

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590950

研究課題名(和文) 成長過程におけるストレス応答と腸管グリア細胞による内臓知覚過敏とその包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for mechanism(s) of visceral hypersensitivity associated with morphological changes in glial cells response to stress during a growth process

研究代表者

富永 和作 (Tominaga, Kazunari)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80336768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：出生直後の母子分離モデルと成熟期における水浸疲労ストレス負荷は、大腸腸管神経系構成成分である神経細胞の構成割合には影響せず、グリア細胞突起が神経細胞を取り巻く状態からその中心部に向かって伸長させること、突起形態もfilamentous型からleaf-like型へと変化することが初めて捉えられた。さらに、これら形態変化はストレス強度に応じて増大することも判明した。ストレス負荷を受けた腸管を摘出し、アセチルコリン刺激・フィールド電気刺激すると腸管収縮の増大反応が認められた。

研究成果の概要(英文)：Male Wistar rats underwent 3-h maternal separation (a chronic stress) during postnatal days 2-14 and 4-h water-immersion stress (an acute stress) in adulthood (at 8 weeks). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and the number of enteric neurons were unchanged by these stresses. The density of GFAP-positive EGC processes overlapped with the neurons and the extent of bulbous swelling of terminals increased according to the stress intensity: control, acute stress, maternal separation, and combination. Electrical field stimulation (EFS)-induced colonic contractions were significantly greater in the combined stress rats than in controls. Colonic EGCs exhibited structural alterations according to the stress intensity and associated with stress-induced colonic hyper-contraction, which may underlie the pathogenesis of irritable bowel syndrome.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸管グリア細胞 腸管収縮反応 知覚過敏 過敏性腸症候群 ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年増加している過敏性腸症候群などの機能性消化管障害の、病態生理において重要とされる内臓知覚過敏は、消化管粘膜における粘膜上皮細胞、深部の腸管神経系、両者間を介在する液性因子など、種々の要因が関与していることが想定されている。しかし、その詳細は明らかにされていない。一方、機能性消化管障害患者における疫学研究において、幼少期における身体的・精神的なストレスの関与が、その後の内臓知覚過敏へと影響することも示唆されてきた。つまり、幼少期から成熟期への成長過程におけるストレス応答に対する腸管神経系(enteric nervous system: ENS)への関与の結果として、内臓知覚過敏あるいは腸管生理機能の過敏反応が出現することが推察される。さらに、種々の液性因子を産生し、ENS構成成分のひとつである腸管グリア細胞(enteric glial cell: EGC)が、ストレス応答に対して傷害・保護両面の挙動を示すことから、内臓知覚過敏の病態生理を探求する上で、変動・調節因子として重要であることが推察されるが、これら観点から検討した報告はない。

2. 研究の目的

中枢神経系におけるグリア細胞には3種が存在し、中でもアストロサイトやミクログリアは、神経変性疾患や急性期炎症後の神経伝導回路などの変化環境において、様々な役割を担うとの知見が集積され、治療に対する標的にさえなりつつある。中枢グリア細胞に与える影響因子として種々のストレスが関与していることが知られている。一方、ENS構成成分であるEGCに関しても、種々ストレスの応答としての変化を来す性質を有していることも判明してきた。これらのことから、腸管成熟過程でのストレスがEGCに与える影響と、大腸腸管の生理的機能への影響について、解析することは機能性消化管障害の病態解明から治療応用にも繋がることを推察され

る。

3. 研究の方法

幼少期の慢性ストレスには、Wistar系雄性ラットを使用し、母子分離モデルを用いた。その方法は、出生2日目から14日目までの期間、一定の3時間、子を母親ラットから別ゲージへ分離するものであり、分離時間帯以外は母親と同ゲージでの通常授乳飼育を行うものである。その後、22日目でweaningし離乳期を経る。また、成熟期の急性期ストレスとして、水浸疲労ストレスモデルを使用した。この方法は、成熟期ラットを2cmの水を張ったゲージの中に、4時間水浸させるものである。コントロール、成熟期急性期ストレス、幼少期慢性ストレス、これら併用の4つの群を設定し、EGC形態変化を含めた増減、さらには摘出腸管への種々刺激に対する腸管収縮反応について検討した。

4. 研究成果

上記で示した4群において、全て8週令時に評価した。ストレス負荷によりグリア細胞蛋白の発現は、有意な増加は認めなかった。また、腸管神経の中で収縮促進作用を示すコリン作動性神経、抑制的なNO作動性神経について反定量化した結果、ストレス負荷における変化は認められなかった。しかし、元来神経細胞を取り巻くように存在するグリア細胞は、その中心部に向かって突起を伸長している様子が形態学的変化として捉えられた。また、伸長したグリア細胞の、filamentous型からleaf-like型へと変化が捉えられたことは、初めて得られた知見である。その神経細胞体に対するEGC突起の占有面積は、ストレス負荷の程度に応じて有意に増加し、filamentous型からleaf-like型へと変化する割合は、ストレス二重負荷群で約15%と最も増加していることも判明した。以上のことから、幼少期ストレスは、成長期においても

