

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780291

研究課題名(和文) 新生子期の食道における神経系および筋細胞の機能的特徴

研究課題名(英文) Functional features of esophageal neural control and muscle cells in neonatal animals

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新生子ラットの食道に対する神経支配および食道筋の性質の変化を解明した。(1)新生子の食道運動は迷走神経によって支配されていること、(2)成長に伴って、横紋筋の反応は増強していくのに対して、平滑筋の反応は消失していくこと、(3)食道横紋筋のアセチルコリンに対する反応性(感受性)が成長に伴って変化すること、(4)新生子の食道には、成熟動物の食道とは異なって、ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットおよびギャップ結合が発現していることを明らかにした。これらの特性により、新生子の食道運動は適切に調節されていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify postnatal changes in neural control of esophageal motility and characters of esophageal muscles in rats. The main findings are: (1) the vagus nerves directly innervate both the striated and smooth muscles and control their motility in the early neonatal period, (2) striated muscle reactions gradually enlarge with age in days, whereas smooth muscle responses decline during the first week after birth, (3) sensitivity of acetylcholine to the esophageal striated muscle decrease with age in days, (4) the gamma-subunit of nicotinic acetylcholine receptors and gap junction are expressed in the neonatal esophagus but not the adult esophagus. These specific features might contribute to appropriate regulation of esophageal motility in neonatal animals.

研究分野：農学

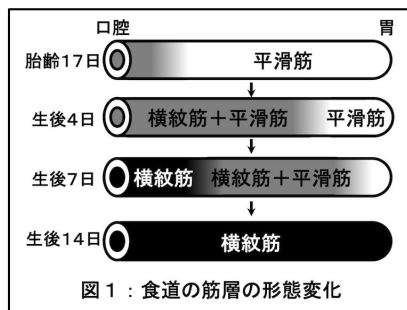
科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：食道 新生子 腸神経系 筋細胞 食道疾患

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物では、離乳期に誤嚥や胃食道逆流症といった食道に関連した疾患が多く発生する。これまで、離乳期の食道疾患は、母乳（液体）から固形物に食物が変化するために起こると考えられてきた。一方、ラットやマウスの食道筋は、出生直後からおよそ2週間かけて、平滑筋から横紋筋へと大きく変化する（図1）。この変化が完了する時期は、ちょうど新生子の食物が母乳から固形飼料へと代わる時期に一致している。そのため、離乳期の食道疾患には、食道機能の劇的な変化も関連していることは十分予想できていた。

しかし、食道に関する研究は主に形態学的手法によって行われてきており、機能面の変化は不明なままであった。本研究は、機能学的なアプローチで新生子期の食道の変化に迫るという点で、従来の研究では不明なままであった事象を解明できるものと考えられた。



2. 研究の目的

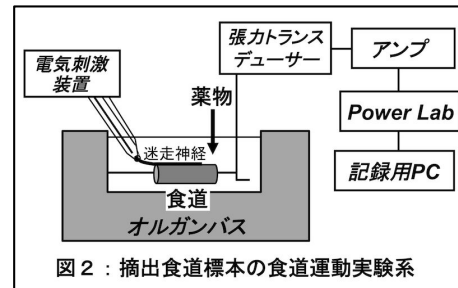
研究代表者は、なぜ、離乳期に誤嚥や胃食道逆流症といった食道に関連した疾患が多く発生するのか、という問題を究明し、その予防や治療法の確立に貢献したいと考えてきた。特に、新生子期の食道筋に見られる筋細胞の形態変化に注目し、ここに離乳期の食道疾患の病態解明の鍵があると踏んでいた。この仮説を証明するためには、構造がダイナミックに変化する新生子期の食道が、機能的にどのような変化を起こしているのかを詳細に解明する必要がある。

そこで本研究では、新生子食道の形態および機能変化を詳細に解明することを目的として行った。具体的には、新生子期において食道運動を制御している神経回路の特徴や、哺乳期および離乳期動物における食道平滑筋および横紋筋細胞の性質を解明することを目的とした。明らかにした特質が食道疾患と関連しているかどうかを追究し、離乳期に見られる食道疾患の予防・治療法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 食道運動の *in vitro* (*ex vivo*) 記録法
実験動物から食道を摘出し、図2に示したような実験装置に食道をセットした。食道を

支配する迷走神経を電気刺激して食道標本の収縮運動を惹起させ、この運動を記録した。薬物投与前後で食道運動がどのように変化（増強または抑制）するのかを調べた。



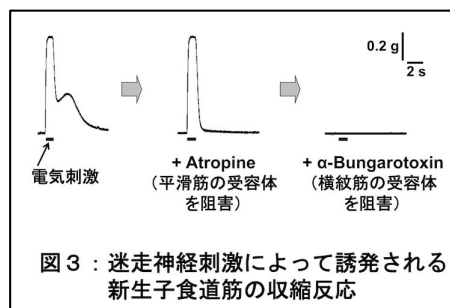
(2) RT-PCR 法

組織から Total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、PCR を行い、組織で発現している遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1) 新生子食道に対する神経支配

