

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590684

研究課題名（和文） 糖尿病患者におけるカプサイシン感受性神経の食道運動障害に与える影響についての検討

研究課題名（英文） Effects on esophageal motor disorder by capsaicin-sensitive nerves in patients with diabetes

研究代表者

古田 賢司（FURUTA KENJI）

島根大学・医学部・講師

研究者番号：40362933

研究成果の概要（和文）：

正常ラットの上部・下部食道及び後根神経節における TRPV1、TRPV2、TRPA1 の mRNA 発現レベルを免疫組織学的および分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、後根神経節における mRNA の発現レベルは高かったが、上部-下部食道間では違いを認めなかった。一方、慢性逆流性食道炎モデルでは、下部に比し上部において TRPV1、TRPV2、TRPA1 の mRNA の発現レベルは高い傾向を示した。正常人、逆流性食道炎患者でも検討を行っているが、現段階では食道の部位別で mRNA の発現レベルに違いはみられていない。

研究成果の概要（英文）：

The mRNA expression levels of TRPV1, TRPV2, and TRPA1 in the upper and lower esophagus, and dorsal root ganglion of normal rats were examined using immunohistological and molecular biological techniques. mRNA expression levels were highest in the dorsal root ganglion, while no differences were observed between the upper and lower esophagus. In contrast, in a rat model of reflux esophagitis, the mRNA expression levels of TRPV1, TRPV2, and TRPA1 tended to be higher in the upper as compared to the lower esophagus. In our previous studies of normal subjects and patients with reflux esophagitis, no site-specific differences in regard to the levels of mRNA expression in the esophagus have been observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：GERD、TRP

1. 研究開始当初の背景

胃食道逆流症 (GERD) は、胸やけなどの GERD 症状を認め内視鏡で食道粘膜にびらん・潰瘍が見られる内視鏡陽性 GERD つまり逆流性食道炎例と、内視鏡で異常を認めない非びらん性 GERD (NERD) の大きく二つに分類される。欧米では GERD の頻度は数十%で、その半数以上が NERD といわれている。本邦でも日本人の胃酸分泌量が増加、*H. pylori* 感染率の低下、life style の欧米化、高齢化に伴う食道裂孔ヘルニアの増加、食道運動機能の低下、唾液分泌の減少、社会環境の変化により内視鏡陽性 GERD (逆流性食道炎)、NERD とともに増加傾向を示している。どちらも、その主な症状は胸焼け・呑酸・胸痛であり、慢性的な苦痛をきたすことで患者の quality of life は著しく障害される。

逆流性食道炎患者では、粘膜傷害の程度と症状が必ずしも一致しない。粘膜傷害が軽くても症状が強い場合もあれば、粘膜傷害が強くても症状がみられない場合もある。NERD患者では粘膜傷害が認められないにもかかわらず逆流性食道炎患者よりも強い症状を訴えることが多い。NERDは逆流性食道炎の軽症のものとして以前は考えられていたが、最近の研究によりその発生機序は逆流性食道炎と異なり、内臓知覚過敏、食道収縮、精神的な要素などが関係している異なった病態を有する例が多いことが明らかとなってきた。

電子顕微鏡レベルでの細胞間隙の拡大、痛み刺激に対するレセプターの分布頻度、痛みに対する感受性の閾値の低下など様々な要因が絡み合って症状発現の違いを生み出しているものと考えている。しかし、すべての事がこれらで説明できる

わけではなく、痛み刺激に対する感受性の違いが生じる機序はまだまだ解明されたとは言えない。

食道粘膜にはカプサイシンをはじめとし、プロトン、熱などによって活性化される多刺激痛覚レセプターとして機能する transient receptor potential V1 (TRPV1) が存在する。TRPV1 欠損マウスの解析により TRPV1 が生体内で広範な痛覚刺激レセプターとして働いていることが明らかとなっており、TRPV1 欠損マウスはカプサイシン投与による痛み反応を示さず、熱刺激感受性も低下していることが確認されている。 TRPV1 欠損マウスでは炎症の際に見られる熱性痛覚過敏が見られなくなっており、炎症性疼痛の発生に TRPV1 が重要な働きをしていることを示している。また TRPV1 と受容体構造が類似する TRP イオンチャンネルスーパーファミリーのなかには、高熱刺激受容体 TRPV2、涼刺激受容体 TRPM8 や冷刺激受容体 TRPA1 といった温度感受性受容体があり、これらの受容体は温度を受容するだけでなく、香辛料の成分によって活性化される。これらの受容体は温度センサーとして皮膚に発現しているが、消化管にも多く発現しており、消化管における消化管知覚に関与している可能性が示唆されている。しかし、これまでに TRPV1 を除く温度感受性受容体の消化管知覚への関与について詳細に検討した報告はみられない。

2. 研究の目的

GERD 症状は粘膜傷害の程度とは必ずしも一致しないことが多いが、そのメカニズムは明らかとなっていない。食道粘膜にはカプサイシンをはじめとし、プロトン、熱

などによって活性化される多刺激痛覚レセプターとして機能する transient receptor potential V1 (TRPV1) が存在している。生体内で広範な痛覚刺激レセプターとして働いていることが明らかとなっているが、食道粘膜には TRPV1 以外にも多数の感覚受容体が存在していると報告されている。TRP イオンチャネルスーパーファミリーに属する温度感受性受容体の中にも TRPV1 以外にも食道に発現しているとされているとの報告が見られる。しかし、これらの受容体が GERD 症状に関与しているか否かに関する検討はこれまでなされていない。そこで、ラット（正常、逆流性食道炎モデル）、ヒト（正常例、GERD 例）の食道における TRP イオンチャネルスーパーファミリーに属する温度感覚受容体の発現の有無、分布を検討し食道知覚のメカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 正常ラットを対象とした TRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1 の発現・分布に関する検討

10週齢のWister系オスラット20匹をエーテル麻酔下に屠殺し、食道及び後根神経節を摘出、食道粘膜病変の有無、程度を観察後直ちに摘出した食道を縦方向に2分し、半分をHE染色およびCGRP、サブスタンスPの免疫組織染色用としホルマリン固定する。残りの半分を食道の下部、中部、上部の3つに分け凍結保存する。凍結保存した材料よりウェスタンブロット解析、RT-PCR解析にて、TRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1の蛋白レベルおよびmRNAの発現を検討する。また免疫染色あるいはin situ hybridizationなど用いて受容体の局在についても明らかにする。カプサイシン感受性神経週末から放出されるカルシト

ニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、サブスタンスPについても同様に検討する。

(2) ラット慢性逆流性食道炎モデルによるTRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1の発現・分布に関する検討

この検討では、7週齢のWister系オスラットにおいて、慢性逆流性食道炎モデルを作成し検討を行う。慢性逆流性食道炎モデルはOmuraらの方法(Omura N, et al, Scand J Gastroenterol, 1999)に従い、ラットの前胃部分を結紮し胃用量を減少させ、さらに幽門輪すぐ肛門側の十二指腸に18Frのネラトンリングをかけることによって作成する。このモデルを作成した正常ラットでは3週間後には食道に潰瘍が形成されることが明らかとなっているが、慢性逆流性食道炎モデルを作成した正常ラットを1週目、2週目、3週目に屠殺し、食道及び後根神経節を摘出、食道粘膜病変の有無、程度を観察後直ちに摘出した食道を縦方向に2分し、半分をHE染色および免疫組織染色用としホルマリン固定する。後根神経節も同様に処理し、残りの半分を食道の下部、中部、上部の3つに分け凍結保存する。凍結保存した材料よりウェスタンブロット解析、RT-PCR解析にて、TRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1の蛋白レベルおよびmRNAの発現を検討する。カプサイシン感受性神経週末から放出されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、サブスタンスPについても同様に検討する。

(3) ヒトを対象としたTRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1の発現・分布に関する検討

文書にて本研究について同意を得られた正常者、日本版QUEST問診表の6点以上の逆流症状を有するNERD患者、逆流症状を

有する逆流性食道炎患者、逆流症状のない逆流性食道炎患者の4群を設定し、各々20例を対象として、内視鏡下に胃食道接合部の1cm・5cm・10cm・15cm口側の4方向を生検して検体を採取する。それぞれの対象者20名から採取した病理組織検体を処理しウェスタンブロット解析、RT-PCR解析にて、TRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1、CGRP、サブスタンスPの蛋白レベルおよびmRNAの発現を検討する。さらに内視鏡的に粘膜傷害が存在する部位と存在しない部位とでその発現に違いが見られるか否かについて検討する。

4. 研究成果

(1) 正常ラット及び慢性逆流性食道炎ラットによる TRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1 の発現・分布に関する検討

10週齢の正常ラットの上部・下部食道及び後根神経節におけるTRPV1、TRPV2、TRPA1のmRNAの発現レベルを免疫組織学的および分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、TRPV1、TRPV2、TRPA1のmRNA発現レベルは食道組織よりも後根神経節で有意に高いという結果が得られた。また、TRPV1、TRPV2、TRPA1のmRNA発現レベルは食道上部と下部で違いが認められなかった。

続いて10週齢のラット慢性逆流性食道炎モデルを用いてTRPV1、TRPV2、TRPA1のmRNA発現レベルを検討した。その結果、後根神経節でのmRNA発現レベルはcontrol、sham群および慢性逆流性食道炎モデルの間で有意な違いを認めなかった。食道組織でのmRNA発現レベルは、controlとsham群では食道の部位によって違いは認めなかったが、慢性逆流性食道炎モデルにおいては下部食道に比し上部食道で有意に高い値を示した。

(2) ヒトを対象とした TRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1 の発現・分布に関する検討

正常患者10名、GERDのうちNERD症例5名、逆流性食道炎gradeA症例2名、逆流性食道炎gradeB症例2名、逆流性食道炎gradeC症例2名、逆流性食道炎gradeD症例2名の食道・上部・中部・下部からそれぞれ少なくとも1か所ずつ内視鏡下に生検を行いTRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1の発現について検討を行った。TRPファミリーの受容体の発現量が少ないことから、すべての症例についての検討ができていないわけではないが、検討した範囲では動物実験でみられたような、食道の部位による発現・分布に大きな違いは認められなかった。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 賢司 (FURUTA KENJI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：40362933

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

相見 正史 (AIMI MASAHIRO)

島根大学・医学部・医科医員

深澤 厚輔 (FUKAZAWA KOUSUKE)
島根大学・医学部・医科医員

森藤 吉哉 (MORITO YOSHIYA)
島根大学・医学部・医科医員

三代 剛 (MISHIRO TUYOSHI)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：20599427

足立 経一 (ADACHI KYOICHI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：50192969

木下 芳一 (YOSHIKAZU KINOSHITA)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：30243306