

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09351

研究課題名(和文) サイトカインプロファイル解析による食道アカラシアの病態解明

研究課題名(英文) Determination of underlying cause of esophageal achalasia by the use of cytokine profiles

研究代表者

伊原 栄吉 (Ihara, Eikichi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80612390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食道アカラシアには、食道内圧結果より3つのサブタイプ (Type I、Type II、Type III) に分類される。免疫・炎症の観点から、Type I及びType IIはTh1及びTh17関連疾患であり、Type IIIはTh17関連サイトカイン疾患であった。また、サイトカインプロファイルを用いた判別分析にて、食道内圧所見の相違による分類を反映して、各サブタイプ間においてサイトカインプロファイルが有意に異なっていた。一方、食道アカラシアの前駆状態とされる食道胃接合部通過障害に対して、アコチアミドの有効性を検討する前向き観察研究 (n=25)を行ったところ、52%が正常化する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道アカラシアとその前駆状態とされるEGJ00は、胸のつかえ症状から生活の質や労働生産性を低下させると共に致死的となる誤嚥性肺炎を合併するため高齢化社会を迎えた本邦において重要な疾患であるが、未だ病因・病態は解明されておらず治療は確立していない。本研究の学術的意義は、食道粘膜サイトカインプロファイルの観点からこの2つの疾患の病態の一端を解明したことである。また、本研究の社会的意義は、アコチアミドがEGJ00の治療薬及び食道アカラシアの予防薬となる可能性を示し、本邦の社会的ニーズである2つの疾患の治療法の開発へ直結するエビデンスを得たことである。

研究成果の概要(英文)：Esophageal achalasia is classified into three subtypes including Type I, Type II and Type III. From the viewpoint of immune and inflammatory responses, it has been shown that both Type I and Type II are Th1 and Th17-associated disorders while Type III are simply Th17-associated disorder. By discrimination analysis using esophageally expressed cytokine profiles, there was a significant difference in the cytokine profiles among three subtypes in accordance with difference in the finding of esophageal manometry results. On the other hand, a prospective observational study to examine usefulness of acotiamide for esophagogastric outflow obstruction (EGJ00), a precursor of achalasia, has revealed that 52% of the patients with EGJ00 was cured.

研究分野：消化器内科学

キーワード：食道アカラシア 高解像度食道内圧検査 サイトカインプロファイル 経口内視鏡的筋層切開術

1. 研究開始当初の背景

絶妙に協調した食道運動は、ヒトの生命維持に必要不可欠である。食道アカラシアは、下部食道括約筋 (Lower esophageal sphincter; LES)の機能的弛緩不全と食道体部の蠕動障害を特徴し、食道から胃への食物通過が障害される疾患である。胸のつかえ症状から生活の質や労働生産性を低下させると共に致死的となる誤嚥性肺炎を合併するため、高齢化社会を迎えた本邦において重要な疾患であるが、機能的疾患という性質上、食道癌などの器質的疾患と比較して病因・病態の解明が遅れており、未だ治療は確立していない。食道運動の起点になる消化管神経細胞はシナプス結合あるいはシナプス様結合により、それぞれ平滑筋細胞やカハールの介在細胞と連結し、カハールの介在細胞はギャップジャンクションにより平滑筋細胞と連結している。嚥下刺激は迷走神経を介して神経型ニコチン性アセチルコリン受容体を活性化し、収縮物質と弛緩物質を放出させて食道運動を制御すると考えられている。食道アカラシアでは、この消化管神経細胞-カハールの介在細胞-平滑筋細胞のネットワークまたはいずれかの細胞機能が障害されることで発症すると推測される。現在、食道アカラシアの根本的な治療は存在しないため、制御不能に陥ったLES筋層を破壊する侵襲的な治療が行なわれている。

