

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590699

研究課題名（和文） 知覚神経カルシトニン遺伝子関連ペプチドの胃粘膜恒常性維持と障害修復における役割

研究課題名（英文） Roles of Calcitonin Gene-Related Peptide in Maintenance of Gastric Mucosal Integrity and in Enhancement of Ulcer Healing and Angiogenesis.

研究代表者

大野 隆 (OHNO TAKASHI)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60185345

研究成果の概要：胃粘膜の知覚神経終末が H⁺等の刺激をセンスすることにより、軸索反射を介して神経ペプチド・CGRP が遊離され、距離のはなれた胃平滑筋、胃基底部分小循環で粘膜保護の本質的な作用を発揮していた（恒常性の維持）。さらに潰瘍治癒過程において、潰瘍周囲の上皮バリアーが破綻をきたした部位で知覚神経が刺激を受け、血管新生の初発部位である基底部分の微小血管周囲に CGRP を遊離させ、CGRP の血管新生増強作用を介して胃粘膜修復へ貢献していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科

キーワード：1. 胃粘膜恒常性維持作用，2. 粘膜傷害修復，3. 一次求心性知覚神経，4. CGRP，5. CGRPノックアウトマウス，6. 潰瘍治癒，7. 血管新生，8. VEGF-A

1. 研究開始当初の背景

胃粘膜は多くの障害因子にさらされながら恒常性を維持している。粘膜上皮には胃酸、消化酵素の分泌という消化管の機能細胞としての働きに加え、酸、酵素に対するバリアーとしての機能が常に要求される。胃粘膜上皮の恒常性・機能を支えるものとして、胃の循環、粘液産生能等があり、我々を含め多くの研究者の研究対象となってきた。それに加

え、胃などの消化管は神経系が豊富であることが知られ、しばしばセカンドブレインとも呼ばれる。従来遠心路としての迷走神経系の機能は十分に研究されてきたが、1次求心性感覚神経（知覚神経）の胃における生理的および病態生理的役割につき十分に検討されてきたわけではない。

我々は、胃の神経系、特に知覚神経の胃粘膜障害抑制機構を明かにしてきた。知覚神経

C-fiberの末梢にはカプサイシン受容体TRPV1受容体が発現しており、カプサイシン投与によって脊髄視床路に刺激が入ると同時に、軸索反射を介して逆行性に刺激伝導が生じ、知覚神経C-fiber末端からSubstance PやCalicitonin Gene-Related Peptide (CGRP)が遊離される。

これまでの成果をまとめると、

われわれの確立したア)胃粘膜基底部微小循環観察法、イ)胃内腔持続灌流神経ペプチド測定法/障害評価法でPG受容体ノックアウトマウスを用いて以下のことを明らかにしてきた。1) CGRP遊離が胃粘膜障害の抑制に重要であること、すなわち胃粘膜の血流障害や胃運動の亢進に対し遊離したCGRPが抑制的に作用すること、2) CGRPの遊離が内因性のプロスタグランジン特にPGI₂で制御されていること、さらに、最近になり我々の仲間が、スポンジ移植モデルを用いて、CGRPに血管新生増強作用があることを見出した。

強力な壊死性物質が胃粘膜に暴露されると上皮細胞の欠落を伴う潰瘍巣が出来るが、その組織修復に血管新生が重要な因子になっている。CGRPが粘膜血流障害や胃運動亢進に対し抑制的に作用する以外に、組織修復に有効に作用する可能性がある。

CGRPの多くの生物学的活性はCGRP受容体を介して起きるとが、同受容体の拮抗薬はCGRP-(8-37)というペプチドアナログが唯一存在するに過ぎない。非ペプチド性拮抗薬の創出が望まれるが、未だに成功していない。申請者はCGRP受容体の内因性リガンドであるCGRPを欠くCGRPノックアウトマウスの作出に取り組み成功した。

2. 研究の目的

(1) 申請者らの従来の研究成果(上記)のノックアウトマウスを用いた確認。

(2) 血管新生を介した胃粘膜修復におけるCGRPの役割を検討。

(3) 胃粘膜の恒常性維持、組織障害修復においてCGRPが治療標的となることを明らかにすること(明らかとなれば、既存の障害抑制を狙った薬物に加え、組織修復を増強する

薬物の開発につながる研究であり、治療法の選択肢が広がる。)

3. 研究の方法

使用動物

C57Bl/6 mouse (20-30g)のWild type (CGRP+/+)とCGRP knockout (CGRP-/-)を用いる。(CGRP knockout (CGRP-/-)マウスは当研究グループで作成している。)

