

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08019

研究課題名(和文) 機能性消化管障害の新規治療標的の探索 - 粘膜内微小炎症による知覚受容の増強 -

研究課題名(英文) Novel Therapeutic Targets for Functional Gastrointestinal Disorders

研究代表者

近藤 隆 (Takashi, Kondo)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：90594870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：機能性胃腸疾患の原因には生活上のストレスなどの心理的・社会的要因が病態に影響を及ぼしていると言われている。今回、出生直後に母子間の接触が断つことで母子分離ストレスを与えたラットでは、成長後の機械刺激に対する胃知覚過敏を示し、さらに十二指腸粘膜内の好酸球数が正常と比較して有意に多いことを明らかにした。さらに、母子分離ストレスラットにデキサメサゾンを前投与することにより、十二指腸粘膜内の好酸球浸潤を抑制すると、胃知覚過敏が抑制されることも明らかにした。以上の結果により、母子分離ストレス動物モデルは、機能性ディスペプシアの患者に類似した胃知覚過敏を示す有用な病態モデルであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果により、生直後のストレスが引き金となり、成長後に胃十二指腸粘膜内での好酸球増加を主とする微小炎症を引き起こすこと、その結果として胃十二指腸粘膜の知覚過敏に結びついている可能性が示唆された。このことは、機能性消化管疾患患者の症状発現メカニズムの病態解明に結びつき新たな治療ターゲットの発見に結びつくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The underlying mechanism between micro-inflammation and FD remains unknown. In this study, using a maternal separation (MS)-induced FD model, we aimed to reproduce the gastroduodenal micro-inflammation and reveal the interaction of gastroduodenal micro-inflammation and gastric hypersensitivity. MS model was established by separating newborn Sprague Dawley rats for 2 h a day from postnatal day 1 to 10. At 7-8 weeks of age, electromyography was used to determine the visceromotor response to gastric distention (GD). MS-induced FD rats underwent gastric hypersensitivity with GD. Eosinophils were significantly increased in the gastroduodenal tract. Treatment with dexamethasone reversed gastric hypersensitivity in MS-induced FD rats by inhibiting eosinophil infiltration. Our results indicate that neonatal MS stress induces eosinophil-associated gastroduodenal micro-inflammation and gastric hypersensitivity at adulthood in rats. Micro-inflammation contributes to gastric hypersensitivity.

研究分野：神経消化器病学

キーワード：機能性消化管疾患 内臓知覚過敏

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

機能性ディスぺプシア (FD) 患者では、幼少時の強いストレスが本疾患の発症と関連していることが報告されている。Maternal Separation (MS) ラットは、出生直後に母親から分離し母子間の接触が断たれることによる強いストレスがかかることにより、成長後に内臓知覚過敏を生じることが知られている。

近年、FD 患者の十二指腸粘膜内の好酸球を中心とする微小炎症が、FD の病態に重要な役割を果たしている可能性が示されているが、十二指腸微小炎症と内臓知覚過敏との関連については、これまで明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

このような背景の中、本研究では MS ラットにおいて、上部消化管である胃の知覚過敏と運動機能異常を生じているかどうか、MS ラットの胃十二指腸の粘膜組織内に、好酸球やマスト細胞を中心とした微小炎症が生じているかどうか、MS ラットの微細炎症と胃知覚過敏と関連しているかどうかにつき明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 母子分離ラット

Sprague Dawley ラットを使用した。生後 1-10 日目まで、1 日 2 時間の母子分離ストレスを連続的に負荷し、その後 8 週齢になるまで通常に飼育することにより、母子分離 (MS) ストレス負荷ラットを作成した。

#### (2) 胃伸展刺激に伴う疼痛関連動作の測定

7-8 週齢で、予め胃内に留置した、胃内バルーンに各種圧 (20, 40, 60, 80 mmHg) を加えることにより胃伸展刺激を与え、それにより誘発される僧帽筋の筋電図を内臓痛関連動作の指標として測定した。