まず、出生間もない動物の食道における横紋筋および平滑筋運動がどのような神経によって制御されているのかを明らかにした。出生直後から2週齢までの新生子ラットから食道を摘出して食道運動を記録した。神経支配について調べるために、外来神経（迷走神経）を電気刺激したところ、2相の収縮反応が生じた（図3）。薬理的解析により、1相目の早い反応は横紋筋、2相目の遅い反応は平滑筋の反応であることが判明した。出生直後の食道では、明確な2相の反応が迷走神経刺激により誘導されたものの、日齢を追うごとに、2相目の平滑筋の反応が減弱していき、1週齢ではほとんど消失した。1相目の横紋筋の反応はより張力を増していった。以上の結果は、新生子期食道の横紋筋および平滑筋の運動はともに迷走神経によって支配されていることを示している。また、成長に伴って、食道平滑筋細胞の消失あるいは平滑筋に対する神経支配の変化が生じることが示唆された。



(2) 新生子食道の筋細胞の性質

新生子の食道平滑筋および横紋筋細胞の性質を解明することに焦点を当てて、研究を

行った。筋収縮を引き起こす因子であるアセチルコリンを食道標本に適用して、収縮反応を誘発するかどうかを調べた。その結果、アセチルコリンに対する反応性(感受性)が成長に伴って変化することを明らかにした(図4)。

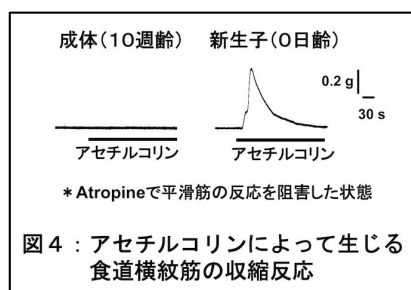


図4：アセチルコリンによって生じる食道横紋筋の収縮反応

次に、新生子食道におけるアセチルコリン受容体の発現動態が、日齢を追うごとに変化するかどうかを調べた。ニコチン性アセチルコリン受容体を構成するサブユニットの発現を RT-PCR により検出したところ、出生直後のラットの食道には、ニコチン性アセチルコリン受容体 サブユニット mRNA が発現していることが明らかとなった(図5)。このサブユニットは成熟ラットの食道には発現していなかった。一方、サブユニットは成体ラットには発現しているもの、新生子期は発現していないことが判明した。このような受容体の発現変化により、食道筋のアセチルコリンに対する反応性(感受性)は変化すると考えられる。

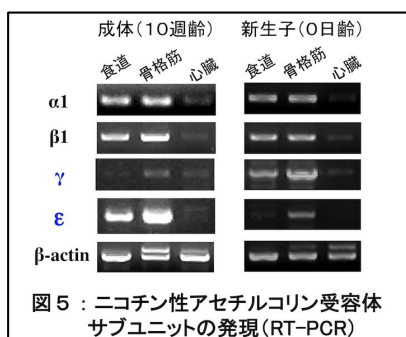


図5：ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットの発現(RT-PCR)

さらに、新生子期の食道に特有な機構があるかどうかを探索した。そのひとつとして、成体食道では平滑筋に見られる「ギャップ結合」に注目し、新生子食道横紋筋にそれが発現しているか調べた。新生子食道にはギャップ結合を形成するタンパク質をコードする遺伝子が発現していることを明らかにした。また、新生子食道の収縮運動がギャップ結合阻害薬により抑制されること見出した。

(3) 結論

以上のように、新生子期の食道は、成体期にはない特徴を有しており、成長に伴って特性が変化していくことが明らかとなった。これらの特性により、新生子の食道運動は適切に調節されていると考えられる。

離乳期に見られる食道疾患には、食道運動

の異常により発生するものが多い。これらの疾患は、本研究で明らかにした新生子食道の特性と関連している可能性がある。

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9件)

(1) 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: G811-8, 2014 査読あり

(2) Shiina, T., Koga, M., Saito, S., Atoji, Y., Takewaki, T., Shimizu, Y.: Development of longitudinal smooth muscle in the posterior mesenteric artery and purinergic regulation of its contractile responses in chickens. *J Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 199: 857-865, 2013 査読あり

(3) Shiina, T., Gurung, Y.B., Suzuki, Y., Takewaki, T., Shimizu, Y.: Alteration of neuromuscular transmissions in the hamster colon following the resolution of TNBS-induced colitis. *J. Physiol. Sci.* 63: 241-249, 2013 査読あり

(4) Shiina, T., Shima, T., Suzuki, Y., Shimizu, Y.: Inhibitory actions of a local neural reflex on propulsive activity of the esophageal striated muscle portion in rats. *Res. Vet. Sci.* 94: 331-335, 2013 査読あり