(1) 胃内腔持続灌流神経ペプチド測定法/障害評価法

ウレタン麻酔下にマウスの食道と十二指腸からカテーテルを挿入して、胃内腔を生理的食塩水、50%エタノール、マイルドイリタント(1M NaCl)、カプサイシン含有50%エタノールで持続灌流する。ここで灌流液のCGRPや内因性プロスタグランジン(PGE₂及びPGI₂)の量を測定し、腺胃に対する発赤(粘膜血流のうっ血に起因する障害)面積を測定する。

(2) スポンジ血管新生モデル

ウレタン製スポンジをマウス皮下に移植し、スポンジ移植モデルを作成し、血管新生と肉芽形成を評価した。CGRPノックアウトマウスと野生型マウスでの比較も経時的に行った。

(3) 線維芽細胞とHUVEC共培養系におけるCGRP誘導血管新生の評価

サブコンフレントの状態に線維芽細胞とHUVECを共培養し、培養液にCGRPを添加し、CD31(PECAM-1)抗体で染色し、管腔構造を形成した血管長の総和を画像処理して求めた。

(4) 潰瘍作成法と評価

エーテル麻酔下で100%酢酸を含む脱脂綿を漿膜面(7 mm²)に5秒間あて潰瘍を作成し、その後の潰瘍の治癒過程を潰瘍面積と血管新生を数値化して調べた。(Wild typeとCGRP KOの比較)

① 潰瘍面積の計測(2日目、3日目、7日目、14日目で比較)

② 潰瘍組織における血管新生の程度の評価

ア) 病理組織(HE染色)における新生血管

の数.

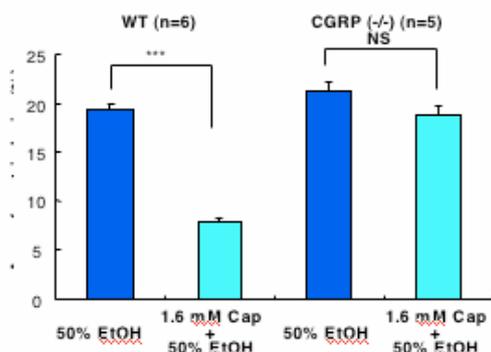
イ) 組織における血管内皮細胞のマーカー CD34 の m-RNA の発現量の測定.

ウ) 血管内皮増殖因子の VEGF-A の発現量を見る.

4. 研究成果

(1) エタノール誘発胃粘膜障害に対する知覚神経由来の CGRP の保護作用

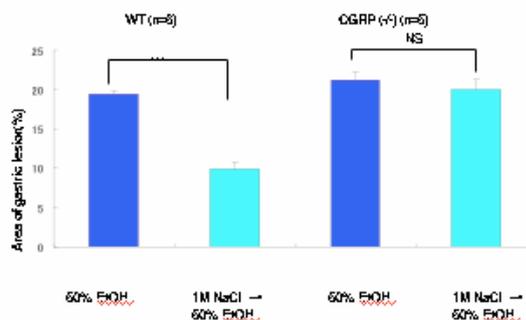
胃内腔液の CGRP 遊離量を測定しつつ胃粘膜傷害を評価した. 50%エタノールを胃内に暴露すると約 20%の腺胃に発赤(粘膜血流のうっ血に起因する障害)を認め, カプサイシンでその抑制が見られるが, ア) CGRP ノックアウトマウス(下図), イ) CGRP アンタゴニス



ト, ウ) 化学的除神経(新生児時期にカプサイシン皮下投与), エ) 胃支配知覚神経後根選択的切除で障害抑制が解除された. 野生型マウスでは, 内因性の PGE2 及び PGI2 の増加が見られ, PGI2 受容体ノックアウトマウスでは, 野生型に比べ, 還流液中の CGRP 遊離量が減少していた.

マイルドイリタント (1M NaCl) の前投与でも, カプサイシン同様のエタノールに対する保護作用が, 野生型マウスでは見られる. CGRP ノックアウトマウスでは, 野生型で見られる CGRP の放出遊離が完全に消失し, 1M NaCl によっても保護作用が見られなかった(右上図).

以上の成績は, 胃粘膜基底微循環観察法でも確認できた. エタノールは同部の微循環で, 集合細静脈および細静脈の収縮をもたらし, 胃粘膜の発赤が生じる. この収縮反応は, CGRP を観察窓に局所投与することにより抑制された. カプサイシン, マイルドイリ



タント (1M NaCl) の粘膜面への前投与でも, 集合細静脈および細静脈の収縮は抑制された. さらに, この抑制効果は CGRP 拮抗薬の CGRP (8-37) で完全に消失した.

