

令和 5 年 4 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08334

研究課題名(和文) 多角的な視点による各サブタイプに基づいた食道アカラシアの病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of esophageal achalasia based on their subtypes from the multiple perspectives.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食道運動の生理機序と食道アカラシアの病態について以下を明らかとした。神経型ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が引き起こす下部食道括約筋(LES)弛緩反応は、神経伝達物質ATPによるカハールの介在細胞の過分極反応が関与する。食道アカラシア患者では、ミオシン軽鎖リン酸化レベルが有意に低下する。食道アカラシア患者の食道粘膜菌叢は、嫌気性菌を中心とした20種類以上の菌叢変化を認め、diversityで表される多様性が増加する。高解像度食道内圧検査結果に基づいて食道運動を模倣する数理モデルの作成が可能であった。モデルを用いて食道アカラシアの内圧所見を再現することが可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道運動は、食道期の嚥下機能を担う。食道運動が破綻した食道運動機能障害は、つらい症状・嚥下困難から「快食」が妨げられ、生活の質を低下させるのみならず、重症化すれば「誤嚥性肺炎」をきたし生命予後に影響を及ぼすため重要な疾患である。しかしながら、これまで方法論の限界によって、食道期の嚥下機能に関する研究は発展途上であった。本研究の社会的意義は、食道運動の生理機序と破綻状態である食道アカラシアの病態の一端を解明に成功したことで、高齢社会において「快食」と「誤嚥予防」に観点から健康長寿に貢献する今後の研究開発の突破口をつくったことである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the physiological mechanisms of esophageal motility and the pathology of esophageal achalasia. (1) Lower esophageal sphincter (LES) relaxation induced by stimulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors involves hyperpolarization of Cajal interstitial cells via the neurotransmitter ATP. (2) Myosin light chain phosphorylation level is significantly decreased in patients with esophageal achalasia. (3) Proportions of more than 20 types of bacterial including anaerobic bacteria and -diversity were increased in esophageal flora of patients with achalasia. (4) We could create a mathematical model that imitates esophageal motility based on the results of high-resolution esophageal manometry. The internal pressure findings of esophageal achalasia could be reproduced using the model.

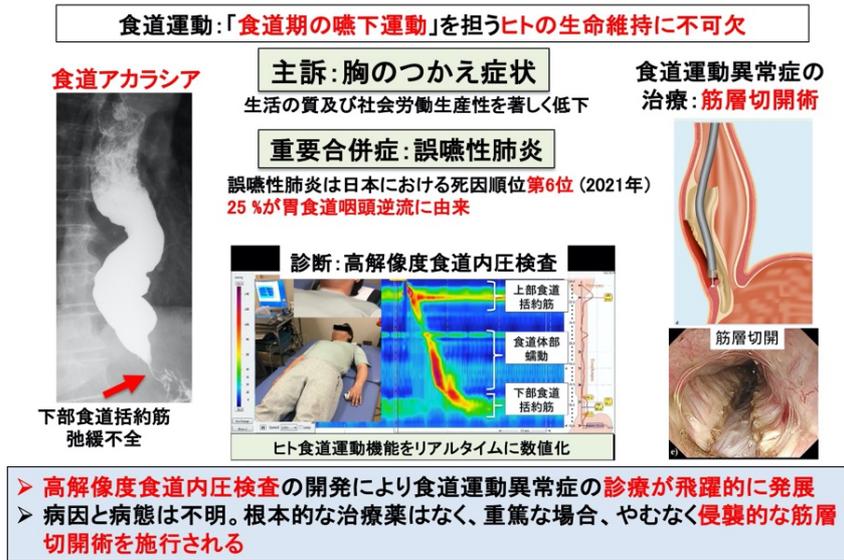
研究分野：消化器内科学

キーワード：食道アカラシア 高解像度食道内圧検査 アカラシアサブタイプ

### 1. 研究開始当初の背景

食道アカラシアは、下部食道括約筋弛緩不全と食道体部蠕動障害を特徴とする機能性の消化管疾患の1つである。嚥下困難や非心臓性胸痛のつらい症状から生活の質を低下させるのみでなく、誤嚥性肺炎や食道癌の合併によって生命をも脅かす重要な疾患である。これまで「機能性」という疾患の性質上、内視鏡検査を用いても病態評価が困難でありその結果、診断及び治療法の開発が遅れていた。最近、食道運動機能評価を詳細に評価できる高解像度食道内圧検査が開発されたことで、食道アカラシアの診療は飛躍的に発展した(図1)。