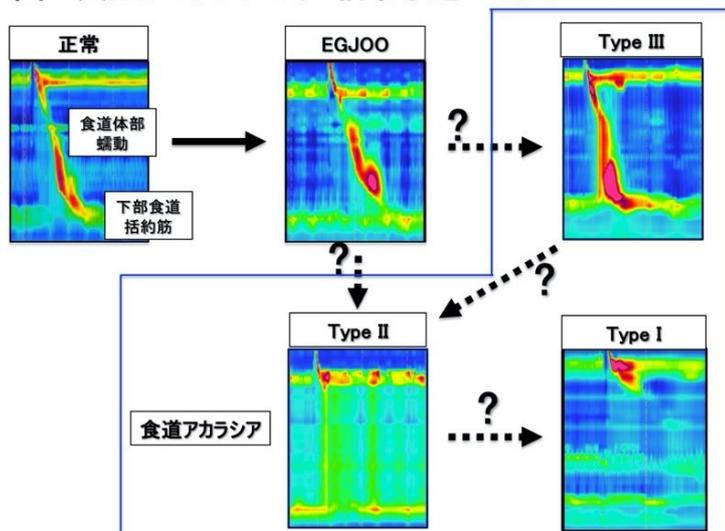


食道アカラシアでは、この消化管神経細胞-カハールの介在細胞-平滑筋細胞のネットワークまたはいずれかの細胞機能が障害されることで発症すると推測される。現在、食道アカラシアの根本的な治療は存在しないため、制御不能に陥ったLES筋層を破壊する侵襲的な治療が行なわれている。

食道アカラシアの発症予防と根本的な治療法の確立には、その病因・病態の解明が不可欠である。食道アカラシアは、宿主の遺伝的要因を背景に、ある種のウイルス感染や自己免疫などが関連し発症すると考えられている[1]、免疫・炎症反応機序の相違による障害部位や特徴により、幾つかの異なる表現型が存在する。高解像度食道内圧検査 (High-resolution manometry; HRM) の開発と食道運動機能障害の世界的な診断基準であるシカゴ分類の確立によって、食道アカラシアは、食道体部に蠕動波を全く認めないType I、全食道昇圧を認めるType II、遠位平滑筋部に痙攣性収縮を伴うType IIIの3つに明確に分類された(図1,2)[2]。さらにアカラシア亜型として、LES機能的弛緩不全は認めるものの、食道体部蠕動障害は認めない新しい疾患概念として、食道胃接合部通過障害 (Esophagogastric junction outflow obstruction; EGJOO)が確立した。これまでの研究より、EGJOOは食道アカラシアの前駆状態とされ、臨床経過によってEGJOO Type III、またはEGJOO Type II Type Iと進展することが推測されているが、これらHRM所見で分類される各サブタイプが同一疾患か、異なる疾患かについては未だ明らかにされていない。一方、数多くの基礎的な研究より、ある種の消化管免疫・炎症反応が消化管運動機能障害に及ぼす影響が明らかとされてきた。この消化管免疫・炎症反応に重要な役割を果たすのは、ヘルパーT細胞であり、抗原と刺激するサイトカインの種類によって、主に3つのエフェクター細胞 (Th1、Th2、Th17) に分類されるが、Th関連サイトカインの観点から食道アカラシアの病態は解明されていない。

研究代表者は、機能性ディスペプシアの治療薬、アコチアミドがEGJOOの治療薬となる可能性を見出した[3]。アカラシアの前駆状態とされるEGJOOの治療法の開発は、その疾患の治療にとどまらずアカラシアの発症予防となる可能性があるため、その検証は重要である。このような状況下、食道アカラシアの画期的な治療法である内視鏡的筋層切開術 (per-oral endoscopic myotomy; POEM) が開発され、解析に必要なヒト臨床検体を得ることができるようになったことで[4]、食道アカラシア及びEGJOOの病因・病態を解明できる環境が整った。

図2 食道アカラシアとその前駆状態とされるEGJOO



Boeckxstans G, Neurogastroenterol Motil 24;27-31, 2012, Kahrilas, PJ, Gastroenterology 145;954-965, 2013

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、食道粘膜及び筋層に発現する Th1/Th2/Th17 免疫応答に関連したサイトカインプロファイルの観点から、食道アカラシアの 3 つのサブタイプ (Type I、Type II、Type III) 別の病態やサブタイプ間の関連性を解明することである。

(2) さらに、前向き臨床研究を行って、食道アカラシアの前駆状態とされる EGJ00 に対するアコチアミドの有効性を検証することである。

3. 研究の方法

(1) 食道粘膜及び筋層に発現するサイトカインプロファイルを用いた食道アカラシア各サブタイプの病態解明と各サブタイプ間の関係性の検討:

本臨床研究の開始に際し、九州大学病院臨床試験倫理審査委員会の承認を得た。文書を用いて同意取得後、食道アカラシア (Type I、Type II、Type III) に対する POEM 施行時に、食道粘膜及び食道筋層生検組織をとって採取した。また対照群として、外科手術を受けた食道癌患者の切除標本から食道検体を採取した。このヒト臨床検体を用いて、先行研究にて食道収縮性との関連性が示唆されるサイトカイン (Th1; TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12A, IL-12B, Th2; IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, Th17; IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23A, IL-6) とそれぞれの転写因子である T-bet、GATA3 及び ROR γ の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析した。

(2) EGJ00 に対するアコチアミドの治療効果に関する前向き臨床研究

本臨床研究の開始に際し、九州大学病院臨床試験倫理審査委員会の承認を得て、UMIN 臨床試験登録システムの登録後、前向き臨床研究を開始した。2015 年 5 月から 2018 年 9 月まで、25 例の EGJ00 患者をエントリーした。アコチアミド (300mg/日) を 4 週間の投与を行った前後で、HRM にて食道運動機能を評価した。HRM パラメーターとして、Basal LES pressure (BLESP, 13-43mmHg)、Integrated relaxation pressure (IRP, <15mmHg)、Distal contractile integral (DCI, 500-5000 mmHg*s*cm) を用いた。なお、治療後に HRM 所見が正常化した場合、有効例と判定した。

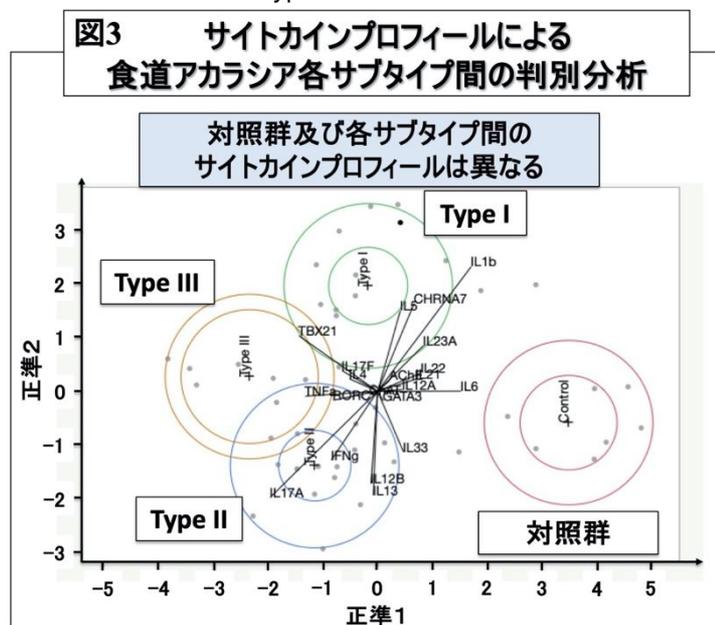
4. 研究成果

(1) 食道粘膜及び筋層に発現するサイトカインプロファイルを用いた食道アカラシア各サブタイプの病態解明と各サブタイプ間の関係性の検討

2017 年 2 月から 2020 年 3 月まで、食道アカラシア 78 例 (Type I 22 例、Type II 46 例、Type III 10 例) を登録した。また、対照群 (食道癌にて食道切除術を受けた患者) として 20 例を登録した。当院診断時の Type I、Type II 及び Type III の年齢中央値は、それぞれ 44.7 歳、57.5 歳及び 68.7 歳であった。また、Type I、Type II 及び Type III の病脳期間中央値は、それぞれ 27.5 年、7.3 年及び 10.6 年であった。

食道体部粘膜において、アカラシア群は対照群と比較して、Th1 関連サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 及び IL-12B と転写因子 T-bet の有意な発現増加を認めた。さらに Th17 関連サイトカインである IL-17A、IL-23A 及び IL-6 の有意な発現増加を認めたが、Th2 関連サイトカインの有意な発現増加は認めなかった。サブタイプ別解析では、Type I は、TNF- α 、IL-12A、IL-23A 及び転写因子の T-bet の発現増加を認め、Type II では TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-12B、IL-17A、IL-17F 及び転写因子の T-bet と ROR γ の発現増加を認めた。一方、Type III は、IL-17F 及び IL-23A のみの上昇を認めた。これらのサイトカイン及び転写因子の遺伝子発現プロファイルを用いた判別分析を行ったところ、対照群と食道アカラシア各サブタイプ間のサイトカインプロファイルは有意に異なることが明らかとなった (図 3)。

また、食道体部筋層において、アカラシア群は対照群と比較して、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 の発現増加と choline acetyltransferase (ChAT) の発現低下を認めた。サブタイプ別解析で



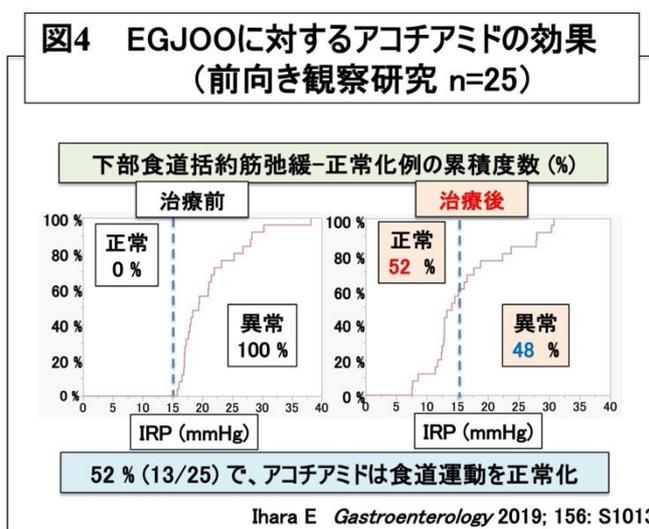
は、Type I は M3、myosin light chain kinase (MLCK)、Protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17kDa (CPI-17) の発現上昇と ChAT の発現低下を認め、Type II は、M3 の発現上昇及び ChAT の発現低下を認めたが、Type III はこれらの発現変化を認めなかった。

一方、LES 筋層においては、アカラシア群は対照群と比較して M2 の発現増加を認めたが、サブタイプ別解析でも、すべてで同様の結果を得た。食道アカラシアでは、食道体部筋層の M3 受容体の増加及び LES 部における M2 の増加を認めたが、サブタイプ間で有意な差は認められず、これらは食道アカラシアに共通した変化であると考えられた。

以上の結果より、食道アカラシアは全体として Th17 関連疾患と考えられた。Th17 反応は自己免疫性疾患との関連性が明らかとなっており、何らかの自己免疫学的機序によって食道アカラシアが引き起こされることが推測された。また、サブタイプ解析にて、Type I と Type II では共に Th17 関連サイトカインに加えて Th1 関連サイトカインが上昇していたが、Type III ではそのような変化は認められず、Type III は、Type I 及び Type II とは明らかに病態が異なる疾患と考えられた。一方、Type I と Type II は比較的類似する疾患ではあるが、判別分析の結果よりこれら 2 つも異なった疾患である可能性が示唆された。本研究の登録患者において、横断的な解析によって診断時年齢と罹病期間から算出した Type I の発症年齢は、Type II のそれと比較して、むしろ若年であることは、現在提唱されている Type II から Type I へ進行するとする仮説に矛盾する所見である。HRM 所見によって食道内圧検査上分類される食道アカラシアサブタイプは、それぞれ異なった病態を有する独立した疾患である可能性が示唆された。そのような状況下、今後さらなる検討を行って、食道アカラシアの前駆状態とされる EGJ00 と各サブタイプとの関係性を明らかにする必要がある。

(2) EGJ00 の対するアコチアミドの治療効果に関する前向き臨床研究

25 例の年齢中央値は、64.0 歳であった。FSSG のスコア中央値は、15.0 (>8) であった。アコチアミドの投与によって、25 例中 13 例が HRM 検査上、正常化した。有効群の 13 例において、治療後の BEGJP (28.9, 23.4-37.8 mmHg) と IRP (12.9, 9.3-13.9 mmHg) は、治療前の BLESPP (38.9, 31.1-48.4 mmHg) と IRP (18.5, 16.7-20.6 mmHg) と比較して、それぞれ有意に低値であった。また、治療前後で DCI に変化を認めなかった。一方、無効群 12 例においては、BLESPP (53.3, 42.1-65.7 v.s. 48.5, 38.8-58.7 mmHg)、IRP (21.5, 17.5-29.1 v.s. 21.5, 15.9-28.0 mmHg) 及び DCI (1868.2, 1214.0-3293 v.s. 2334.9, 689.8-6470.7 mmHg*s*cm) は治療前後で有意な変化を認めなかった。有効群と無効群を比較したところ、無効群では治療前の BLESPP が有意に高値であった。結論として、アコチアミドは約 50 % の EGJ00 のにおいて有効であったが、BLESPP の上昇がアコチアミド有効性低下の予測因子となることが明らかとなった。(図 4)



< 引用文献 >

1. Ates F, Vaezi MF. The Pathogenesis and Management of Achalasia: Current Status and Future Directions. Gut Liver. 2015;9(4):449-63. Epub 2015/06/20.
2. Kahrilas PJ, Bredenoord AJ, Fox M, Gyawali CP, Roman S, Smout AJ, et al. The Chicago Classification of esophageal motility disorders, v3.0. Neurogastroenterol Motil. 2015;27(2):160-74.
3. Muta K, Ihara E, Fukaura K, Tsuchida O, Ochiai T, Nakamura K. Effects of Acotiamide on the Esophageal Motility Function in Patients with Esophageal Motility Disorders: A Pilot Study. Digestion. 2016;94(1):9-16.
4. Inoue H, Sato H, Ikeda H, Onimaru M, Sato C, Minami H, et al. Per-Oral Endoscopic Myotomy: A Series of 500 Patients. J Am Coll Surg. 2015;221(2):256-64. Epub 2015/07/25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bai X, Ihara E, Otsuka Y, Tsuruta S, Hirano K, Tanaka Y, Ogino H, Hirano M, Chinen T, Akiho H, Nakamura K, Oda Y, Ogawa Y	4. 巻 857
2. 論文標題 Involvement of different receptor subtypes in prostaglandin e2-induced contraction and relaxation in the lower esophageal sphincter and esophageal body.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 172405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.172405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada S, Ihara E, Ikeda H, Muta K, Ogino H, Chinen T, Tanaka Y, Ogawa Y	4. 巻 In press
2. 論文標題 Clinical characterization of vonoprazan-refractory gastroesophageal reflux disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000503340.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukaura K, Ihara E, Ogino H, Iboshi Y, Muta K, Xiaopeng B, Hamada S, Hata Y, Iwasa T, Aso A, Nakamura K, Ogawa Y.	4. 巻 98
2. 論文標題 Mucosally Expressed Cytokines are Associated with the Esophageal Motility Function.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 95-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000487708.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Otsuka Y, Ihara E, Bai X, Chinen T, Ogino H, Akiho H, Ogawa Y
2. 発表標題 Interstitial cells of Cajal play a crucial role in the neurotransmission of nicotinic acetylcholine receptor in porcine lower esophageal sphincter.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ihara E, Muta K, Bai X, Hamada S, Ikeda H, Komori K, Ogino H, Chinen T, and Ogawa Y.
2. 発表標題 Elevation of basal egj pressure is associated with low-efficacy of acotiamide for the patients with egj outflow obstruction.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井康二、伊原栄吉、鬼丸学、井上晴洋、小川佳宏
2. 発表標題 下部食道括約筋部の粘膜及び筋層組織に発現するサイトカインプロファイルによるアカラシアサブタイプの病態解析
3. 学会等名 第61日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Muta K, Ihara E, Fukaura K, Bai X, Hata Y, Ogino H, Ochiai T, Nakamura K and Ogawa Y
2. 発表標題 Both incomplete LES relaxation and premature contraction of esophageal body are characteristics of dry swallow.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bai X, Ihara E, Otsuka Y, Ogino H, Akiho H, Nakamura K and Ogawa Y
2. 発表標題 Nicotine caused the dual regulation of tone in the porcine lower esophageal sphincter through excitatory and inhibitory enteric innervation.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hata Y
2. 発表標題 Esophagogastric Junction Outflow Obstruction is Discriminated from Achalasia by Esophageally Expressed Cytokine Profiles Using Linear Discriminant Analysis
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Muta K
2. 発表標題 Lower Esophageal Sphincter (LES) Receptive Relaxation is Indispensable for Successful LES Relaxation in Wet Swallowing
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中村 和彦 (Nakamura Kazuhiko) (00274449)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	