モデルラットや脊髄損傷ラットモデルにおけるモサプリドの飲水による全身性投与の効果

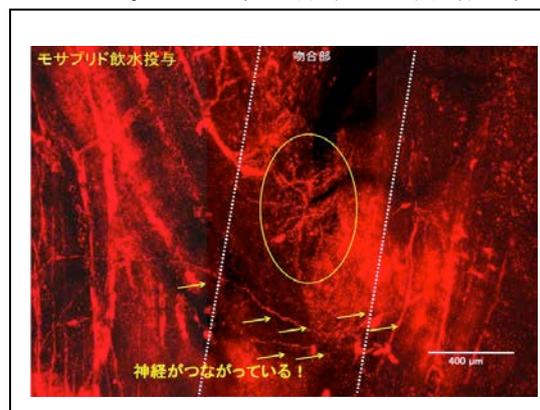
モサプリドの神経再生・新生作用を消化器外科の臨床現場、高齢者や糖尿病・脊髄患者に適用して、排便障害や排尿障害を改善できるようにするためには、その前に臨床治験研究が必須であるが、その前に動物実験として飲水による全身性投与の効果を検討することが必要である。飲水中のモサプリドの濃度は100 μM で50 $\mu\text{l/day}$ (人の一日投与量の3倍にあたる)の割合で飲ませる。順次、腸管切離吻合モデル、老齡や糖尿病のモデルラット、脊髄損傷ラットモデルで投与量を変えて検討する。効果の判定はこれまでと同様である。

4. 研究成果

(1) セロトニン4受容体の刺激薬である、モサプリドの作用の検討を野生型のラットで行った。モサプリドの投与は、局所投与と臨床応用を考えて飲水投与を行った。直腸の切離吻合モデル野生型ラットを作製し、1週目、2週目と腸壁内神経の再生・新生過程を免疫組織学的に観察した。その結果、吻合部(点線で示す)を越えての腸壁内神経の再生は、局所投与と飲水投与で同じように起こること

を見いだした(下図)。この局所投与による成果を、第52回日本平滑筋学会総会で発表した。

再生した神経は、主としてNO作動性神経で、一部コリン作動性神経を含むという結果であった。さらに、吻合部の肉芽組織は、ラ



ットでは、モルモットと異なり広範囲に厚く形成された。この吻合部の組織切片を作製して、免疫染色を行った。抗PCNA抗体(細胞増殖マーカー)、抗DLX2抗体(神経幹細胞のマーカー)、抗SR4抗体(セロトニン4受容体)および抗NF抗体で陽性に染色された細胞の数を求めたところ、モサプリドにより、それらの陽性細胞数は有意に増加しており、神経幹細胞の動員と神経細胞への分化が認められた。投与方法の違いの有無も検討したが、飲水投与の方が、局所投与に比べて神経新生の効果が強い傾向を示したが、どちらの投与方法でも、神経幹細胞から神経新生を促進する結果が得られた。

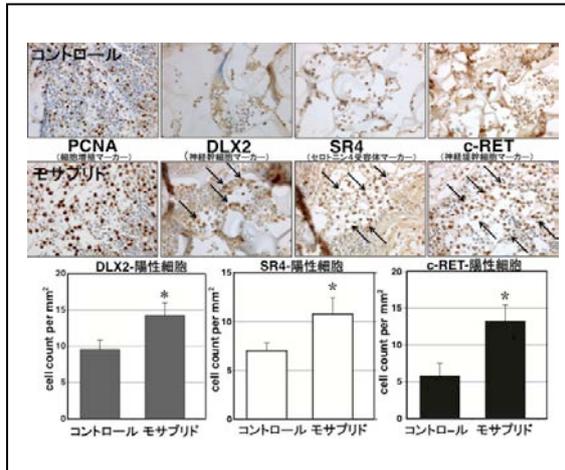
さらに、モルモットと異なり、神経増殖マーカーであるBrdUを2週間飲ましたラットで、どちらの投与方法でも吻合部から3mm口側、肛門側の少し離れた部位にも新生神経を認めた。ラットは、細胞増殖能が強いと思われる。

