

称号及び氏名	博士（獣医学）	西山 和宏
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	Ca ²⁺ 動態関連分子および臓器連関から見た消化管運動の調節機構解明に関する研究	
論文審査委員	主査	竹内 正吉
	副査	中村 洋一
	副査	岡田 利也
	副査	東 泰孝

論文要旨

緒言

本研究では、腸神経系と消化管平滑筋応答の制御に関わる Ca²⁺動態関連分子の役割ならびに病態時での臓器連関に着目し、消化管運動調節機構の解明を試みた。

消化管運動を直接制御する神経細胞および平滑筋細胞の活動は細胞内 Ca²⁺により調節される。細胞内 Ca²⁺は細胞膜と小胞体に存在する Ca²⁺チャネルおよび Ca²⁺ポンプにより制御されるが、Ca²⁺を制御する第3の経路として Na⁺/Ca²⁺交換体 (NCX) が注目されている。NCXは細胞膜を隔てた Na⁺の濃度勾配および膜電位に依存して3つの Na⁺と1つの Ca²⁺を交換する両方向性のトランスポーターであり、細胞内 Ca²⁺の排出および Ca²⁺の流入に関与する。これまで消化管における NCX の生理学的役割についてはほとんど解析されていない。そこで、1章では神経細胞および平滑筋細胞に発現する NCX1 と NCX2 の遺伝子改変マウスを用いて、消化管運動における NCX の役割を追求した。

一方で、消化管運動は他の臓器の活動状態により様々な影響を受ける。この臓器連関による消化管運動変調に関与する因子を明らかにすることは、消化管運動調節機構を理解するうえで重要な視点となる。腎不全は腎機能が60%以下まで低下した状態であり、腎不全患者には嘔吐、下痢、あるいは便秘などの消化器症状が認められる。さらに、腸内フローラの変質による病原性細菌由来毒素が腎不全をさらに悪

化させるなど、消化管と腎臓の間には相互に密接な連関があるが、消化管運動機能に影響するメカニズムは明らかとなっていない。第2章では消化管と腎臓の臓器連関に焦点をあて、葉酸投与による急性腎不全モデルおよび5/6腎摘出による慢性腎不全モデルを用いて、腎不全による消化管運動変調に係わる因子を追求した。

第3章では第1章と第2章で得られた結果の総括として腎不全に伴う消化管運動変調とNCX等の消化管運動調節因子との関連性についてさらなる追求を行った。

第1章 消化管運動機能調節におけるNCXの病態生理的役割の解明

第1節では、遠位結腸および回腸の消化管運動機能におけるNCXの生理学的役割の解明を目的とし、野生型マウス(WT)、NCX1 heterozygous マウス(NCX1 HET)、NCX2 heterozygous マウス(NCX2 HET)、NCX1とNCX2の両方を欠損させたNCX1、NCX2 double heterozygous マウス(Double HET) および平滑筋特異的NCX1過剰発現マウス(NCX1 Tg)を用いてマグヌス法による検討を行った。第2節では、消化管運動機能におけるNCXの病態生理学的役割をさらに詳細に解明するために、NCX1 HET および NCX2 HET を用いて下痢モデルを作製し *in vivo* での解析を行った。

第1節 マグヌス法を用いた *ex vivo* での検討

免疫染色法により、NCX1 および NCX2 の発現が回腸と遠位結腸の平滑筋および筋層間神経叢の神経細胞に認められた。続いて、マグヌス法を用いて遠位結腸の縦走筋運動を測定した。NCX2 HET および Double HET での電気刺激(EFS)中の弛緩の大きさはWTと比較して有意に増加した。アトロピン存在下においてEFSを行ったところ、弛緩の大きさはWTとNCX2 HET および Double HET で有意な差は認められなかった。さらに、HPLCを用いアセチルコリン(ACh)遊離量を測定したところ、NCX2 HETはWTと比べてACh遊離量が有意に減少していた。また、回腸の縦走筋について同様の解析を実施したところ、NCX2 HETはWTと比較して平滑筋に起因したAChによる収縮の有意な増加が認められた。一方、NCX1 HETはWTと明確な差は認められなかった。しかしながら、NCX1 TgではWTと比較して一酸化窒素供与体であるNOR-1による弛緩が有意に増加した。最後に、消化管輪走筋の運動についても検討を行ったが、WTと各NCX遺伝子改変マウスとの間に顕著な差は認められなかった。以上の結果より、NCX1は遠位結腸平滑筋においてNOの弛緩機構に一部関与することが明らかとなった。NCX2は遠位結腸においては神経興奮時のACh遊離に関与すること、回腸においては平滑筋側のAChに対する感受性に関与することが明らかとなった。さらに、輪走筋における運動調節機構にNCXの関与は認められず、消化管の部位によりNCX1およびNCX2の役割が異なることが示唆された。

第2節 下痢モデルによる *in vivo* での検討

生理的な排便には両NCX欠損の影響は認められなかった。そこで、作用機序の異なる3種類の下痢モデルを用いて、NCXの役割を検討した。知覚神経刺激を介し筋間神経細胞が刺激されることで結腸運動を亢進する硫酸マグネシウム、腸神経系からのACh遊離を促進することで結腸運動を亢進させるserotonin および平滑筋への直接作用により結腸運動を亢進させるprostaglandin E₂ (PGE₂)を用いて下痢を

誘発した。NCX2 HET では WT と比較して硫酸マグネシウム誘発性下痢および serotonin 誘発性下痢は悪化した。一方、PGE₂ による下痢に差は認められなかった。一方、NCX1 HET では 3 種類の下痢モデルいずれにおいても、WT と比較して著明な差は認められなかった。したがって、NCX1 は下痢に明らかな関与はなく、NCX2 は腸神経系を介した下痢に関与することが示唆された。

第 2 章 腎疾患に伴う消化管運動変調のメカニズムの解明

消化管運動調節機構を明らかにする更なる研究として、臓器連関による腸運動機能の変化を調べることは重要である。そこで、腎不全に伴う消化管運動変調のメカニズムの解明を目的とし、第 1 節では、葉酸投与による急性腎不全モデルを、第 2 節では、5/6 腎臓摘出による慢性腎不全モデルを作製し、一般状態の測定、血清クレアチニン濃度測定、チャコールテストによる内容物輸送機能測定、マグヌス法を用いた腸運動測定を行った。

第 1 節 葉酸による急性腎不全モデルでの検討

葉酸投与による急性腎不全モデル (FA 群) では飲水量の増加傾向および血清クレアチニン濃度の有意な増加を認めた。しかしながら、チャコールを用いた腸管内容物の輸送に FA 群では顕著な変化は認められなかった。さらに、マグヌス法を用いた消化管運動の検討においても、FA 群では顕著な変化は認められなかった。以上の結果より、葉酸投与による急性腎不全では、消化管運動に大きな影響を与える可能性は低い。

第 2 節 5/6 腎摘出慢性腎不全モデルでの検討

5/6 腎臓摘出による慢性腎不全モデル (ope 群) では飲水量の増加および血清クレアチニン濃度の有意な増加を認めた。また、ope 群では糞便数は有意に減少したが、小腸内容物の輸送速度は有意に促進した。EFS による反応を調べたところ、ope 群の回腸では収縮が減少し、遠位結腸では弛緩が増大した。平滑筋における神経伝達物質に対する感受性の結果と考え合わせ、ope 群の回腸では腸神経系からの ACh 遊離が減少していた。逆に、ope 群の遠位結腸では ACh 遊離が増加することが示唆された。また、正常回腸に尿毒素の一種である spermine を処置したところ ope 群とほぼ同様の結果が得られたことから、ope 群における回腸運動の変化の一因が spermine であることが示唆された。一方、遠位結腸では IL-6 や TNF α などの炎症性サイトカインの発現量が増加したことから、遠位結腸運動の変化の一因が炎症による可能性が示された。以上結果より、5/6 腎臓摘出慢性腎不全の両消化管部位で異なるメカニズムにより消化管運動が変化することが示された。

第 3 章

第 1 章において、NCX1 ならびに NCX2 が消化管運動に密接に関与することを見出した。第 2 章では、5/6 腎摘出による慢性腎不全マウスの消化管運動変調に尿毒症物質や炎症が関わることを明らかとした。第 3 章では、5/6 腎臓摘出による慢性腎不全モデルの解析をさらに進め、NCX と腎不全に伴う消化管運動変調との関連性を追求した。

Ope 群の遠位結腸および回腸において、定量リアルタイム qPCR による NCX1 と NCX2 の発現量に変化は認められなかった。神経細胞において NCX の発現量が炎

症性サイトカインの影響を受けるかを検討するため、神経細胞芽腫である Neuro2A に IL-6 を処置したところ、NCX2 発現量は有意に増加した。しかしながら、NCX1 発現量に変動は見られなかった。したがって、NCX2 は慢性腎不全時の腸神経系からの ACh 遊離に関与する可能性が示された。

総括

- 1) NCX1 は遠位結腸平滑筋において NO の弛緩機構に一部関与する。NCX2 は遠位結腸において神経興奮時の ACh 遊離、また、回腸においては平滑筋の ACh に対する感受性に関与する。さらに、NCX2 は腸神経系を介した下痢に関与する。
- 2) 5/6 腎臓摘出による慢性腎不全では消化管の機能変調が生じており、回腸では尿毒症物質の一つである spermine が腸神経系からの ACh 遊離を減少させ、一方、結腸では炎症性サイトカインの上昇が一因となり、ACh 遊離が増加する。この時、炎症性サイトカインである IL-6 が神経細胞での NCX2 発現を増大させることから、腎不全に伴う消化管運動変調に NCX2 が関与する可能性が示唆される。
- 3) 今回の研究により、NCX1 および NCX2 が消化管運動を生理的に調節すること明らかとなった。さらに NCX2 は下痢や慢性腎不全時の消化管運動変調にも関与することから、消化管運動調節の新規ターゲットとなりうる可能性が示された。

審査結果の要旨

消化管運動を調節する機構は複雑でその詳細は明らかとなっていない。運動を制御する神経細胞および平滑筋細胞の活動は細胞内 Ca^{2+} により調節されるが、細胞膜と小胞体に存在する Ca^{2+} チャンネルおよび Ca^{2+} ポンプに加えて、 Ca^{2+} を制御する第 3 の経路として $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) が近年注目されている。NCX は細胞膜を隔てた Na^+ の濃度勾配および膜電位に依存して 3 つの Na^+ と 1 つの Ca^{2+} を交換する両方向性のトランスポーターであり、細胞内 Ca^{2+} の排出および Ca^{2+} の流入に関与する。しかしながら、消化管における NCX の病態生理学的役割についてはほとんど解析されていない。そこで、NCX 遺伝子改変マウスを用い、消化管運動における NCX の役割を追求している。一方で、消化管運動は他の臓器の活動状態により様々な影響を受ける。この臓器連関による消化管運動変調に関与する因子を明らかにすることは、消化管運動調節機構を理解するうえで重要な視点となる。腎不全患者では嘔吐、下痢、あるいは便秘などの消化器症状が認められることから、消化管と腎臓の間には相互に密接な連関があるが、消化管運動に影響する機構は明らかになっていない。本研究では、腸神経系と消化管平滑筋応答の制御に関わる Ca^{2+} 動態関連分子である NCX の役割ならびに病態時での臓器連関に着目し、消化管運動調