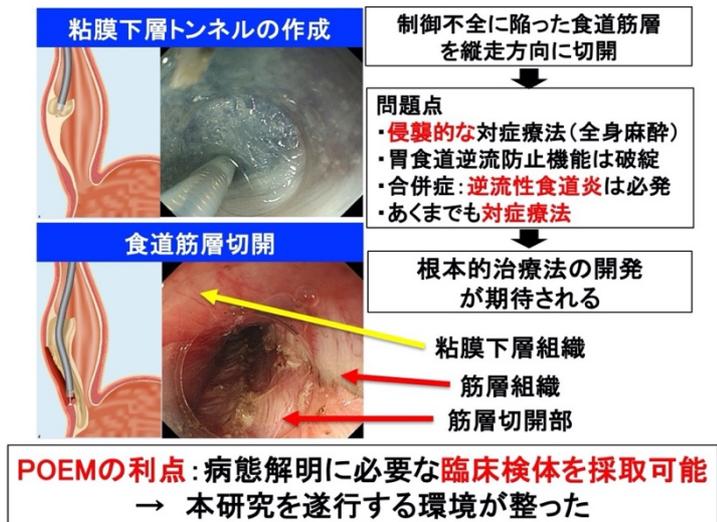
図1 高解像度食道内圧検査の開発と食道アカラシア



一方、食道運動機能は、消化管神経細胞、カハールの介在細胞 (ICC) 及び平滑筋細胞の緻密なネットワークによって制御されている。神経細胞は、シナプス結合または

シナプス様結合によってそれぞれ平滑筋及び ICC と連結し、ICC は gap junction で平滑筋と連結している。このネットワークの起点は神経型ニコチン受容体 (nAChR) である。生理的な条件下で、嚥下刺激は迷走神経刺激を介して nAChR を活性化し、弛緩物質である一酸化窒素 (NO) や vasoactive intestinal peptide (VIP) を放出させ、下部食道括約筋を弛緩させる[1]。ごく最近、応募者らは一部のアカラシア患者では nAChR を構成する  $\alpha 3$  または  $\beta 4$  サブユニットに対する自己抗体が産生されていることを明らかにしたが[2]、これは食道アカラシアの病態における nAChR の重要性を示すものである。嚥下刺激-迷走神経-nAChR を介した下部食道括約筋弛緩反応の調節において、神経細胞と平滑筋とネットワークを形成する ICC は重要な役割を果たすと推測されるがその詳細は不明である。

図2 食道機能障害に対する経口内視鏡的筋層切開術 (POEM)



これまで食道アカラシアは、宿主の遺伝的要因を背景とした何らかの炎症・免疫反応によって抑制系神経が障害されている状態であると推測されてきたが[3]、未だ、炎

症・免疫反応が、神経細胞-ICC-平滑筋細胞ネットワークまたは各細胞にどのように機能障害を引き起こしているかは不明である。最近、食道運動機能障害に対する経口内視鏡的筋層切開術（Per-oral endoscopic myotomy; POEM）が開発され、内視鏡下に病態解析を行うための病変部食道筋層の臨床検体の採取が可能になったことで（図 2）、食道運動の生理と破綻状態である食道アカラシアの病態解明に挑戦する本研究の研究環境が整った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は多角的な視点から食道運動の生理と破綻状態である食道アカラシア病態解明することである。

(1) ブタ食道を用いて神経細胞-ICC-平滑筋細胞のネットワークの起点となる神経型 nAChR の観点から ICC の役割に注目して生理的な下部食道括約筋弛緩反応の機序を解明する。

