

称号及び氏名 博士(獣医学) 佐藤 友治

学位授与の日付 平成 19 年 2 月 2 0 日

論文名 「マウス消化管における Orexin の神経伝達に関する研究」

論文審査委員
主査 竹内 正吉
副査 松尾 三郎
副査 中村 洋一

論文要旨

結論

哺乳類の腸管神経系においてアドレナリン作動性、コリン作動性神経とは異なる非アドレナリン・非コリン (Non-adrenergic, non-cholinergic: NANC) 性神経の存在が示されており、このうち NANC 性抑制性神経は、消化管において重要な役割を担っている。一酸化窒素 (nitric oxide: NO)、脳腸管ペプチドの一つである vasoactive intestinal peptide (VIP) 及び VIP 類似ペプチドである pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) 等が NANC 性弛緩のメディエーターであることが報告されているが、これらメディエーターの関与は消化管各部位において一様ではなく、加えて動物の種による相違が明らかとなっている。しかし、これまでの NANC 性抑制性神経伝達の研究は、主にイヌ、ラット等を用いたものが多く、マウス消化管での神経伝達に関する研究は総じて少ない。

Orexin は orphan receptor に対する内因性の生理活性物質として近年見出された神経ペプチドであり、orexin-A 及び orexin-B の 2 つのサブタイプとそれらの受容体である OX1 及び OX2 受容体の存在が報告されている。Orexin は視床下部外側野 (LHA) とその周辺神経に特異的に発現していることから、摂食行動との関連性が示された。更に、摂食行動だけでなく、遺伝性ナルコレプシーのモデル動物 (イヌ) を用いた研究から、OX2 受容体をコードする遺伝子がナルコレプシーの原因であることが報告された。末梢においては、各種動物の腸管神経叢において組織学的にその存在が認められているが、モルモット回腸と大腸において、orexin-A が消化管神経叢からのアセチルコリン遊離を介して収縮を引き起こすことが報告されている程度であり、腸管での orexin の生理的作用についての研究報告は少ない。

本研究では、これまでに研究報告の少ないマウス消化管での NANC 性抑制性神経伝達物質を検索すると共に、消化管神経叢において存在が明らかとなった orexin の腸運動にお

る生理的役割を明らかにすることで、消化管運動制御機構の一端を解明する。

第1章 マウス消化管での NANC 性抑制性神経伝達物質

ICR マウス各消化管部位の縦走筋標本を用いて、atropine と guanethidine 存在下で経壁電気刺激 (Transmural stimulation : TMS) によって生じた弛緩反応に対する各種阻害薬による作用から、各消化管部位での NANC 性抑制性神経伝達物質を検索した。

1. 十二指腸上行部

十二指腸上行部縦走筋標本に N^G -nitro-L-arginine (NO合成酵素阻害薬 : L-NOARG) を処置することにより、自発運動には明らかな影響は認められなかったが、TMSによる弛緩反応は著しく抑制され、L-NOARG処置前 (対照) の約 40%となった。このL-NOARG処置により抑制されたNANC性弛緩はL-arginineを処置することによりほぼ完全に回復したことから、十二指腸上行部標本においては、NANC性弛緩の一部はNOによりメディエイトとされていることが示唆された。次にVIP受容体阻害薬であるVIP₁₀₋₂₈を処置するとNANC性弛緩は36%抑制された。また、NANC性弛緩はVIP₁₀₋₂₈とL-NOARGを同時に処置することにより完全に消失した。一方、PACAP受容体阻害薬であるPACAP₆₋₃₈はNANC性弛緩に影響を与えなかった。

2. 回腸

回腸縦走筋標本にL-NOARGを処置することにより、TMSによるNANC性弛緩は対照の16%になった。この抑制はL-arginine処置によりほぼ完全に回復した。一方、VIP₁₀₋₂₈及びPACAP₆₋₃₈はNANC性弛緩に対して影響を与えなかった。

3. 近位結腸

近位結腸縦走筋標本にL-NOARGを処置することにより、TMSによるNANC性弛緩は対照の約 60%となった。この抑制はL-arginine処置によりほぼ完全に回復した。また、VIP₁₀₋₂₈とPACAP₆₋₃₈はそれぞれ対照を約 70%と 66%に抑制した。3つの阻害薬の併用により、弛緩反応は完全に消失した。

4. 遠位結腸

遠位結腸縦走筋標本にL-NOARGを処置することにより、TMSによるNANC性弛緩は対照の約 50%に抑制された。この抑制はL-arginine処置によりほぼ完全に回復した。また、PACAP₆₋₃₈処置により、NANC性弛緩は対照の約 70%に抑制された。PACAP₆₋₃₈とL-NOARGを同時に処置することによりNANC性弛緩は対照の約 10%になった。

以上の結果より、ICR マウス各消化管部位の TMS による NANC 性弛緩は、十二指腸上行部縦走筋は NO と VIP、回腸縦走筋は主に NO、近位結腸縦走筋は NO、VIP 及び PACAP、遠位結腸縦走筋は主に NO と PACAP によってそれぞれメディエイトされていることが示唆された。

第2章 マウス小腸縦走筋における orexin の作用

次に本章では消化管運動における orexin の役割、及びその機序を ICR マウスの小腸縦走筋各部位を用いて研究した。

1. Orexin の収縮反応

十二指腸下行部と上行部及び回腸の縦走筋標本に orexin A を処置することにより一過性の収縮反応が得られた。この収縮は atropine 及び tetrodotoxin 処置によって完全に消失した。

2. Orexin による弛緩反応

十二指腸下行部と上行部及び回腸の縦走筋標本に atropine と guanethidine 存在下に orexin A を処置すると、一過性の弛緩を生じた。この弛緩反応は、L-NOARG 処置によりほぼ完全に抑制された。L-NOARG による抑制は、標本を Tyrode 液で洗浄することによってほぼ完全に回復した。Orexin A による弛緩は tetrodotoxin によって完全に消失した。

3. 十二指腸上行部縦走筋標本における TMS による反応への orexin A の関与

内因性 orexin の役割を調べるために、十二指腸上行部での TMS に対する orexin A 脱感作の影響を調べた。十二指腸上行部縦走筋標本では atropine 非存在下で orexin A 処置によって一過性の収縮を示したが、orexin A を反復処置することによって、標本は orexin A により収縮しなくなった（脱感作）。この条件下の TMS による収縮を脱感作前の収縮と比較したところ、orexin A 脱感作による影響は全く認められなかった。

一方、atropine と guanethidine 存在下で十二指腸上行部縦走筋標本は TMS により弛緩を生じた。Orexin A による弛緩反応も、orexin A を反復処置することによって脱感作を生じた。この条件下での TMS による弛緩の面積は脱感作前と比較して約半分にまで減少した。また、TMS による NANC 性弛緩は L-NOARG 処置により、処置前の面積比で約半分に抑制された (n=4)。しかしながら、orexin A 脱感作後に L-NOARG を処置しても、TMS による NANC 性弛緩は変わらず、相加的作用は認められなかった。

以上の結果より、orexin A は ICR マウス十二指腸下行部と上行部、及び回腸縦走筋で収縮・弛緩の両作用に関与していることが示唆された。Orexin A の収縮反応はコリン作動性神経の活性化によるが、TMS による神経性の収縮反応には orexin は関与していないことが示唆された。一方、atropine と guanethidine 存在下での TMS による NANC 性弛緩には orexin A が関与しており、NO の遊離を介していることが明らかとなった。

第3章 マウス小腸蠕動運動における orexin の作用

本章では ICR マウス十二指腸上行部内腔に装着したバルーンを伸展させることにより局所刺激を行い、この部位より口側の輪走筋で生じる上行性収縮及び、尾側で生じる下行性弛緩を記録した。そして、各種薬物を用いて刺激部位から反応部位までの刺激伝達経路における orexin の関与について検討した。

1. 上行性収縮における orexin の関与

ICR マウス十二指腸上行部内腔に装着したバルーンを局所的に伸展させ、伸展部より口側部位で上行性収縮を記録した。この上行性収縮は atropine 又は tetrodotoxin 処置によって完全に消失したことから、上行性収縮はコリン作動性運動神経の活性化によると考えられた。

十二指腸上行部輪走筋標本は orexin A を処置することにより収縮を生じた。この orexin A による収縮に対して orexin A を反復処置することにより脱感作を生じた。Orexin A に対する脱感作後の上行性収縮は脱感作前の収縮（対照）と比較して約 41%に抑制された。また、上行性収縮は OX1 受容体選択的阻害薬である SB-334867-A 処置により対照の約 39%まで抑制された。一方、上行性収縮は神経節遮断薬である hexamethonium 処置により完全に消失した。

2. 上行性収縮における orexin 神経とコリン作動性神経の関係

十二指腸上行部輪走筋標本において orexin A 処置による収縮は、tetrodotoxin 又は atropine によって完全に消失した。従って orexin A によって生じた収縮は、コリン作動性運動神経の活性化によると考えられた。また、SB-334867-A 処置は、orexin A による収縮を完全に抑制した。コリン作動性介在神経との関連性を調べるために hexamethonium を処置したところ、orexin A による収縮は完全に消失した。一方、nicotine を処置したところ、収縮が生じた。この nicotine による収縮は、atropine、hexamethonium または tetrodotoxin 処置によって完全に消失した。しかし、nicotine による収縮は、orexin A 脱感作後や SB-334867-A によって全く影響を受けなかった。