一方、再生神経の生理機能の回復を確認するために、直腸伸展により誘発される内肛門括約筋弛緩反射を調べる必要があったが、ラットでは、外来神経の影響が強く、なおかつ実験時に使用するウレタン麻酔により抑制されてしまうので、確認することができなかった。これらの成果は、第53回日本平滑筋学会総会で発表した。

(2) ついで、神経幹細胞がどこから由来するかを検討するために、モサプリドを吸収したスポンゼルを皮下に植え込み、移動してきた細胞の免疫染色(抗PCNA抗体、抗DLX2抗体、抗c-RET抗体、抗SR4抗体)とRT-PCRを行い、神経堤由来の神経幹細胞が吻合部に動

員されてくる可能性を検討した。

その結果、DLX2, c-RET, SR4 陽性細胞はモサプリドの作用により有意に増加し(下図)、DLX2, c-RET, SR4 の mRNA もモサプリドにより有意に増加した。この結果は、皮下に植え込んだスポンゼルに向かって神経幹細胞が動員されてくるのをモサプリドが促進していることを示し、直腸の切離吻合部でも同様のことがおこる可能性が示唆された。



これらの成果は、第104回近畿生理学談話会と第5回J-FD研究会で発表した。そして論文として、American Journal Physiology Gastrointestinal Physiology 302: G588-G597, 2012 に発表した。

(3) モルモットでは、モサプリドの飲水による全身性投与の効果を調べるためにモサプリドを飲水投与1-4週間行い、直腸-内肛門括約筋弛緩反射の有無と程度を1、2週目と4週目で解析した。その結果、2週目で8割程度反射は回復し、4週目で完全に回復した。再生した壁内神経が生理的機能を果たしていることを証明できた。

(4) ヒルシュスプルング病モデルマウスであるWS4マウスの譲渡を国立がんセンター松島先生から受け、モサプリドの飲水による全身性投与1週間で先天性の壁内神経欠損に対する治癒効果を調べた。

実験に用いたWS4マウスは、ヘテロ体であるため、腸壁内神経系の欠損状態がマイルドであったため、効果の判定がむずかしく、結論を得ることはできなかった。本来であれば、ホモ体で調べたかったが、ホモ体は致死性であり、本研究機関への輸送途中で死亡したため検討できなかった。

(5) 新生した神経細胞のソースを明らかにするため、間葉系幹細胞と中枢神経系由来(海

馬側脳室下帯 HSVZ 由来)の神経幹細胞の培養を行いモサプリドの効果を検討した。

その結果、モサプリドは、中枢神経系の神経幹細胞の神経軸索の伸長を促進したが、間葉系幹細胞は6日間培養したが効果はなかった。従って、間葉系幹細胞よりは神経幹細胞の方が、新生神経細胞のソースの可能性が高いと考えられる。

そこで、この神経幹細胞から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。その結果、モサプリドを作用させると、Htr4 (セロトニン4受容体) と Gfr α 1 (GDNF 受容体) の RNA は、軽度に増加していたが、Ednrb (エンドセリン受容体 B) と Ret (癌原遺伝子チロシンタンパクキナーゼ受容体) は全く変化なかった。

この検討は、外注で行ったので経費が高額であるため一度しかしていない上、モサプリドの処理期間もわずか4日間なので、この結果だけからモサプリドの作用機序について結論を得ることはできなかった。しかし、これらの研究成果を研究分担者の高木が第90回日本生理学会大会入澤賞シンポジウムで発表した。

(6) 本科学研究費の年度は超えるが、2013年4月現在から、糖尿病モデルマウス(TSODマウス)を購入して、モサプリドを1年半から1年10ヶ月飲水投与により末梢神経障害等を阻止することができるかどうかの検討を始めたところである。

(7) 本研究のこれまでの成果により、直腸癌切除術を受けた患者さんのみならず、高齢の患者さんや、糖尿病や脊髄損傷の患者さんにとっても失われた神経細胞を取り戻し、排便機能をはじめ様々な消化管機能の回復が早期に可能になる臨床応用への基盤となるエビデンスは十分に得られたと思われる。また、これらの成果は、患者さんの生活の質(QOL)の上昇はもちろんその周囲の家族(介護者)の負担軽減ももたらすことができ、臨床医学への貢献は計り知れない。もちろん、医療経済学的にも、その意義は大きいと思われる。