#### (3) 胃排出機能の測定

0.05% フェノールレッド溶液を経口投与し、その 30 分後に胃内の残留フェノールレッド濃度を測定し胃排出能を測定した。

#### (4) 脊髄後角のリン酸化 ERK1/2 の発現

内臓知覚神経系において ERK1/2 の活性化が痛みのマーカーとして有用であることが報告されている。そこで、胃伸展刺激を加えた 2 分後に、Th9/10 の脊髄を摘出し、ERK1/2 活性化の指標であるリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) に対する polyclonal 抗体を用いた免疫染色を施行した。

#### (5) 胃・十二指腸粘膜内の好酸球と肥満細胞の発現

胃・十二指腸組織の凍結切片を作成し、HE 染色および免疫染色を施行した。肥満細胞のマーカーとしてトリプターゼを使用し、好酸球のマーカーとしてメジャー塩基性タンパク質 (MBP) を使用した。活性化された好酸球を識別するために、MBP および CD11b の二重染色を行った。さらに、好酸球に発現する好酸球ペルオキシダーゼ (EPO)、顆粒球系および単球系の細胞に発現するミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を o-フェニレンジアミンと o-ジアニジジン二塩酸塩の酸化反応を用いて測定した。

#### (6) デキサメタゾンによる薬物治療

MS ラットの胃・十二指腸組織内における好酸球を抑制する目的に、デキサメタゾン (DEX) 1 mg/kg を 3 日間連続で腹腔内投与し、胃伸展刺激に対する疼痛関連動作と胃運動機能を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) MS ラットの胃知覚過敏

MS ラット群では、60mmHg と 80 mmHg の胃伸展刺激に対する僧帽筋の筋電図活動は、コントロール群と比べて有意に増強した (60 mmHg  $P < 0.01$ ; 80mmHg:  $P < 0.05$ ) (図 1)。また、胃伸展刺激 (バルーン内圧 80 mmHg) 2 分後の脊髄後角において、p-ERK 免疫反応 (p-ERK-ir) 細胞数は、MS 群が対照群に比べて有意に多かった ( $P < 0.05$ )。

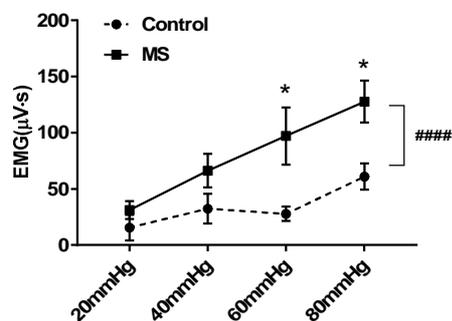


図 1. 胃伸展刺激に伴う疼痛関連動作

- (2) MS ラットの胃運動異常：胃排出能は、MS ストレス負荷群では、コントロール群と比較して有意に低下していた ( $P < 0.001$ )。
- (3) 胃・十二指腸組織内の好酸球と肥満細胞：MS 群の胃と十二指腸粘膜内の MBP-ir 細胞の密度は、対照群と比較して有意に増加していた (胃  $P < 0.05$ 、十二指腸  $P < 0.05$ )。一方で、胃と十二指腸粘膜におけるトリプターゼ免疫反応性 (トリプターゼ-ir) 細胞の濃度は、対照群と MS 群との間に有意な差は認めなかった。

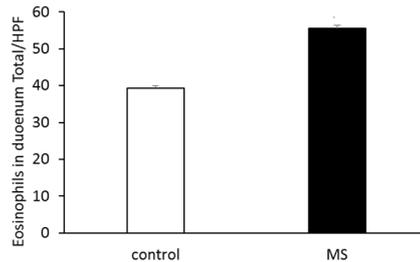


図2. 十二指腸粘膜における好酸球数

- (4) MS ラットにおける好酸球の活性化状態：MS ラットの十二指腸では、CD11b 免疫反応性 (CD11b-ir) 細胞が、対照ラットに比べて、有意に高かった ( $P < 0.001$ )。活性化された好酸球を識別するために、MBP および CD11b の二重染色を行ったところ、活性化好酸球が MS ラットで有意に増加していた ( $n=6$ ,  $P < 0.001$ )。MS ラットの胃十二指腸組織の EPO 活性は、対照ラットに比べて有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。MPO は MS ラットと対照ラットの間では MPO 活性に差がなかった。
- (5) デキサメタゾン (DEX) による胃知覚過敏への影響：DEX 処理した MS 群では、胃と十二指腸粘膜組織の両方でコントロール MS 群と比較して、好酸球数が有意に低下していた (胃,  $P < 0.01$ ; ; 十二指腸,  $P < 0.001$ )。また、DEX 処理した MS 群では、コントロール MS 群と比較して、60 mmHg および 80 mmHg での胃伸展刺激に対する僧帽筋の筋電図活動が有意に抑制された ( $P < 0.05$ ) (図3)。

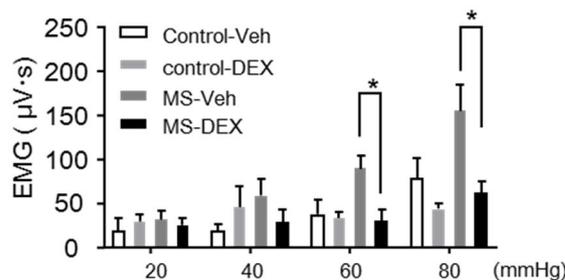


図3. デキサメタゾン (DEX) 投与後の胃知覚過敏

## 5. 結論と考察

- (1) 新生仔期に母子分離ストレスを負荷した MS ラットでは、成長後に胃伸展刺激に対する胃知覚過敏が生じるとともに、胃排出遅延を認めた。また、MS ラットでは胃伸展刺激後の脊髄後角で痛みの指標である p-ERK1/2 陽性細胞数が増加していることから、MS ラットはコントロールと比べ胃伸展刺激に対する疼痛感受性が高いことが判明した。この結果から MS ラットが、FD 疾患の病態類似動物モデルとして有用であると考えられる。
- (2) MS ラットの胃十二指腸粘膜で好酸球数の有意な増加を認め、DEX 投与で胃十二指腸の好酸球を抑制すると、胃知覚過敏が抑制され、胃排出遅延も改善した。この結果は、生直後のストレスが胃十二指腸粘膜内での好酸球増加を主とする微小炎症を起こし、それが胃十二指腸粘膜の感受性を高め内臓知覚過敏を生じ、症状が生じやすくなっている可能性が示唆される。以上の結果は、FD 症状発現メカニズムの病態解明に結びつくことが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Duan Shaoqi, Kondo Takashi, Miwa Hiroto, Yang Yanjing, Wang Shenglan, Kanda Hirosato, Kogure Yoko, Imamura Nobuko, Fujimura Tadahiro, Kono Tomoaki, Fukushima Masashi, Tozawa Katsuyuki, Tomita Toshihiko, Oshima Tadayuki, Fukui Hirokazu, Yamamoto Satoshi, Noguchi Koichi, Dai Yi	4. 巻 320
2. 論文標題 Eosinophil-associated microinflammation in the gastroduodenal tract contributes to gastric hypersensitivity in a rat model of early-life adversity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G206 ~ G216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00313.2020	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shaoqi Duan, Takashi Kondo, Yanjing Yang, Shenglan Wang, Yoko Kogure, Tomoaki Kono, Katsuyuki Tozawa, Toshihiko Tomita, Tadayuki Oshima, Hirokazu Fukui, Jiro Watari, Yi Dai, Koichi Noguchi, Hiroto Miwa
2. 発表標題 Early-Life Adversity Induced Sex-Dependent Gastric Hypersensitivity.
3. 学会等名 Digestive Disease Week, San Diego, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Kondo, Shaoqi Duan, Hiroto Miwa
2. 発表標題 Early-life stress induced gastric hypersensitivity in adult rats. International Session
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week (JDDW) 2019, Kobe, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Kondo, Shaoqi Duan, Hirokazu Eda, Kumiko Nakamura, Akio Tamura, Tomoaki Ogawa, Takahisa Yamasaki, Tomoaki Kono, Katsuyuki Tozawa, Toshihiko Tomita, Tadayuki Oshima, Hirokazu Fukui, Jiro Watari, Yi Dai, Koichi Noguchi, Hiroto Miwa
2. 発表標題 Effect of Yokukansan, a traditional herbal medicine, on gastric hypersensitivity in a rodent model of functional dyspepsia
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Week (APDW) 2019, Kolkata, India (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	三輪 洋人  (Miwa Hiroto)  (80190833)	兵庫医科大学・医学部・教授   (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------