(2) スポンジ血管新生モデルにおける知覚神経由来の CGRP の作用

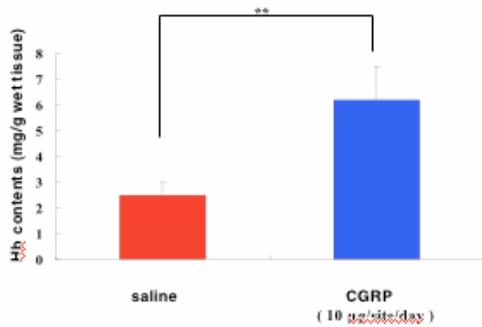
① スポンジ移植モデルでの血管新生に対する CGRP 含有知覚神経の役割

CGRP ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスを用い, 以下の2つの方法で知覚神経を遮断し, エーテル麻酔下で遮断神経支配領域の皮下に, 滅菌したウレタン製スポンジを移植し, 経時的にスポンジの周囲の新生血管を, 新生血管密度 (CD31 内皮マーカー染色を行い, NIH イメージで計測), CD31 Northern blot で評価した. 知覚神経機能は, ア) 生後間もなく十分量のカプサイシンを皮下投与し, 神経ペプチドを枯渇させる, イ) 後根を外科的に切断する, ことにより遮断し, 同処置の sham 群と血管新生を比較した.

CGRP ノックアウトマウスではワイルドタイプマウスに比べ血管新生が有意に抑制された. 外科的に切断した後根神経節遠位端で知覚神経を切断すると, その支配領域に植えたスポンジの血管新生反応が有意に抑制された. カプサイシンによる化学的除神経を行ったマウスでも, vehicle 投与マウスに比べ, 有意に血管新生反応が抑制された.

② 遊離神経ペプチドの血管新生増強作用の確認

同新生血管モデルで, スポンジに外から神経ペプチド (SP, CGRP, NKA) を連日投与し, 血管新生増強作用の有無, 強さを調べた. 特に CGRP で血管新生の増強が顕著であった(下図・次頁).



さらに、内因性の神経ペプチドの血管新生増強作用を確認する目的で、CGRP⁻(8-37) (CGRP拮抗薬)を投与(スポンジ局所投与、あるいは浸透圧ポンプを用い持続投与した)し、血管新生に対する効果を調べると、いずれの投与方法でもbFGF刺激の血管新生反応が有意に抑制された。

③ 創傷治癒巣での血管新生に対する知覚神経の役割

ラット背部皮下の皮膚を直径8mmで切除し、神経遮断の有無により、創傷治癒、血管新生に違いがあるか調べた。CGRPノックアウトマウスではワイルドタイプマウスに比べ血管新生が有意に抑制され、創傷治癒の遅延が認められた。

(3) 線維芽細胞とHUVEC共培養系におけるCGRP誘導血管新生の評価

CGRP30 μMで有意な血管新生の増強が見られ、*in vivo*のスポンジモデルでの成績がこの系でも確認できた。

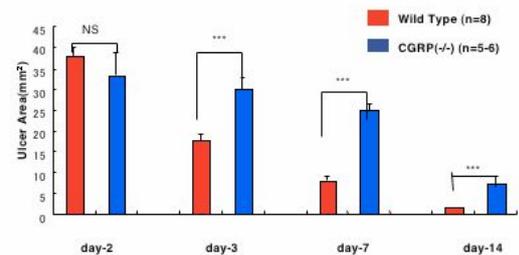
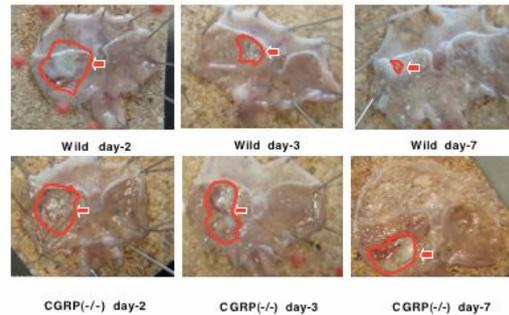
(4) 実験的潰瘍モデルにおける組織修復に対する知覚神経由来のCGRPの作用

常法に従い、酢酸潰瘍モデルを作成し、血管新生と肉芽形成、潰瘍治癒過程をCGRPノックアウトマウスで経時的に評価した。あわせて血管新生を評価し、VEGF等の血管新生因子の発現量を潰瘍治癒巣で調べた。

① CGRPノックアウトマウスにおける潰瘍治癒経過

CGRPノックアウトマウスとワイルドタイプマウスを用い、酢酸を漿膜面に適用し、経時的に粘膜面での潰瘍の大きさを評価した。ワイルドタイプマウスでは、14日程度で潰瘍がほぼ完全に治癒したのに対し、CGRPノックアウトマウスでは潰瘍の治癒が有意に遅

れ、14日目でも完全に治癒することは無かった。(下図)



② 潰瘍治癒巣の肉芽組織における血管密度の測定結果

CGRPノックアウトマウスとワイルドタイプマウスを用い、酢酸を漿膜面に適用し、経時的に粘膜面での潰瘍巣の肉芽組織を摘出し、ザンボニ固定液で固定後、免疫組織化学を施行した。CD31抗体で染色し新生血管密度を測定したところ、ワイルドタイプマウスに比較して、CGRPノックアウトマウスで有意に血管密度が低下していた。

③ 潰瘍治癒巣の肉芽組織におけるRT-PCR成績

潰瘍底での血管新生誘導因子を、RT-PCRで調べた。CD31内皮マーカーのmRNAはワイルドタイプマウスに比較して、CGRPノックアウトマウスで有意に血管密度が低下していた。複数の血管新生因子を調べた中でVEGFが、CGRPノックアウトマウスで有意に血管密度が低下していた。

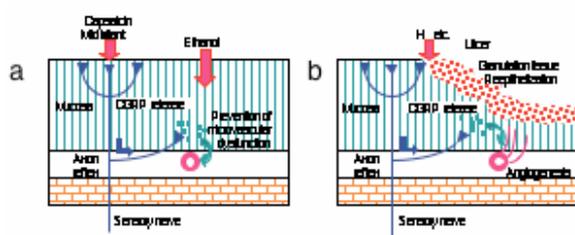
(5) まとめ・意義

胃は外部からの様々な障害物質に常にさらされ、それに対抗する防御機構を装備している。胃の知覚神経系の役割については不明な点が少ない。胃は内腔の障害誘発物質のセンシングを行いそれに対応し防御系を作動させる(ニューラル・エマージェンシーシステム)。神経系の特徴は、早い伝導速度

で情報を遠くはなれたところに伝える点にある。今回の研究の目途の主たるところは、知覚神経が神経系のこの特色を生かして、胃の防御機構の中心的役割を演じていることを明確にしようとするものである。

これまで我々は、知覚神経に含まれる神経ペプチドCGRPが重要であることを繰り返し報告してきた。本研究では下図aのように内腔直下の自由終末がH⁺等の刺激をセンスし、軸索反射を介して距離のはなれた胃平滑筋、胃基底部微小循環で粘膜保護の本質的な作用を発揮していることを証明できた。このような観点で胃の知覚神経、神経ペプチドの役割を研究するアプローチはこれまでになかった。

さらに、本研究では、CGRPの血管新生増強作用の胃粘膜修復への貢献を評価した(下図b)。CGRPの血管新生に対する作用は、我々が開発した定量的血管新生評価モデルであるスポンジ皮下移植モデルで認められた生物学的活性であり、これに注目し血管新生が重要な役割を果たす潰瘍治癒過程を調べることにした。これも潰瘍周囲の上皮バリアーが破綻をきたした部位で知覚神経が刺激を受け、血管新生の初発部位である基底部の微小血管周囲にCGRPを放出させていることが強く示唆されることから検討対象とした。



以上のように、知覚神経の持つ空間的分布特性の本質を研究主題とする取り組みはこれまでに全くない。

この研究で胃粘膜の恒常性維持、組織障害修復においてCGRPが治療標的となることを明らかにすることが出来た。既存の障害抑制を狙った薬物に加え、組織修復機構を増強する薬物の開発につながる研究であり、胃粘膜障害に対する治療法の選択肢が広がり、多くの患者が恩恵を受けると考えられる。

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2件)

① T. Ohno, Y. Hattori, R. Komine, T. Ae, S. Mizuguchi, K. Arai, T. Saeki, T. Suzuki, K. Hosono, I. Hayashi, Y. Oh-hashii, Y. Kurihara, H. Kurihara, K. Amagase, S. Okabe, K. Saigenji, M. Majima. Roles of Calcitonin Gene-Related Peptide in Maintenance of Gastric Mucosal Integrity and in Enhancement of Ulcer Healing and Angiogenesis. *Gastroenterology* 134: 215-225, 2008. (査読有り)

② Y. Hattori, T. Ohno, T. Ae, T. Saeki, K. Arai, S. Mizuguchi, K. Saigenji, M. Majima. Gastric mucosal protection against ethanol by EP2 and EP4 signaling through the inhibition of leukotriene C4 production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G80-GF87. 2008. (査読有り)

[学会発表] (計13件)

① Takako Ae, Takashi Ohno, Youichiro Hattori, Katsunori Saigenji, Masataka Majima. Roles of an inducible prostaglandin E synthase, mPGES-1 in the healing of acetic acid-induced gastric ulcer and angiogenesis. DDW2009 (Chicago) 2009.05.30-06.04.