大腸グリア細胞の形態的变化として残存し、その変化は成長期のストレス負荷により増強することも判明した。一方アセチルコリン刺激による腸管収縮反応を評価すると、収縮増大反応が確認され、腸管収縮に対する最終刺激物質であるアセチルコリンに対する過敏反応も確認された。これら刺激増大反応は、電気刺激に対する収縮反応においても、同様であることも判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Yoshiko Fujikawa, Kazunari Tominaga, Fumio Tanaka, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa. Enteric glial cells are associated with stress-induced colonic hyper-contraction in maternally separated rats. *Neurogastroenterology motility*, 2015, in press

〔学会発表〕(計11件)

1. 田中史生、富永和作、藤川佳子、谷川徹也、渡辺俊雄、藤原靖弘、平田一人、荒川哲男. 幼少期ストレスが成人期の腸管神経システムと大腸運動機能に与える影響. 第16回日本神経消化器病学会、2014年11月6日、学術総合センター(一橋講堂)(東京都・千代田区)

2. 藤川佳子、富永和作、谷川徹也、渡辺俊雄、藤原靖弘、荒川哲男. 幼少期ストレスが成人期の腸管神経システムと大腸運動機能に与える影響. 第42回日本潰瘍学会、2014年11月1日、慶應義塾大学薬学部(東京都・港区)

3. Yoshiko Fujikawa, Kazunari Tominaga, Fumio Tanaka, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Masatsugu Shiba, Kenji Watanabe, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa. Morphological and functional changes of enteric glial cells caused by physical stress induce colonic hyper-contraction via a neuron-glia tripartite system in maternally separated rats.

Digestive Disease Week 2014, 2014年5月5日、シカゴ(アメリカ合衆国)

4. Kazunari Tominaga, Yoshiko Fujikawa, Fumio Tanaka, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Masatsugu Shiba, Kenji Watanabe, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa.

Are morphological changes caused by acute and chronic stresses in enteric glial cells of the colon reversible or irreversible throughout aging in rats? Digestive Disease Week 2014, 2014年5月4日、シカゴ(アメリカ合衆国)

5. 藤川佳子、田中史生、富永和作. IBSモデルにおける大腸グリア細胞の形態変化と大腸運動機能への影響. 第100回日本消化器病学会総会、2014年4月25日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

6. Kazunari Tominaga, Yoshiko Fujikawa, Fumio Tanaka, Mitsue Sogawa, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Masatsugu Shiba, Kenji Watanabe, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa.

Gastric glial cells as responses to early life stress (maternal separation) and acute stress in adulthood in rats. 第7回International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2014年2月15日、コラッセふくしま(福島県・福島市)

7. 藤川佳子、富永和作、田中史生、十河光栄、山上博一、谷川徹也、斯波将次、渡辺憲治、渡辺俊雄、藤原靖弘、荒川哲男. 幼少期ストレスによる胃グリア細胞の形態変化. 第21回JDDW、2013年10月11日、品川プリンスホテル新高輪(東京都・品川区)

8. Kazunari Tominaga, Yoshiko Fujikawa, Fumio Tanaka, Mitsue Sogawa, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Masatsugu Shiba, Kenji Watanabe, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa. Structural plasticity of gastric glial cells as responses to early life stress (maternal separation) and acute stress in adulthood in rats. Digestive Disease Week 2013,

2013年5月19日, オーランド (アメリカ合衆国)

9. Yoshiko Fujikawa, Kazunari Tominaga, Fumio Tanaka, Mitsue Sogawa, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Masatsugu Shiba, Kenji Watanabe, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa. Structural plasticity of colonic glial cells enhanced by acute stress in adulthood was associated with colonic hyper-contraction in maternally separated rats. Digestive Disease

Week 2013, 2013年5月18日, オーランド(アメリカ合衆国)

10. 藤川佳子、富永和作、荒川哲男. 母子分離モデルにおける成人期ストレスによる大腸グリア細胞の形態変化と大腸運動機能. 第99回日本消化器病学会総会, 2013年3月23日, 城山観光ホテル (鹿児島県、鹿児島市)

11. 藤川佳子、富永和作、田中史生、十河光栄、山上博一、谷川徹也、斯波将次、渡辺憲治、渡辺俊雄、藤原靖弘、荒川哲男. 母子分離モデルにおける急性ストレス負荷に対する大腸グリア細胞の動態と大腸運動機能への影響. 第14回日本神経消化器病学会, 2012年11月9日セラトン都ホテル (大阪府・大阪市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富永 和作 (TOMINAGA KAZUNARI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 80336768

(2)研究分担者

荒川 哲男 (ARAKAWA TETSUO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 60145779

藤原 靖弘 (FUJIWARA YASUHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 40285292

渡辺 俊雄 (WATANABE TOSHIO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 50336773

谷川 徹也 (TANIGAWA TETSUYA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 70423879