

平成21年 6月20日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790501  
 研究課題名 (和文) 細胞間接合装置機能からみた食道粘膜防御機構と新たな病態分類に関する研究  
 研究課題名 (英文) Esophageal mucosal defense mechanisms and a new pathophysiological classification by intercellular junctional complex  
 研究代表者  
 大島 忠之 (OSHIMA TADAYUKI)  
 兵庫医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：00381814

## 研究成果の概要：

食道粘膜防御機構を解析する上で、種々の実験的操作を行うには不可欠である食道粘膜上皮様重層扁平上皮初代培養細胞系を世界で初めて確立した。また粘膜透過性上昇には、酸以外に胆汁酸が重要な役割をしていることを見出した。

一方ヒト食道生検組織では、非びらん性食道炎患者の食道粘膜上皮基底層の細胞間隙の開大が認められ、この開大とタイト結合蛋白の発現との相関を明らかとすべく継続して解析を進めている。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：逆流性食道炎，タイト結合，クローディン

## 1. 研究開始当初の背景

食道内酸逆流によって起こる下部食道粘膜のびらんもしくは潰瘍，あるいは胸やけ・呑酸の定型的自覚症状のあるものと定義される“胃食道逆流症”は定義上ひとつにまとめられているが，粘膜障害の発生机序，症状の発生机序は複雑であり，ひとつの原因で説明をつけることは困難である。胃食道逆流症 (GERD) には内視鏡で食道炎がないにもかかわらず症状がある“非びらん性胃食道逆流症”，内視鏡的にびらんなどの粘膜障害が認められる“逆流性食道炎”，食道の円柱上皮化成をきたした“バレット食道”の三つのタイプの疾患が含まれる。非びらん性

胃食道逆流症は逆流性食道炎の軽症型，バレット食道は，逆流性食道炎の重症型であるとの概念が主流であったが，最近の研究から三つの疾患は食道内への酸逆流がその原因ではあるものの，その基本的な病態が異なっておりお互いの移行がむしろ少ないのではないかと新しい考えが提唱され注目されている。

この病態に関与する攻撃因子として酸，胆汁酸があげられ，防御機構としては，粘膜バリア機能，消化管運動，酸感受性があげられるが，多要因が複雑に絡みあっていると思われる。未だ病態は十分に解明されていない。一方でこのような症状，あるいは内視鏡所見を

認める患者さんは日本人の10%以上にも及び、近年増加傾向にあり、良性疾患ではあるものの生活の質が極めて悪い病態であると報告されている。

本研究は、食道粘膜の防御機構である細胞間接着装置のバリア機能を明らかにすると共に胃食道逆流症のそれぞれの病態あるいは機能性ディスペプシアとの重複病態を明らかにし、食道粘膜バリア機能からみたあらゆる病態分類を試みることを目的とする。

タイト結合蛋白が発見される以前に Tobeyらは逆流性食道炎の食道粘膜で上皮細胞間隙の拡大を電子顕微鏡レベルで確認しており、粘膜表面において粘膜バリアの破綻が想定される。近年オクルーディン、JAM、クローディンといった新たな細胞表面に発現するタイト結合蛋白が発見されて注目されている。申請者はこれまでに、胃粘膜上皮や大腸粘膜上皮のタイト結合蛋白の解析を行ってきており、それぞれの臓器で異なった様相を呈している。すなわち申請者は大腸粘膜上皮では siRNA を使用した検討からクローディン-4 がバリア機能に重要であることを報告し、胃粘膜上皮では JAM-A がバリア機能を担う分子として重要であることを報告している。一方食道のタイト結合蛋白に関する報告はこれまでほとんどなく、依然明らかとなっていない。またクローディンは1から24まで24種類が報告されているが、それぞれ臓器特異的な発現パターンを呈し、それぞれの臓器における透過性、バリア機能が制御されていると考えられる。これらのことから食道における生体側のバリア機能としての細胞間接着装置、特にタイト結合の機能を解析することは非常に重要であり、またこの機能の破綻、あるいはこの機能の改善が、病態にどのように関わっているかを検討することは非常に重要であると考え今回の研究を発想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞間接着装置からみた胃食道逆流症の病態解明のために、食道粘膜における細胞間接着装置の発現と機能を解析することを目的とした。ヒト食道生検組織と種々の培養細胞系で食道粘膜上皮細胞に発現するタイト結合蛋白、アドヘレンス結合蛋白、ギャップ結合蛋白を蛍光免疫染色、Western blotting で明らかとし、遺伝子レベルでの発現を定量的に real time PCR で検討することとした。発現するクローディンが明らかとなったところで、それぞれの蛋白機能がどのように絡み合って食道粘膜のバリア機能を形成しているかをそれぞれのタイト結合蛋白のノ