節機構の解明を行っている。

第 1 章では、消化管運動調節における **NCX** の病態生理学的役割の解明するために、第 1 節では、野生型マウス (**WT**)、**NCX1 heterozygous** マウス (**NCX1 HET**)、**NCX2 heterozygous** マウス (**NCX2 HET**)、**NCX1** と **NCX2** の両方を欠損させた **NCX1, NCX2 double heterozygous** マウス (**Double HET**) および平滑筋特異的 **NCX1** 過剰発現マウス (**NCX1 Tg**) を用いて、遠位結腸および回腸の消化管運動における **NCX** の生理学的役割を検討した。免疫染色法により、**NCX1** および **NCX2** の発現が回腸と遠位結腸の平滑筋および筋層間神経叢の神経細胞に認められた。マグヌス法を用いて消化管各部位の運動を測定した結果、**NCX1** は遠位結腸平滑筋において **NO** の弛緩機構に一部関与することが、**NCX2** は遠位結腸においては神経興奮時の **ACh** 遊離に関与すること、回腸においては平滑筋側の **ACh** に対する感受性に関与することが明らかとなった。さらに、輪走筋の運動調節機構に **NCX** の関与は認められず、消化管の部位により **NCX1** および **NCX2** の役割が異なることが示唆された。第 2 節では、消化管運動機能における **NCX** の病態生理学的役割をさらに詳細に解明するために、**NCX1 HET** および **NCX2 HET** を用いて下痢モデルを作製し *in vivo* での解析を行った。知覚神経刺激を介し筋間神経細胞が刺激されることで結腸運動を亢進する硫酸マグネシウム、腸神経系からの **ACh** 遊離を促進することで結腸運動を亢進させる **serotonin** および平滑筋への直接作用により結腸運動を亢進させる **prostaglandin E₂ (PGE₂)** を用いて下痢を誘発した。**NCX2 HET** では **WT** と比較して硫酸マグネシウム誘発性下痢および **serotonin** 誘発性下痢は悪化したが、**PGE₂** による下痢に差は認められなかった。一方、**NCX1 HET** では 3 種類の下痢モデルいずれにおいても、**WT** と比較して著明な差は認められなかった。したがって、**NCX1** は下痢に明らかな関与はなく、**NCX2** は腸神経系を介した下痢に関与することが示唆された。

第 2 章では、腎疾患に伴う消化管運動変調の機構を解明するために、第 1 節では葉酸投与による急性腎不全モデルを用いて検討を行ったが、チャーコールを用いた腸管内容物の輸送に顕著な変化は認められず、また、マグヌス法を用いた消化管運動の検討においても、顕著な変化は認められなかった。以上の結果より、葉酸投与による急性腎不全においては、消化管運動に大きな影響は認められなかった。第 2 節では、**5/6** 腎臓摘出による慢性腎不全モデル (**ope** 群) を作製し、一般状態の測定、血清クレアチニン濃度測定、チャーコールテストによる内容物輸送機能測定、マグヌス法を用いた腸運動測定を行った。**Ope** 群では、飲水量の増加および血清クレアチニン濃度の有意な増加を認めた。また、糞便数は有意に減少したが、小腸内容物の輸送速度は有意に促進した。マグヌス法を用い消化管運動を調べたところ、**ope** 群の回腸では収縮が減少し、遠位結腸では弛緩が増大した。平滑筋における神経伝達物質に対する感受性の結果と考え合合わせると、**ope** 群の回腸では腸神経系からの **ACh** 遊離の減少が、逆に、**ope** 群の遠位結腸では **ACh** 遊離の

増加が示唆された。正常回腸に尿毒素の一種である **spermine** を処置したところ、**ope** 群とほぼ同様の結果が得られたことから、**ope** 群における回腸運動変調の一因が **spermine** であることが示唆された。一方、遠位結腸では **IL-6** や **TNF α** などの炎症性サイトカインの発現量が増加したことから、遠位結腸運動の変化の一因が炎症による可能性が示された。以上結果より、**5/6** 腎臓摘出慢性腎不全の両消化管部位で異なる機構により、消化管運動が変調したことが示された。

第3章では、**5/6** 腎臓摘出による慢性腎不全時における消化管運動変調との **NCX** との関連性を調べた。**Ope** 群の遠位結腸および回腸において、定量リアルタイム **qPCR** による **NCX1** と **NCX2** の発現量に変化は認められなかった。**NCX** の発現量が炎症性サイトカインの影響を受けるかを検討するため、神経芽細胞腫である **Neuro2A** に **IL-6** を処置したところ、**NCX2** 発現量は有意に増加したが、**NCX1** の発現量に変動は見られなかった。したがって、**NCX2** は慢性腎不全時の腸神経系からの **ACh** 遊離に関与する可能性が示された。

今回の研究において、**NCX1** および **NCX2** が消化管運動を生理的に調節することを明らかにした。さらに **NCX2** は下痢や慢性腎不全時の消化管運動変調にも関与することを示し、**Na⁺/Ca²⁺** 交換体が消化管運動調節の新規ターゲットとなりうることを示している。これらの研究成果は、獣医学および医学における消化管運動機能研究の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。