(5) Iwami, M., Alkayed, F., Shiina, T., Taira, K., Shimizu, Y.: Activation of brown adipose tissue thermogenesis by electrical stimulation to the dorsal surface of the tissue in rats. *Biomed. Res.* 34: 173-178, 2013 査読あり

(6) Shiina, T., Shima, T., Suzuki, Y., Wörl, J., Shimizu, Y.: Neural regulation of esophageal striated muscle in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Auton. Neurosci.* 168: 25-31, 2012 査読あり

(7) Nakamori, C., Shiina, T., Shimizu, Y.: Postnatal changes in vagal control of esophageal muscle contractions in rats. *Life Sci.* 90: 495-501, 2012 査読あり

(8) Abe, C., Iwata, C., Shiina, T., Shimizu, Y., Morita, H.: Effect of daily linear acceleration training on the hypergravity-induced vomiting response in house musk shrew (*Suncus murinus*). *Neurosci. Lett.* 502: 138-142, 2011 査読あり

(9) 椎名貴彦, 志水泰武: 嘔吐する小型実験動物スunksの食道における内在神経性制御. *日本病態生理学会雑誌* 20: 21-23, 2011 査読なし

〔学会発表〕(計14件)

(1) 椎名貴彦, 嶋剛士, 内藤清惟, 中森裕之, 志水泰武: ラット食道蠕動運動の制御におけるカプサイシン感受性神経の機能的役割 第 91 回日本生理学会大会 (鹿児島) 2014.3.18.

(2) 椎名貴彦, 内藤清惟, 中森裕之, 志水泰武: ラット食道横紋筋運動の制御における硫化水素の役割. 第 60 回中部日本生理学会 (岐阜) 2013.10.25.

(3) 椎名貴彦, 志水泰武: コリン作動性および非コリン作動性因子によるスunks食道運動の調節. 第 156 回日本獣医学会学術集会 (岐阜) 2013.9.20.

(4) 椎名貴彦, 内藤清惟, 志水泰武: 嘔吐する実験動物スunksの食道運動に対する調節機構. 第 23 回日本病態生理学会大会 (東京) 2013.8.3.

(5) 椎名貴彦, 内藤清惟, 池田あずさ, 志水泰武: 脊髄排便中枢を介したラット大腸運動促進作用におけるドパミンの役割. 第 12 回生体機能研究会 (群馬) 2013.7.27.

(6) 椎名貴彦, 志水泰武: スunks食道運動に対するコリン作動性および非コリン作動性制御機構. 第 90 回日本生理学会大会 (東京) 2013.3.28.

(7) 椎名貴彦: 嘔吐する小型実験動物スunksの食道運動研究. 文部科学省特別経費プロジェクト“脳と末梢”主催シンポジウム「スunksを用いた脳-末梢関連研究」(招待講演)(埼玉) 2013.2.16.

(8) 椎名貴彦, 安田昇平, 志水泰武: 嘔吐する小型実験動物スunksの食道運動を制御するコリン作動性および非コリン作動性機構. 第 59 回中部日本生理学会 (岡崎) 2012.11.17.

(9) 椎名貴彦, 志水泰武: ラット食道横紋筋運動に対する硫化水素の抑制効果. 第 154

回日本獣医学会学術集会 (盛岡) 2012.9.16.

(10) 椎名貴彦, 池田あずさ, 鈴木隼人, 安田昇平, 志水泰武: 硫化水素によるラット食道横紋筋運動の抑制性制御. 第 22 回日本病態生理学会大会 (大分) 2012.8.5.

(11) 椎名貴彦, 志水泰武: 嘔吐する小型実験動物スunksの食道縦走方向運動に対する制御機構. 第 54 回日本平滑筋学会総会 (東京) 2012.8.2.

(12) 椎名貴彦, 志水泰武: スunks食道運動に対する神経性制御機構. 第 89 回日本生理学会大会 (松本) 2012.3.31.

(13) 椎名貴彦, 藏本博史, 志水泰武: 嘔吐する小型実験動物スunksの食道運動に対する内在神経による制御機構. 第 152 回日本獣医学会学術集会 (大阪). 2011.9.19.

(14) 椎名貴彦, 志水泰武: 嘔吐する小型実験動物スunksの食道における内在神経性制御. 第 21 回日本病態生理学会大会 (東京). 2011.8.20.

〔図書〕(計1件)

Shiina, T. and Shimizu, Y.: Neural regulatory mechanisms of esophageal motility and its implication for GERD. p. 3-20, In *Gastroesophageal Reflux Disease* (ISBN: 978-953-51-0314-1), M. Bortolotti (ed.), InTech., Croatia, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www1.gifu-u.ac.jp/~yshimizu/physiology/top_page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: