

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790536

研究課題名(和文) 機能性ディスぺプシア治療薬の開発を目指した新規病態モデル動物の開発と薬効評価

研究課題名(英文) A rodent model of impaired gastric motility resulting from gastric low-grade inflammation induced by allyl isothiocyanate to evaluate therapeutic agents for functional dyspepsia

研究代表者

田嶋 公人(Tashima, Kimihito)

城西国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：60406783

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)：機能性ディスぺプシア(FD)はストレスに起因する胃腸機能障害であり、この病因の1つに胃運動低下が知られている。我々は本研究課題により、ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネート(AITC)がラット胃粘膜バリアの崩壊作用およびラット胃粘膜血管透過性の亢進など炎症惹起作用を有することを見出した。さらに、FD症状を反映した病態モデル動物開発への第一歩としてAITC処置マウスは胃運動を減弱し、そのような異常は既存の胃腸運動改善薬およびFD治療薬により回復すること明らかにした。以上より、我々はAITCを用いヒトFD症状の1要因である胃運動減弱を示す病態モデル動物を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：The animal model of functional dyspepsia (FD) such as gastric motor dysfunction and chronic hypersensitivity has been reported, yet those models take a long time to be the onset of gastrointestinal dysfunction for the study of FD. We have shown the gastrointestinal pharmacological effects of allyl isothiocyanate (AITC), a pungent ingredient of wasabi and a TRPA1 channel activator. It was found that 1) AITC impairs tight junction barrier in primary cultures of rat stomachs (Capsaicin-sensitive neural afferentation and the gastrointestinal tract: from bench to bedside 2014, DOI: 10.5772/57289), and 2) no gastric damage by AITC was observed in ex-vivo rat stomachs (Gastroenterology, 138 (5), S-721, 2010). Therefore, this study is to establish a rodent model of impaired gastric motility resulting from gastric low-grade inflammation by AITC, which is reliable produce to evaluate therapeutic agents of FD.

研究分野：薬理学

キーワード：アリルイソチオシアネート カプサイシン 機能性ディスぺプシア 胃粘膜微小炎症 実験動物 ワサビ受容体TRPA1 パニロイド受容体TRPV1 国際情報交換

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らは、2009 年に胃粘膜タイトジャンクションバリアを再現したラット胃主細胞の初代培養系確立に成功し<sup>(1)</sup>、本実験系を用い胃粘膜タイトジャンクションバリアはサイトカインにより崩壊し、慢性胃炎になることを見出した<sup>(2)</sup>。タイトジャンクションは、細胞間接着装置であり、胃では酸やペプシンなど傷害物質の粘膜下への浸潤を防ぐバリアを形成する。そのため、胃粘膜タイトジャンクションバリアの崩壊は、粘膜下炎症を誘起する因子となる。

(2) 胃粘膜血流は、傷害部から浸潤した酸を除去することで損傷増悪を防ぐもう一つの防御因子である。この調節に関わるバニロイド受容体 TRPV1 発現神経が機能不全に陥ると、肉眼的にも重篤な胃損傷が生じることを申請者らは示した<sup>(3,4)</sup>。

(3) 機能性ディスぺプシアは、内視鏡検査では異常はみられないが“胃痛”や“胃もたれ”など胃の不快感が長期にわたり現れる病気である。近年患者数が増加し、抗酸分泌薬などで治療が行われているが、病態の原因が十分解明されていないため、未だ対症療法で扱われている疾患である。

## 2. 研究の目的

当該研究は、機能性ディスぺプシア治療薬の開発を目指し、(1) ヒト機能性ディスぺプシア症状を反映した病態モデルラットを作製することを研究企画した。また、(2) その病態モデルラットを用いて、原因を解析し、機能性ディスぺプシア治療薬開発に向けた治療ターゲットを明らかにする。さらに、(3) ヒトで安全性が確認された消化器領域の既存薬の薬効評価を行い、新たな有用性を見出すことも最終目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) ラット胃粘膜初代培養細胞におけるタイトジャンクション (TJ) バリアーの評価

ラット胃粘膜細胞の単離および初代培養

ラット胃粘膜からの細胞単離と初代培養は、申請者らが確立した実験系を少し改良し<sup>(1)</sup>、細

胞モノレイヤーの電気抵抗値が 1000 cm<sup>2</sup> 未満のものは本実験系から除外した。

細胞モノレイヤーにおける TJ バリア測定  
胃粘膜初代培養細胞における TJ バリア機能は、細胞間隙マーカーである [<sup>3</sup>H]-マンニトール (MW : 182.17) の胃管腔側から漿膜側への透過量を測定することで評価した。その際、アリルイソチオシアネート (AITC) は細胞モノレイヤーの胃管腔側に 3 時間適用を行った。

(2) ラット胃粘膜血管透過性の亢進

動物は雄性 SD 系ラットを 18 時間絶食後に使用した。ラットはオメプラゾール前処置下、ウレタン麻酔投与後に胃を ex vivo チェンバーに装着した。血管透過性の亢進はポンタミンスカイプルー (200 mg/kg) をラット尾に静脈注射し、AITC (0.33 ~ 10 mM) の胃管腔内適用中の漏出量を測定した。

(3) 覚醒下マウス胃運動測定：呼吸テスト法

動物は、雄性 ddY 系マウスを一晩絶食後に使用した。胃排出能は、Uchida らと Matsumoto らの方法に従って測定した<sup>(5, 6)</sup>。薬物は AITC (1 ~ 100 mg/kg) を測定開始 (<sup>13</sup>C 標識酢酸投与) 30 分前に経口投与した。また、胃運動減弱モデル動物の作製には AITC 経口投与の濃度を 80 mg/kg とした。さらに、胃腸運動改善薬イトプリド (ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断作用とコリンエステラーゼ阻害作用: 30, 100 mg/kg)、モサプリド (セロトニン 5-HT<sub>4</sub> 受容体作動薬: 0.1 ~ 1 mg/kg)、ネオスチグミン (コリンエステラーゼ阻害薬: 30 μg/kg)、そして、機能性ディスぺプシア治療薬であるアコチアミド (30, 100 mg/kg) は測定開始 40 分前に皮下投与した。なお、AITC (80 mg/kg, p.o.) による肉眼的胃粘膜傷害の有無は、AITC 投与後 2 時間に胃粘膜を剖検した。

## 4. 研究成果

(1) アリルイソチオシアネート (AITC) によるラット胃粘膜タイトジャンクション (TJ) バ

## リアーへの作用

[<sup>3</sup>H]-マンニトール透過量における AITC の効果

[<sup>3</sup>H]-マンニトール透過量は、対照群において 1 時間あたり約 6.0 nmol/hr.cm<sup>2</sup> で推移し、適用後 3 時間の総透過量は 18.5±2.7 nmol/3 hr.cm<sup>2</sup> であった。AITC 低濃度 (10 μM) の適用も対照群と有意な差は認められなかった。しかし、AITC 高濃度 (100 μM) は、適用後 2 時間目以降から [<sup>3</sup>H] -マンニトール透過量の有意な増大が認められ、そのときの値は 39.7±6.9 nmol/hr.cm<sup>2</sup> であり、3 時間の総透過量は 92.6±11.5 nmol/3 hr.cm<sup>2</sup> に達した<sup>(7)</sup>。

胃粘膜細胞タイトジャンクション (TJ) タンパク質の局在に対する AITC の作用

AITC 高濃度 (100 μM) の適用は細胞間結合装置である TJ タンパク質の機能低下を引き起こすことが示唆されたため、TJ タンパク質の局在変化について検討した。対照群において、TJ タンパク質であるオクルディンおよび ZO-1 が細胞間結合部位周辺にそれぞれ連続的な発現として観察された。しかし、AITC 高濃度 (100 μM) 適用は、ZO-1 は明確な変化は認められないものの、オクルディンは細胞間結合部位での連続的な発現が崩壊している様子が観察された。

## (2) ラット胃粘膜におけるアリルイソチオシアネート (AITC) 適用による血管透過性の亢進および胃粘膜の変化

AITC による胃粘膜微小炎症を検討する目的で、ラット胃粘膜における AITC 誘起血管透過性の亢進を検討した。AITC (0.33 ~ 10 mM) の胃内適用は濃度依存的な血管透過性の亢進が観察され、10 mM AITC 適用により明らかな血管透過性の亢進が認められた<sup>(8)</sup>。なお、実験終了時における胃粘膜損傷は、対照群および 10 mM AITC 適用群、いずれも出血性損傷は観察されなかった。AITC 適用群では対照群と比較し胃粘膜が充血し、一部胃体部粘膜が腫脹している様子が観察された。

## (3) 覚醒下マウス胃運動に対するアリルイソチオ

## シアネート (AITC) およびその運動減弱に対する胃腸運動改善薬の効果

胃排出能に対する AITC の作用

対照群の呼気から排出される <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> は経時的に増加し、20.0 ± 1.5 分に最大値 (C<sub>max</sub>) 1272.3 ± 39.5% を示した後低下した。AITC の投与により <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 胃排出パターンは用量依存的に抑制した。C<sub>max</sub> は AITC 30 mg/kg 以上の用量において対照群と比べ明らかに低下し、AITC 最高用量の 100 mg/kg では C<sub>max</sub> が 692.0 ± 80.6% まで低下した。なお、AITC (100 mg/kg) の経口投与は、マウス胃粘膜において肉眼的な粘膜損傷を惹起しないことも観察した<sup>(9)</sup>。

AITC 誘起胃運動減弱マウスに対する胃腸運動改善薬イトブリド、モサブリド、ネオスチグミン、そして、機能性ディスペプシア治療薬アコチアミドの効果

AITC (80 mg/kg) 経口投与による胃排出能は、40.0 ± 9.4 分に最大値 (C<sub>max</sub>) 307.9 ± 33.9% を示し、AUC<sub>90 min</sub> は 20818.4 ± 1785.2% · min であり対照群と比べ明らかに低下していた。そのため、胃腸運動改善薬イトブリドおよびモサブリドの薬効評価は、AITC (80 mg/kg, po) による胃運動減弱に対する回復効果で検討した。ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬イトブリド (30, 100 mg/kg) は、AITC 誘起胃運動減弱に対し用量依存的かつ明らかに胃排出能を亢進し、100 mg/kg のイトブリド投与では対照群とほぼ同程度にまで胃排出能を回復させた。また、セロトニン 5-HT<sub>4</sub> 受容体刺激薬モサブリド (0.1 ~ 1 mg/kg) も、同様に用量依存的な胃排出能の回復が観察された。ネオスチグミン、および、アコチアミド投与でも胃運動の明らかな回復が観察された。

## <引用文献>

Tashima K., Zhang S., Ragasa R., Nakamura E., Seo J., Muvaffak A.,

Hagen S.: Am. J. Physiol., 296, 2009、  
G319-329  
Hagen, S.J., Yang, D.X., Tashima, K., Taylor,  
N.S., Fox, J.G.: Lab. Invest., 88, 2008、  
1227-1244  
Tashima K., Korolkiewicz R, Kubomi M,  
Takeuchi K.: Br. J. Pharmacol., 124, 1998、  
1395-1402  
Tashima K, Nakashima M, Kagawa S, Kato  
S, Takeuchi K.: Med. Sci. Monit., 8, 2002、  
BR157-163  
Uchida M, Endo N, Shimizu K.: J Pharmacol  
Sci., 98, 2005、388-395  
Matsumoto, K., Kimura, H., Tashima, K.,  
Uchida, M., Horie, S.: Biol. Pharm. Bull.,  
31(10), 2008、1917-1922  
Tashima K, Kabashima M, Matsumoto K,  
Yano S, Hagen SJ, Horie S.:  
Capsaicin-Sensitive Neural Afferentation  
and the Gastrointestinal Tract: from Bench to  
Bedside (ISBN 980-953-307-1143-7) 2014、  
pp77-99  
田嶋公人、松本健次郎、堀江俊治. *Ulcer  
Research*, 39, 2012、128-131  
田嶋公人、松本健次郎、堀江俊治. *Ulcer  
Research*, 41, 2014、32-35

#### 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 9 件)

Matsumoto K, Hosoya T, Ishikawa E,  
Tashima K, Amagase K, Kato S,  
Murayama T, Horie S. Distribution of  
transient receptor potential cation channel  
subfamily V member 1-expressing nerve  
fibers in mouse esophagus. *Histochem Cell  
Biol* 査読有、142(6), 2014、635-644.

DOI: 10.1007/s00418-014-1246-6

田嶋公人、松本健次郎、堀江俊治. ワサビ  
辛味成分アリルイソチオシアネートは覚醒

下マウスの胃運動を減弱させる:胃運  
動低下病態モデルマウスの作製.  
*Ulcer Research* 査読無、41, 2014、  
32-35.

Nomura R, Yanagihara M, Sato H,  
Matsumoto K, Tashima K, Horie S,  
Chen S, Fujino H, Ueno K, Murayama  
T. Bee venom phospholipase  
A2-induced phasic contractions in  
mouse rectum: Independent roles of  
eicosanoid and gap junction proteins  
and their loss in experimental colitis.  
*Eur J Pharmacol.* 査読有、713 (1-3),  
2013、314-322

DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.08.015.

Matsumoto K, Nakajima T, Sakai H,  
Kato S, Sagara A, Arakawa K,  
Tashima K, Narita M, Horie S.  
Increased Expression of 5-HT<sub>3</sub> and NK  
<sub>1</sub> Receptors in 5-Fluorouracil-Induced  
Mucositis in Mouse Jejunum. *Dig  
Dis Sci.*、査読有、58 (12) 、2013、  
3440-3450

DOI. 10.1007/s10620-013-2709-7

田嶋公人、松本健次郎、堀江俊治.  
麻酔下ラットにおけるワサビ辛味成分  
アリルイソチオシアネートの胃粘膜血  
管透過性の亢進-TRPA1 の関与-  
*Ulcer Research*、査読無、40、2013、  
13-16

Raimura M, Tashima K, Matsumoto  
K, Tobe S, Chino A, Namiki T,  
Terasawa K, Horie S. Neuronal nitric  
oxide synthase-derived nitric oxide is  
involved in gastric mucosal hyperemic  
response to capsaicin in rats.  
*Pharmacology*、査読有、92、2013、  
60-70

DOI: 10.1159/000351853.

Okumi H, Tashima K, Matsumoto K,

Namiki T, Terasawa K, Horie S. Dietary agonists of TRPV1 inhibit gastric acid secretion in mice. *Planta Medica*, 査読有, 78, 2012, 1801-1806

田嶋公人, 松本健次郎, 堀江俊治. 麻酔下ラットにおけるワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートの胃粘膜傷害性: 粘膜血流と血管透過性亢進の関与 *Ulcer Research* 査読無, 39(2), 2012, 128-131

Matsumoto K, Lo MW, Hosoya T, Tashima K, Takayama H, Murayama T, Horie S. Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice. *Lab Invest*, 査読有, 92 (5), 2012, 769-782

〔学会発表〕(計 15 件)

渡邊裕斗, 田嶋公人, 高野翔太, 堀江俊治 麻酔下ラットにおけるワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートによる胃粘膜炎症の惹起 TRPA1チャンネルの関与 日本薬学会第 135 年会 (神戸サンポーホール, 2015.3.28)

田嶋公人, 橋本和樹, 今井 拓, 松本健次郎, 堀江俊治 ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートを用いた薬効評価可能な胃運動減弱モデルマウスの確立 機能性ディスペプシア病態モデル動物の開発に向けて 第8回機能性ディスペプシア研究会 (東京・神保町、学術総合センター、2014.11.6)

堀江俊治, 松本健次郎, 田嶋公人 胃粘膜上皮バリア機能調節におけるワサビ受容体 TRPA1 の役割 第 42 回日本潰瘍学会 (慶應大学薬学部, 2014.10.31)

橋本和樹, 田嶋公人, 今井 拓, 松本健次郎, 堀江俊治 ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートを用いた薬効評価可能な胃

運動減弱モデルマウスの確立 生体機能と創薬シンポジウム 2014 (近畿大学薬学部, 2014.8.28)

今井 拓, 田嶋公人, 橋本和樹, 松本健次郎, 堀江俊治 ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートを用いた胃運動改善薬の作用 機能性ディスペプシア病態モデル動物の作製に向けて 第 130 回日本薬理学会関東部会 (星薬科大学, 2014.7.5)

田嶋公人, 松本健次郎, 堀江俊治 ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートは覚醒下マウスの胃運動を減弱させる: 胃運動低下病態モデルマウスの作製 第 41 回日本潰瘍学会 (大阪, 2013.12)

田嶋公人, 高野翔太, 竹内哲也, 大曾根健矢, 松本健次郎, 堀江俊治 ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートによるラット胃粘膜炎症の惹起 機能性ディスペプシア病態モデル動物の開発に向けて 第 7 回機能性ディスペプシア研究会 (出雲, 2013.11)

高野翔太, 田嶋公人, 竹内徹也, 大曾根健矢, 松本健次郎, 堀江俊治 アリルイソチオシアネートによる胃粘膜炎症の惹起 TRPA1 チャンネルの関与 第 128 回日本薬理学会関東部会 (早稲田大学国際会議場, 2013.7.14)

Tashima K, Hashimoto K, Kamoshita T, Takagaki A, Matsumoto K, Horie S. Activation of Luminal Chemosensor TRPV1 by Capsaicin Increases Gastric Motility in Conscious Mice Measured by <sup>13</sup>C-Acetic Acid Breath Test. *Digestive Disease Week 2013* (May 21, 2013, Orlando, USA)

Okumi H, Tashima K, Matsumoto K,

Horie S. Japanese 'Kampo' Formula Daikenchuto, in Comparison With Its Similar Formula Ninjinto, Inhibits Gastric Acid Secretion Through Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor Type 1 (TRPV1) Channels in Conscious Mice. Digestive Disease Week 2013 (May 20, 2013, Orlando, USA)

Tashima K, Ishikawa E, Seki Y, Nagai M, Matsumoto K, Horie S. Contractile Effect of TRPA1 Activation with Allyl-Isothiocyanate in Isolated Mouse Distal Colon: Role of the Tachykinin Receptors NK<sub>1</sub> / NK<sub>2</sub> and 5-HT Receptors. Digestive Disease Week 2013 (May 18, 2013, Orlando, USA)

Tashima K, Matsumoto K, Horie S. Activation of TRPA1 by allyl isothiocyanate increases gastric mucosal blood flow through TRPV1-expressing and non-expressing sensory nerves in rats. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/organoprotection -Focus on GI tract- (September 10, 2012, Sheraton Princess Kaiulani Hotel, Honolulu, Hawaii)

竹内徹也、田嶋公人、松本健次郎、堀江俊治 麻酔下ラットにおけるワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートによる胃粘膜血管透過性の亢進 -TRPA1 の関与- 第40回日本潰瘍学会 (京王プラザホテル, 2012.7.14)

Tashima K, Matsumoto K, Horie S. Effect of allyl isothiocyanate, a dietary activator of TRPA1 channel, on gastric mucosal blood flow and ulcerogenesis in rats. The 14th International Conference on Ulcer Research (July 12, 2012, Tokyo, Japan)

〔図書〕(計 3 件)

堀江俊治、松本健次郎、田嶋公人：  
トピック、展望(4)「FDの分子機構：末梢性内臓知覚過敏と温度感受性 TRPV1 チャンネル」機能性ディスプレイ 日本人に適した診療を求めて(荒川哲男監修、富永和作編集) (フジメディカル出版) 2014.11

Tashima K, Kabashima M, Matsumoto K, Yano S, Hagen SJ, Horie S. Allyl isothiocyanate, a pungent ingredient of wasabi and mustard oil, impairs gastric paracellular barrier in primary cultures from the rat stomach via TRPA1-independent pathway Intech (ISBN 980-953-307-1143-7) 査読有、2014、pp77-99

DOI: org/10.5772/58603

Horie S, Raimura M, Matsumoto K, Namiki T, Terasawa K, Tashima K. Cooperative effects of neuronal nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase on gastric hyperemic response to intragastric capsaicin Intech (ISBN 980-953-307-1143-7) 査読有、2014、pp103-123

DOI: org/10.5772/58557

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田嶋 公人 (TASHIMA, Kimihito)  
城西国際大学薬学部・准教授  
研究者番号：60406783

### (4) 研究協力者

來村 昌紀 (RAIMURA, Masaki)  
奥見 裕邦 (OKUMI, Hirokuni)  
成 暎実 (SON, Yonshiru)  
竹内 哲也 (TAKEUCHI, Tetuya)  
高野 翔太 (TAKANO, Shota)  
橋本 和樹 (HASHIMOTO, Kazuki)  
今井 拓 (IMAI, Taku)