ックダウンによりその機能解析を行いたい。また電子顕微鏡レベルで食道扁平上皮の微細構造の解析も加えたい。ヒト組織での実験的検討は困難であるため培養細胞系では、攻撃因子と考えられる酸や胆汁酸の刺激を行うことでこれら細胞間接着装置に変化がみられるかどうか、タイト結合蛋白の発現や局在に変化がみられるかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 食道粘膜様上皮細胞を用いてタイト結合蛋白クローディン、オクルーディン、JAM-A、アドヘレンス結合蛋白(カドヘリン、ネクチン、アフジン)、ギャップ結合蛋白(コネキシン)の発現を蛍光免疫染色と Western blotting で確認する。クローディンに関しては特異抗体の購入可能なクローディン(1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 18)(Invitrogen)に対して蛍光免疫染色を行う。タイト結合やアドヘレンス結合の裏打ち蛋白であるZO-1、ZO-2、ZO-3、カテニン( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )に対する蛍光免疫染色も行う。また Western blotting でも蛋白発現を検討する。また mRNA レベルは real time PCR で定量的に検討する。

(2) 光学顕微鏡レベルでの局在の検討には、細胞を2重あるいは3重染色し、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡でそれぞれの蛋白の細胞膜と細胞質の局在を検討する。

(3) 電子顕微鏡で細胞間接着装置(タイト結合、アドヘレンス結合、ギャップ結合)の有無の観察を行う。蛍光免疫染色で細胞間細胞膜に局在することが明らかとなったタイト結合、アドヘレンス結合、ギャップ結合蛋白の細胞間での局在をさらに詳細に検討したい。これら食道粘膜上皮細胞株でのバリア機能を生理的に測定するために粘膜透過性を検討する目的で電気抵抗値測定と蛍光色素トレーサ(FSA)の透過性測定を行う。

(4) 食道粘膜様上皮細胞を使用し、食道粘膜の攻撃因子と考えられる酸(pH2, pH3, pH4)や胆汁酸;タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸、タウロデオキシコール酸、デオキシコール酸(0.1~10mM)を投与し、これら蛋白の発現変化、局在変化、粘膜透過性の変化を上記と同様の方法で検討する。

それぞれのタイト結合蛋白(クローディン、オクルーディン、JAM-A、ZO-1)の発現を制御し、この制御下での電気抵抗の変化、透過性変化を検討することでそれぞれのギャップ結合蛋白の発現変化、電気抵抗の変化、蛍光色素(FSA)の透過性変化を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では、まず食道粘膜上皮細胞株でのタイト結合蛋白の発現を蛍光免疫組織染色, Western blotting, real time PCR で確認をした。TE-1細胞に、Western blotting ではクロードイン-1, -3, -4, -7, オクルーディン, JAM-A, ZO-1, ZO-2の発現を、蛍光免疫染色では、クロードイン-4, -7, オクルーディン, ZO-1, ZO-2の発現を確認した。また mRNA の発現は real time PCR で、クロードイン-1, -2, -3, -4, -6, -7, -9, -11, -12, -14, -15, -20, -22の発現を確認した。pH4 刺激により Western blotting の検討でクロードイン-7, JAM-Aの発現は一過性に低下した。また pH4 刺激によりクロードイン-1の発現増強がみられた。一方、pH2 刺激では、これらタイト結合蛋白の変化はみられなかった。

TE-1細胞を使用して透過性試験としてFSAの透過性や電気抵抗値の測定を試みたが、十分な電気抵抗値、上皮による透過性の制御を得るには至らなかった。

(2) 扁平上皮の特性としてシート状に細胞の増殖が得られにくい可能性があり、次に本研究では、ALI (air liquid interface) の手法を用いて初代培養系細胞で透過性を十分に制御する細胞シートの作成を試みた。この検討から食道粘膜上皮様重層扁平上皮初代培養細胞系を世界で初めて確立し、この細胞系のタイト結合発現様式 (クロードイン-1, -4, -7, JAM-A, オクルーディン), サイトケラチン発現様式 (サイトケラチン4, 13) が、生検により得られたヒト食道粘膜上皮の発現と全く同様であることを確認した。また mRNA レベルでは、クロードイン-1, -2, -3, -4, -7の発現を確認した。

(3) この細胞系に酸刺激を行うと pH3 刺激では、蛍光色素による細胞間透過性上昇は見られなかったが、pH2 刺激では、透過性が上昇した。また興味深いことに胆汁酸 (タウロコール酸, デオキシコール酸) 刺激と pH3 刺激を同時に行うと細胞透過性は上昇し、この透過性上昇には、クロードインの発現局在変化が関与していることを明らかとした。これはヒトの逆流性食道炎において酸以外に胆汁が重要であることを示している。

(4) また電子顕微鏡下での細胞間接着装置の観察では、デスモゾームの発現は、ヒト組織と同様に明らかであるが、タイト結合については、以前から議論のあるところであり、今後免疫電顕での確認が必要である。

(5) ヒト食道生検組織では、非びらん性食道

炎患者の細胞間隙の開大は明らかであり、この開大が症状発現に関与していると考えられた。一方この開大は、食道粘膜上皮の基底層にみられ有棘層、顆粒層ではみられないことが明らかとなった。タイト結合蛋白の発現局在も顆粒層にみられるタイト結合蛋白が透過性には重要であると考えられ、基底層優位に発現するタイト結合蛋白発現と細胞間隙開大との相関についての検討は現在も継続して検討を行っている。