(2) 食道アカラシア臨床検体を用いた平滑筋収縮タンパク解析を行って下部食道括約筋弛緩不全の機序を解明する。

(3) 炎症・免疫反応を引き起こす原因となる食道細菌叢の変化を食道アカラシアにおける検討する。

(4) 高解像度食道内圧検査に基づいた食道運動を模倣して、食道アカラシアを表現する数理モデルを構築する。

## 3. 研究の方法

(1) 神経型 nAChR 刺激によるブタ下部食道括約筋弛緩反応の機序解明：

ブタ下部食道括約筋輪走平滑筋条片を用いて、選択的なアゴニストである DMPP（1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium）による nAChR 刺激が引き起こす下部食道括約筋弛緩反応の機序を神経細胞-ICC-平滑筋細胞ネットワークの観点から解明する。

(2) 食道アカラシアで認める下部食道括約筋弛緩不全の機序解明：

食道アカラシアの筋層臨床検体を用いて、ex vivo の条件下で、神経細胞、ICC 及び平滑筋細胞のそれぞれを刺激するニコチン、サブスタンス P 及びカルバコール刺激を行った後、組織を TCA/アセトンにて急速凍結する。Phostag-SDS-PAGE を施行して、平滑筋収縮を制御するミオシン軽鎖リン酸化レベルおよびミオシン軽鎖脱リン酸化酵素を制御する CPI-17 の発現を評価することで、平滑筋収縮蛋白の観点から食道アカラシアの病態解明を目指す。

(3) 食道アカラシアにおける食道細菌叢変化：

食道粘膜生検組織を用いて 16S rRNA 遺伝子解析を行う。食道アカラシアの食道細菌叢がどのように変化しているかを明らかにする。

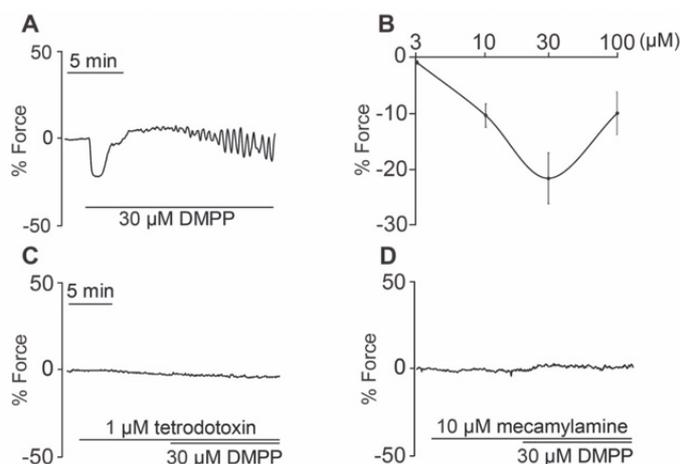
(4) 食道運動を模倣する数理モデルの構築：

高解像度食道内圧検査にて可視化した食道運動の基づいて、食道運動を模倣する数理モデルを構築する。さらに構築した数理モデルを用いて食道運動異常症の代表疾患である食道アカラシアを模倣できるかを検証する。

## 4. 研究成果

(1) 神経型 nAChR 刺激によるブタ下部食道括約筋弛緩反応の機序解明：

**図3** ブタ下部食道括約筋において、DMPPによる神経型ニコチン性アセチルコリン受容体刺激は濃度依存性に一過性弛緩反応を引き起こす



DMPP は、ブタ LES 輪走平滑筋に対して濃度依存性に一過性弛緩反応を引き起こした (図 3)。DMPP が惹起する弛緩反応は、1  $\mu\text{M}$  テトロドトキシンの前処置だけでなく、100  $\mu\text{M}$  carboxoxolone (ICC・平滑筋間のギャップ結合阻害剤)、100  $\mu\text{M}$  CaCCinh-A01 (ICC 上に存在する  $\text{Ca}^{2+}$ 活性化  $\text{Cl}^-$ チャネル阻害剤として作用するアノクタミン-1 阻害剤)、および  $\text{Cl}^-$ -free 溶液の前処置による ICC 活性阻害によっても完全に消失した。また、100  $\mu\text{M}$  *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester の前処置は、DMPP が惹起する弛緩反応にほとんど影響を及ぼさなかった。さらに 40mM  $\text{K}^+$  前処置にて過分極反応を抑制したところ一過性弛緩反応は消失したが、 $\text{K}^+$ チャネルブロッカー自体はなんら抑制効果を示さなかった (図 4)。DMPP による LES 一過性弛緩反応に  $\text{K}^+$ チャネルの関与は否定的であり、 $\text{Cl}^-$ チャネルを介した ICC の関与であることをサポートする所見であった。さらに、DMPP が惹起する一過性弛緩反応は、プリン作動性 P2 受容体アンタゴニストである 1 mM スラミンでは抑制されたが (図 5)、血管作動性腸管ペプチド (VIP)受容体アンタゴニストである 1  $\mu\text{M}$  VIP (6-28)では抑制されなかった。また、アデノシン三リン酸 (ATP)でプリン作動性 P2 受容体を刺激すると、弛緩反応が引き起こされたが、この弛緩反応は CaCCinh-A01 の前処置によって ICC の活性を阻害すると消失した。結論として、DMPP が惹起する弛緩反応にアノクタミン-1 の活性化を介した ICC の膜過分極が中心的な役割を果たしている。ATP は抑制性腸管神経の神経伝達物質として ICC を刺激すると考えられる。ICC は神経型 nACh 受容体の神経伝達における介在細胞として働き、LES の弛緩反応を引き起こしていることを明らかにした。本研究成果は、**Eur J Pharmacol** に報告した[4]。

(2) 食道アカラシアで認める下部食道括約筋弛緩不全の機序解明 :

臨床検体を用いて平滑筋収縮を制御するミオシン軽鎖リン酸化レベルを評価したところ、食道アカラシアでは対照群と比較してリン酸化レベルが低下していた (図 6)。食道アカラシアでは、ミオシン脱リン酸化酵素を抑制する CPI-17 の発現と活性化が低下して、食道アカラシアにおけるミオシン軽鎖リン酸化レベルの低下を引き起こされる結果を得た。

図4 下部食道括約筋においてDMPPが惹起する一過性弛緩反応には過分極反応が関与する

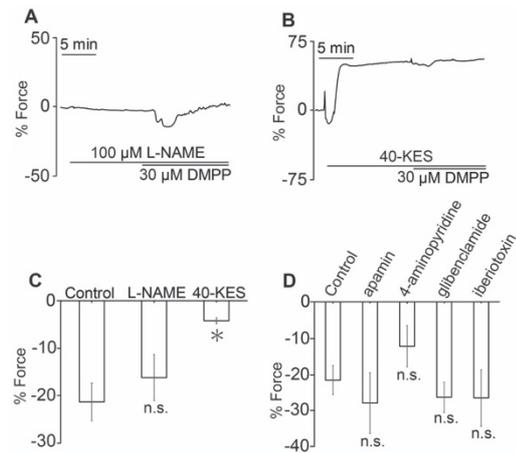


図5 下部食道括約筋においてDMPPが惹起する一過性弛緩反応にはATP-P2X2受容体が関与する

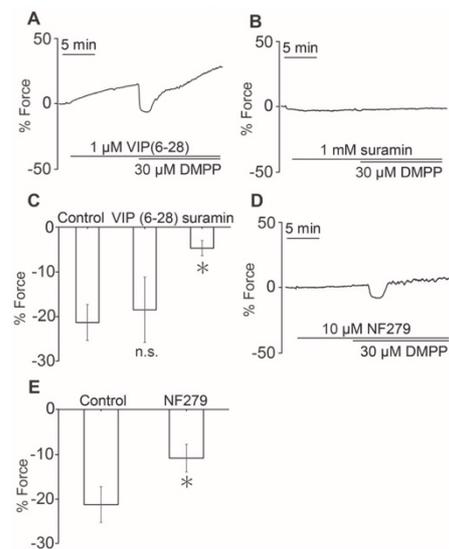
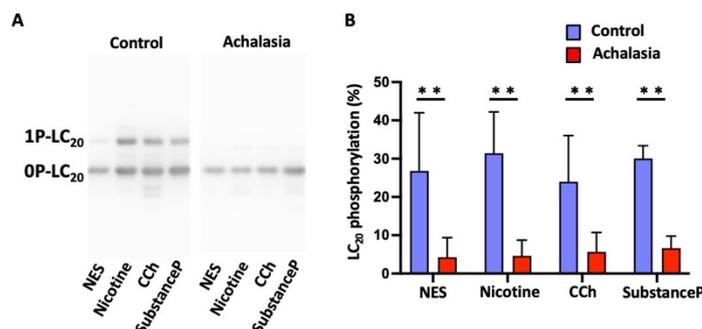
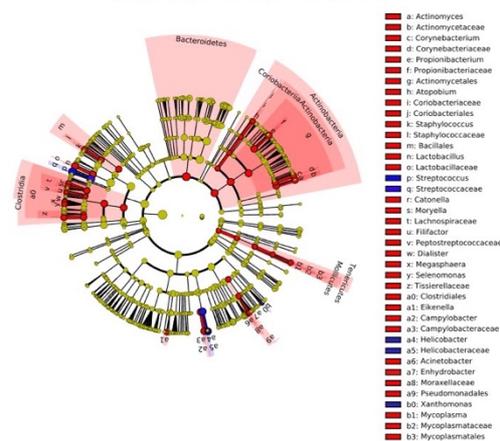


図6 食道アカラシアでは、ミオシン軽鎖リン酸化が障害される



(3) 食道アカラシアにおける食道細菌叢変化：  
 アカラシア患者の食道粘膜菌叢は、対照群（早期胃癌で治療をおこなった患者）と比較して、嫌気性菌を中心とした 20 種類以上の菌叢変化を認め、 $\alpha$  diversity で示す多様性が増加していた（図 7）。本研究は、食道アカラシアの食道細菌叢が変化していることを初めて明らかにした。食道アカラシアでは食道クリアランス障害を認めるため、食道細菌叢の変化が食道アカラシアの原因となっているか、結果であるのか、その両方が考えられるのかについて、今後、さらなる検討が必要である。

図 7 食道アカラシアでは食道細菌叢が変化する

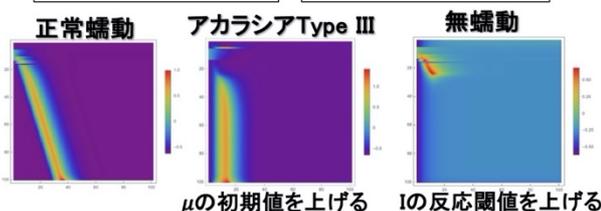


(4) 食道運動を模倣する数理モデルの構築：  
 食道の筋肉は、口側 1/3 は横紋筋領域で、筋移行部を経て肛門側 2/3 は食道体部と呼ばれる平滑筋領域である。食道運動機能異常の大部分は、下部食道括約筋を含む肛門側 2/3 の平滑筋領域に起因するため、平滑筋領域に着目し、高解像度食道内圧検査で表現される食道運動機能の数理モデル化を行った。食道体部の蠕動は、2 つの数式を組み合わせてモデル化した。1 つ目は、食道の局所的動態を表現するための、電気生理現象のモデル化に広く用いられる FitzHugh-Nagumo 方程式で、2 つ目は、シグナルの空間的伝播を示すためのカーネルである。また下部食道括約筋は安静時に収縮性を維持し、嚥下時には一過性弛緩反応が引き起こされる。この LES の二相性反応を FitzHugh-Nagumo 方程式のパラメーターを変え、双安定型で表現した。結果として、口側から肛門側へと収縮が伝播する食道蠕動収縮と、定常状態では収縮し嚥下により弛緩する下部食道括約筋のモデル化が可能であった。また、作成した数理モデルにて、食道アカラシアの内圧所見を再現することが可能であった（図 8）。今後数理モデルの検証を進めることで、実臨床での食道内圧検査結果に対し、数理モデルが障害部位推測や治療方針決定に寄与できる可能性がある。

図 8 数理モデルの構築と数理モデルで再現したアカラシアの内圧所見

$$\begin{aligned} \mu' &= 10(\mu - \mu^3 - v) - \omega \\ v' &= \mu - 0.8v + I \\ \omega &= \kappa * \mu \end{aligned}$$

$\mu'$ : 膜電位の時間変化  
 $v$ : 不活性化,  $I$ : 外部入力  
 $\omega$ : 点刺激に対する反応



- ▶ 腸管平滑筋の性質を定式化
  - 食道蠕動運動のダイナミクスを再現
- ▶ 興奮系の反応項とカーネルを組み合わせる。
  - 一方方向にしか興奮が伝播しない系を作成
- ▶ パラメーターのチューニング
  - アカラシアと無蠕動の内圧所見を再現

- 1 Farre R, Auli M, Lecea B, Martinez E, Clave P: Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. J Pharmacol Exp Ther 316(3): 1238-1248, 2006
- 2 Mukaino A, Minami H, Isomoto H, Hamamoto H, Ihara E, Maeda Y, Higuchi O, Okanishi T, Kokudo Y, Deguchi K, Sasaki F, Ueki T, Murata KY, Yoshida T, Kinjo M, Ogawa Y, Ido A, Matsuo H, Nakao K, Nakane S: Anti-ganglionic achr antibodies in japanese patients with motility disorders. J Gastroenterol 53(12): 1227-1240, 2018
- 3 Pandolfino JE, Gawron AJ: Achalasia: A systematic review. JAMA 313(18): 1841-1852, 2015
- 4 Otsuka Y, Bai X, Tanaka Y, Ihara E, Chinen T, Ogino H, Ogawa Y: Involvement of interstitial cells of cajal in nicotinic acetylcholine receptor-induced relaxation of the porcine lower esophageal sphincter. Eur J Pharmacol 910174491, 2021

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuka, Y. Bai, X. Tanaka, Y. Ihara, E. Chinen, T. Ogino, H. Ogawa, Y.	4. 巻 910
2. 論文標題 Involvement of interstitial cells of Cajal in nicotinic acetylcholine receptor-induced relaxation of the porcine lower esophageal sphincter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 174491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2021.174491	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 Muta K, Ihara E, Hamada S, Ikeda H, Wada M, Hata Y, Bai X, Nishihara Y, Tanaka Y, Ogino H and Ogawa Y	4. 巻 なし
2. 論文標題 Physiological and pathological roles of the accommodation response in lower esophageal sphincter relaxation during wet swallows	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Report (In press)	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ihara E, Ogino H, Muta K, Hamada S, Wada M, Hata Y, Ikeda H, Bai X, Minoda Y, Esaki M, Tanaka Y, Chinen T, Ogawa Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 The treatment effects of acotiamide in esophagogastric outflow obstruction: A prospective longitudinal observational study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 332-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10388-021-00887-1	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 Igarashi-Hisayoshi Y, Ihara E, Bai X, Higashi C, Ikeda H, Tanaka Y, Hirano M, Ogino H, Chinen T, Taguchi Y, Ogawa Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Determination of region-specific roles of the m3 muscarinic acetylcholine receptor in gastrointestinal motility.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci	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） 10.1007/s10620-022-07637-y	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 Hata Y, Ihara E, Wada M, Tsuru H, Muta K, Minoda Y, Bai X, Esaki M, Tanaka Y, Chinen T, Ogino H, Sakamoto R, Ogawa Y	4. 巻 57
2. 論文標題 Improved esophagography screening for esophageal motility disorders using wave appearance and supra-junctional ballooning.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 838-847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01913-4	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hata Y, Hamada S, Wada M, Ikeda H, Komori K, Ogino H, Ihara E, Akiho H and Ogawa Y
2. 発表標題 Usefulness of barium esophagram with newly developed wave appearance in screening tool for esophageal motility disorders.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ihara E, Hamada S, Muta K, Wada M, Hata Y, Ikeda H, Tanaka Y, Ogino H, Chinen T, Ogawa Y.
2. 発表標題 Usefulness of onigiri esophagography combined with an obstruction level classification system in screening esophageal motility disorders
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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

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
---------	---------