以上より、マウス十二指腸上行部の上行性収縮は、腸内容物の局所的な伸展刺激による感覚神経の活性化、orexin 介在神経、ニコチン性アセチルコリン受容体を活性化するコリン作動性の介在神経、そして最後にコリン作動性運動神経を含む神経伝達経路によって引き起こされていると考えられた。

3. 下行性弛緩における orexin の関与

マウス十二指腸上行部標本内腔のバルーンを局所的に伸展させることで、伸展部より尾側部位に下行性弛緩が生じた。この下行性弛緩は tetrodotoxin 処置によって完全に消失した。下行性弛緩は L-NOARG の処置により、対照の 43%まで抑制された。この L-NOARG 処置により抑制された反応は、L-arginine 処置によって対照と同程度まで回復した。以上より下行性弛緩の一部は nitrgic な運動神経の活性化によって引き起こされていると考えられた。さらに、下行性弛緩は SB-334867-A 処置及び hexamethonium によって、それぞれ対照の約 60%に抑制された。

4. 下行性弛緩における orexin 神経とコリン作動性神経の関係

下行性弛緩の伸展部から弛緩部位までの神経伝達経路におけるコリン作動性介在神経と orexin 神経との相互関係を明らかにするために hexamethonium と SB-334867-A の作用を詳細に調べた。

Atropine 存在下では orexin A 処置によって弛緩を生じた。この orexin A による弛緩は反

復処置しても、弛緩の大きさに変化はなかった。Orexin A による弛緩は、SB-334867-A あるいは, tetrodotoxin 処置によって完全に消失した。また, L-NOARG 処置によっても完全に抑制され, この抑制された orexin-A の弛緩は L-arginine 処置によって回復した。Orexin A による弛緩は hexamethonium の影響を受けなかった。Atropine 存在下では nicotine 処置により弛緩を生じた。この nicotine によって得られた弛緩は, hexamethonium または, tetrodotoxin 処置によって完全に抑制された。また, L-NOARG 処置によって対照の約 67%に抑制され, この抑制は L-arginine 処置によって完全に回復した。一方, nicotine によって得られた弛緩は, OX1R 選択阻害薬である SB-334867-A の影響を受けなかった。

下行性弛緩は, SB-334867-A と hexamethonium を同時に処置することにより, 対照の約 40%に抑制され, 両薬物により相加的な作用が認められた。

以上の結果より, ICR マウス十二指腸上行部の下行性弛緩では上行性とは対照的にコリン作動性介在神経系と orexin 神経系が並行して機能していること, orexin 神経を介する経路では最後に nitroergic な運動神経が活性化されることが明らかとなった。

まとめ

本研究によりマウス消化管縦走筋では NANC 性抑制性神経伝達物質は部位により異なるが, 主に NO, VIP, PACAP の 3 種類の神経伝達物質によることが示された。Orexin は縦走筋の収縮及び弛緩の両作用に関与しており, 収縮はコリン作動性神経, 弛緩は NO 神経との関連が明らかとなった。十二指腸上行部蠕動運動の上行性収縮では orexin 神経, コリン作動性介在神経と続く直列の刺激伝達系を構成しているが, 下行性弛緩においては orexin-NO 神経の経路とコリン作動性介在神経を介する並列の刺激伝達系によって構成されていることが明らかとなった。

審査結果の要旨

哺乳類の腸管神経系においてアドレナリン作動性, コリン作動性神経とは異なる非アドレナリン・非コリン (non-adrenergic, non-cholinergic: NANC) 性抑制性神経の存在が示されている。一酸化窒素 (nitric oxide: NO), 脳腸管ペプチドの一つである vasoactive intestinal peptide (VIP) 及び VIP 類似ペプチドである pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) 等が NANC 性弛緩のメディエーターであることが報告されているが, これらメディエーターの関与は消化管各部位において一様ではなく, 加えて動物の種による相違が明らかとなっている。しかし, これまでの NANC 性抑制性神経伝達の研究は, 主にイヌ, ラット等を用いたものが多く, マウス消化管での神経伝達に関する研究は総じて少ない。

Orexin は近年見出された神経ペプチドであり, 摂食行動やナルコレプシーに関与していることが報告された。末梢においては, 各種動物の腸管神経叢において組織学的にその存在が認められているが, モルモット回腸と大腸において, orexin-A が消化管神経叢からのアセチルコリン遊離を介して収縮を引き起こすことが報告されている程度であり, 腸管での orexin の生理的作用についての研究報告は少ない。

本研究では、これまでに研究報告の少ないマウス消化管での NANC 性抑制性神経伝達物質を検索すると共に、消化管神経叢において存在が明らかとなった orexin の腸運動における生理的役割を明らかにすることで、消化管運動制御機構の一端を解明した。

第 1 章では、ICR マウス各消化管部位の縦走筋標本を用いて、atropine と guanethidine 存在下 (NANC 条件下) で経壁電気刺激 (transmural stimulation: TMS) によって生じた弛緩反応に対する NO 合成酵素阻害薬 (L-NOARG), VIP 受容体阻害薬, PACAP 受容体阻害薬による作用から、各消化管部位での NANC 性抑制性神経伝達物質を検索した。その結果、ICR マウス各消化管部位の TMS による NANC 性弛緩は、十二指腸上行部縦走筋は NO と VIP, 回腸縦走筋は主に NO, 近位結腸縦走筋は NO, VIP 及び PACAP, 遠位結腸縦走筋は主に NO と PACAP によってそれぞれメディエイトされていることが示唆された。

第 2 章では、消化管運動における orexin の役割およびその機序を ICR マウスの小腸縦走筋各部位を用いて検討した。十二指腸下行部と上行部及び回腸の縦走筋標本に orexin A を処置することにより一過性の収縮反応が得られた。十二指腸下行部と上行部及び回腸の縦走筋標本に NANC 条件下に orexin A を処置すると一過性の弛緩を生じた。この弛緩反応は L-NOARG 処置によりほぼ完全に抑制された。十二指腸上行部での TMS に対する orexin A 脱感作の影響を調べたところ、TMS による収縮は脱感作による影響を全く受けなかった。一方、NANC 条件下での TMS による弛緩は orexin A 脱感作により約半分にまで減少した。また、TMS による NANC 性弛緩は L-NOARG 処置により、処置前の約半分に抑制されたが、orexin A 脱感作と L-NOARG には相加的作用は認められなかった。以上の結果より、orexin A は ICR マウス十二指腸下行部と上行部、及び回腸縦走筋で収縮・弛緩の両作用に関与していることが示唆された。Orexin A の収縮反応はコリン作動性神経の活性化によるが、TMS による神経性の収縮反応には orexin は関与していないことが示唆された。一方、TMS による NANC 性弛緩には orexin A が関与しており、NO の遊離を介していることが明らかとなった。

第 3 章では、ICR マウス十二指腸上行部内腔に装着したバルーンを伸展させることにより局所刺激を行い、この部位より口側の輪走筋で生じる上行性収縮および尾側で生じる下行性弛緩を記録した。伸展部より口側の上行性収縮と orexin A 処置による収縮は atropine または tetrodotoxin 処置によって完全に消失した。Orexin A に対する脱感作や OX1 受容体選択的阻害薬である SB-334867-A 処置によって上行性収縮は抑制された。一方、上行性収縮は神経節遮断薬である hexamethonium (C6) 処置により完全に消失した。コリン作動性介在神経との関連性を調べるために C6 を処置したところ、orexin A による収縮は完全に消失した。一方、nicotine による収縮は olefin A 脱感作や SB-334867-A によって全く影響を受けなかった。伸展部より尾側部位に生じた下行性弛緩は tetrodotoxin 処置によって完全に消失した。下行性弛緩は L-NOARG の処置により抑制された。下行性弛緩の伸展部から弛緩部位までの神経伝達経路におけるコリン作動性介在神経と orexin 神経との相互関係を明らかにするために C6 と SB-334867-A の作用を調べた。Atropine 存在下での orexin A による弛緩は C6 の影響を受けなかった。Nicotine 処置による弛緩は SB-334867-A の影響を受けなかった。下行性弛緩は、SB-334867-A と C6 を同時に処置することにより、対照の約 40% に抑制され、両薬物により相加的な作用が認められた。以上の結果より、ICR マウス十二指腸上行部蠕動運動の上行性収縮では orexin 神経、コリン作動性介在神経、コリン作動性運動神経と続く直列の刺激伝達系を構成しているが、下行性弛緩においては orexin-NO 神経の経路とコリン作動性介在神経を介する並列の刺激伝達系によって構成されていることが明らか

かとなった。

本研究では、マウス消化管における抑制性神経伝達物質の性状を明らかとし、主に NO, VIP と PACAP が関与しているがその程度は部位により異なっていることを示した。また, orexin が蠕動運動における上行性収縮および下行性弛緩の刺激伝達経路における神経伝達物質として働いていることを明らかにした。これらの成果は消化管の生理的運動機構の解明の基礎となるものであり、医学、動物医学に貢献するところが大きく、本論文の審査および学力確認の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。