またクロードインは24種類も存在することからそれぞれのクロードインの恒常発現細胞を樹立し、それぞれのクロードインの機能解析を継続して検討している。

本研究では、食道粘膜上皮防御機構を解析する上で非常に有用と思われる食道粘膜上皮様重層扁平上皮初代培養細胞系を世界で初めて確立した。今後この培養系を使用することで種々の防御機構の制御を検討することが可能であると思われる。

#### 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8件)

- ① Miwa H, Oshima T, Sakurai J, Tomita T, Matsumoto T, Iizuka S, Koseki J. Experimental oesophagitis in the rat is associated with decreased voluntary movement. *Neurogastroenterol Motil.* 2009; 21: 296-303. 査読有
- ② 大島忠之, 三輪洋人. 非びらん性胃食道逆流症 (NERD) の病態と治療. *日本消化器病学会雑誌* 106 巻3号 Page327-334 (2009.3) 査読無
- ③ Miwa H, Oshima T, Tomita T, Kim Y, Hori K, Matsumoto T. Gastro-esophageal reflux disease: the recent trend in Japan. *Clin J Gastroenterol.* 2008; 1: 133-8. 査読有
- ④ Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23 Suppl 2: S146-50. 査読有
- ⑤ Hashimoto K, Oshima T, Tomita T, Kim Y, Matsumoto T, Joh T, Miwa H. Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376: 154-7. 査読有
- ⑥ Oshima T, Miwa H, Joh T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7.

- Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 295: C800-6. 査読有
- ⑦ Miwa H, Yokoyama T, Hori K, Sakagami T, Oshima T, Tomita T, Fujiwara Y, Saita H, Itou T, Ogawa H, Nakamura Y, Kishi K, Murayama Y, Hayashi E, Kobayashi K, Tano N, Matsushita K, Kawamoto H, Sawada Y, Ohkawa A, Arai E, Nagao K, Hamamoto N, Sugiyasu Y, Sugimoto K, Hara H, Tanimura M, Honda Y, Isozaki K, Noda S, Kubota S, Himeno S. Interobserver agreement in endoscopic evaluation of reflux esophagitis using a modified Los Angeles classification incorporating grades N and M: a validation study in a cohort of Japanese endoscopists. Dis Esophagus. 2008; 21: 355-63. 査読有
- ⑧ Amano Y, Yamashita H, Koshino K, Ohshima T, Miwa H, Iwakiri R, Fujimoto K, Manabe N, Haruma K, Kinoshita Y. Does magnifying endoscopy improve the diagnosis of erosive esophagitis? J Gastroenterol Hepatol. 2008; 23: 1063-8. 査読有
- ⑨ Oshima T, Sasaki M, Kataoka H, Miwa H, Takeuchi T, Joh T. Wipl protects hydrogen peroxide-induced colonic epithelial barrier dysfunction. Cell Mol Life Sci. 2007; 64: 3139-47. 査読有
- ⑩ 大島忠之, 三輪洋人. 【生活習慣病と消化器疾患】 生活習慣からみた消化器疾患 胃食道逆流症と生活習慣. 総合臨床 56 巻 11 号 Page3029-3032(2007. 11) 査読無
- ⑪ 大島忠之, 三輪洋人. 【NERD の病態と治療】 内臓知覚からみた NERD の病態. G. I. Research 15 巻 3 号 Page196-201(2007. 06) 査読無
- ⑫ 大島忠之, 三輪洋人. 【胃食道逆流症 (GERD) 非びらん性逆流症 (NERD) を含めて】 GERD の病因論. 日本臨床 65 巻 5 号 Page797-801(2007. 05) 査読無
- model. (Digestive Disease Week 2008. 2008. 5. 20. San Diego, California, USA)
- ② Oshima T, Joh T, Miwa H. Aspirin induced gastric epithelial barrier dysfunction and tight junction. (The 1st International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS) 2008. 2. 8. Osaka, Japan)
- ③ Miwa H, Hori K, Oshima T, Yamamoto N, Matsumoto T. Recent trend of GERD in Japan. (APDW 2007. 2007. 10. 18. Kobe, Japan)
- ④ Miwa H, Oshima T, Tomita T, Sakurai J, Matsumoto T, Koseki J. Decreased rat voluntary movement as a measure of chronic visceral pain -a study using the rat chronic acid reflux esophagitis model. (Digestive Disease Week 2007. 2007. 5. 23. Washington DC, USA)
- ⑤ Oshima T, Joh T, Kataoka H, Sasaki M, Matsumoto T, Miwa H. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAP kinase via claudin-7. (Digestive Disease Week 2007. 2007. 5. 21. Washington DC, USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 忠之 (OSHIMA TADAYUKI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00381814

### [学会発表] (計 5 件)

- ① Oshima T, Koseki J, Iizuka S, Tomita T, Matsumoto T, Sakurai J, Miwa H. Proton pump inhibitor treatment ameliorates dilated intercellular space, decrease and dislocalization of esophageal mucosal tight junction proteins in a rat chronic acid reflux esophagitis