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3件)

① Kawahara I, Kuniyasu H, Matsuyoshi H, Goto K, Obata K, Misawa H, Fujii H,

Takaki M, The comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT₄ receptor agonist on in vivo neurogenesis at the recta anastomosis in rats, *American Journal Physiology Gastrointestinal Physiology*, 査読有, 302, 2012, G588-G597 (doi:10.1152/ajpgi.00284.2011)

- ② Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Kawahara I, Goto K, Zhang GX, Obata K, Kuniyasu H: In vitro enhanced differentiation of neural networks in ES gut-like organ from mouse ES cells by a 5-HT₄-receptor activation, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 406, 2011, 529-533
- ③ 高木 都、松吉ひろ子、國安弘基、勝井 鎌太、排便機能障害とその治療の新しい可能性、*日本病態生理学雑誌*、査読無、19(2)、2010、20-27

[学会発表] (計 8 件)

- ① Takaki M, Kuniyasu H, Kawahara I, Goto K, Matsuyoshi H, In vivo neural regeneration and neurogenesis promoted by 5-HT₄ receptor activation. *Neuro-gastroenterology and Motility 2012 Joint International Meeting*, in Bologna, Italy, September 6-8, 2012
- ② 高木 都、2MS4B-5 下部消化管の生理機能-排便反射機構の神経性調節、第 90 回日本生理学会大会入澤宏・彩記念 JPS 優秀論文賞 (入澤賞) シンポジウム、東京、2013/3/28
- ③ 川原 勲、國安弘基、後藤 桂、小畑孝二、藤井久男、高木 都、選択的セロトニン再取り込み阻害薬とセロトニン受容体作動薬が腸壁内神経損傷後の in vivo 神経再建に与える効果の比較 第 5 回 J-FD 研究会、東京、2012/11/10.
- ④ 川原 勲、松吉ひろ子、國安弘基、後藤 桂、小畑幸司、藤井久男、高木 都、選択的セロトニン再取り込み阻害薬、フルボキサミンマレイン酸塩の腸壁内神経損傷後の in vivo 再建に対する効果、第 104 回近畿生理学談話会、大阪医科大学、2011/10/1

⑤ 後藤 桂、加藤 剛、國安弘基、松吉ひろ子、川原 勲、藤井久男、鍋倉淳一、高木 都、5-HT₄ 受容体作動薬モサプリドによるマウス回腸切離吻合術後の腸壁内神経再生・新生促進作用の 2 光子顕微鏡による in vivo イメージング法での解析、第 53 回日本平滑筋学会総会、ゆうぼうと東京、2011/8/3-4

- ⑥ 川原 勲、松吉ひろ子、國安弘基、後藤 桂、小畑孝二、藤井久男、高木 都、選択的セロトニン再取り込み阻害薬、フルボキサミンマレイン酸塩の腸壁内神経損傷後の in vivo 再建に対する効果、第 53 回日本平滑筋学会総会、ゆうぼうと東京、2011/8/3-4
- ⑦ Takaki M, Matsuyoshi H, Kuniyasu H, Misawa H, Katsui R, Fujii H, Zhang G-X, Obata K, Takeshita D, The role of ENS and ICC in Gastrointestinal motility disorders, Invited Neuroscience Seminar at Vermont University, Burlington in Vermont, 2010/9/24
- ⑧ Takaki M, Matsuyoshi H, Misawa H, Katsui R, Fujii H, Kuniyasu H, Pathophysiological pathways in gastrointestinal disease: gastrointestinal motility disorders, The 6th International Congress of Pathophysiology "Gene-environment interaction in health and disease. (Symposium 1 Pathophysiological pathways: Gastrointestinal and lung diseases. Keynote speaker), Montréal Convention Centre, Canada 2010/9/22-25

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 久男 (Fujii Hisao)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40156823

(2) 研究分担者

高木 都 (Takaki Miyako)
奈良県立医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：00033358

(3) 研究協力者

川原 勲 (Kawahara Isao)
奈良県立医科大学・大学院医学研究科・院
生
後藤 桂 (Goto Kei)

奈良県立医科大学・大学院医学研究科・院
生

三澤 裕美 (Misawa Hiromi)

奈良県立医科大学・医学部・教務職員