② Masataka Majima, Masaya Toda, Tatsunori Suzuki, Kanako Hosono, Takako Ae, Kento Nakatani, Takashi Ohno. Neuronal system-dependent facilitation of angiogenesis during tumor development and ulcer healing. The 13th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology (Shimoda) 2009.04.17-18.

③ Takako Ae, Takashi Ohno, Youichiro Hattori, Katsunori Saigenji, Masataka Majima. Roles of an inducible prostaglandin E synthase, mPGES-1 in the

healing of acetic acid-induced gastric ulcer. The 13th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology (Shimoda) 2009. 04. 17-18 .

④ 阿江太佳子, 大野隆, 服部庸一郎, 西元寺克禮, 馬嶋正隆. Role of an inducible prostaglandin E synthase, mPGES-1 in the healing of acetic acid-induced gastric ulcer. 第82回日本薬理学会年会 (横浜). 2009. 03. 16-18.

⑤ 大野隆, 馬嶋正隆. Neuronal system-dependent facilitation of angiogenesis during tumor development and ulcer healing. 第34回日本微小循環学会年次総会 (東京・北里大学白金キャンパス). 2009. 02. 20-21.

⑥ T. Ohno, R. Komine, Y. Hattori, S. Mizuguchi, K. Arai, T. Saeki, T. Suzuki, K. Hosono, S. Okabe, K. Saigenji, M. Majima. Endogenous Calcitonin Gene-Related Peptide Exhibits Protective Action in Gastric Mucosal Injury and Facilitates Ulcer Healing and Angiogenesis. The 12th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology (Shimoda) 2007. 04. 27-28

⑦ Y. Hattori, T. Ohno, T. Saeki, S. Mizuguchi, K. Arai, K. Saigenji, M. Majima. Gastric mucosal protection against ethanol by EP2 and EP4 signaling through the inhibition of leukotriene C4 production. The 12th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology (Shimoda). 2007. 04. 27-28.

⑧ 服部庸一郎, 大野隆, 佐伯威男, 水口澄人, 新井勝春, 西元寺克禮, 馬嶋正隆. エタノール胃粘膜障害に対するLTC4産生抑制を介したEP2およびEP4作動薬による保護作用. 第93回日本消化器病学会総会 (青森). 2007. 04. 19-21.

⑨ 服部庸一郎, 大野隆, 新井勝春, 水口澄人, 佐伯威男, 西元寺克禮, 馬嶋正隆. Gastric mucosal protection through the inhibition

of Leukotriene C4 production by an EP2 agonist and an EP4 agonist. 第80回日本薬理学会年会 (名古屋). 2007. 03. 14-16.

⑩ 服部庸一郎, 大野隆, 新井勝春, 水口澄人, 西元寺克禮, 馬嶋正隆. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal injury elicited by ethanol through EP2 and EP4 signaling by reducing leukotriene C4 production. 第32回日本微小循環学会総会 (京都). 2007. 02. 23-24.

⑪ 服部庸一郎, 大野隆, 佐伯威男, 水口澄人, 新井勝春, 西元寺克禮, 馬嶋正隆. 胃粘膜保護作用を発揮するプロスタグランジンE2受容体の特定-ラット灌流モデルを用いた解析-. 第48回日本消化器病学会大会 (札幌). 2006. 11. 11-14.

⑫ 大野隆, 馬嶋正隆. シンポジウム CGRPの胃粘膜恒常性維持と傷害修復における役割-胃粘膜微小循環の観点より-. 潰瘍病態研究会 第15回フォーラム (東京). 2006. 08. 19 .

⑬ 服部庸一郎, 大野隆, 佐伯威男, 水口澄人, 新井勝春, 西元寺克禮, 馬嶋正隆. 胃粘膜保護作用を発揮するプロスタグランジンE2受容体の特定-胃粘膜微小循環観察法を用いた解析-. 第92回日本消化器病学会総会 (小倉). 2006. 04. 20-22.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 隆 (OHNO TAKASHI)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60185345

(2) 研究分担者

馬嶋 正隆 (MAJIMA MASATAKA)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70181641

佐伯 威男 (SAEKI TAKAO)

北里大学・医学部・助手

研究者番号：20265614

新井 勝春 (ARAI KATSU HARU)

北里大学・医学部・助手

研究者番号：50286259