

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460928

研究課題名(和文)好酸球性食道炎の病態に及ぼす胃酸の影響についての研究

研究課題名(英文)Effect of gastric acid on the eosinophilic esophagitis

研究代表者

木下 芳一 (Kinoshita, Yoshikazu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30243306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性食道炎(EoE)は食物アレルギーに起因する疾患であるが、その病変は食道の下部を中心に発症し、胃酸が発症に関与している可能性がある。本研究ではEoEの発症における胃酸の関与を検討した。マウスモデルにおいてもラットモデルにおいてもEoEモデルに胃酸逆流モデルを同時に作製するとEoEが増悪することが明らかとなった。人においてもEoE患者にプロトンポンプ阻害薬(PPI)を投薬すると50%以上の例で炎症が消失し、さらにPPI抵抗例に胃酸分泌抑制力がより強力なボノプラザンを投薬すると半数以上の例で炎症が消失した。これらの結果より胃酸がEoEの発症に関与すると結論づけられた。

研究成果の概要(英文)：Eosinophilic esophagitis (EoE) is an allergic disease possibly caused by food allergens. However, gastric acid may be an additional cause, since the mucosal disease activity is usually severer in the distal esophagus. In this study, we have investigated the role of gastric acid in the development of EoE. Not only in mouse but also in rat models, induced esophageal gastric acid reflux was found to cause severer esophageal mucosal inflammation in EoE model animals. In human, over 50% of cases with EoE respond to the acid suppression therapy with proton pump inhibitor (PPI). Furthermore, over 50% of PPI-resistant cases with EoE again respond to more potent acid suppression with the administration of vonoprazane. These studies strongly suggest that gastric acid has an important role for the development of EoE.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：食道炎 好酸球性食道炎 胃酸 アレルギー プロトンポンプ阻害薬 好酸球

## 1. 研究開始当初の背景

細菌感染症の減少により、幼児期に細菌感染によって誘導される Th1 系の免疫の活性化を受けず Th2 dominant な免疫バランス状態で成人となる個体が増加し、アレルギー疾患が増加する懸念が生じていた。実際、喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症等の有病率が日本のみならず欧米でも著増していることが報告されていた。消化器系のアレルギー性疾患として、従来から日本では好酸球性胃腸炎が知られていた。これに加えて、食物摂取後に顔面の浮腫や呼吸困難等のアナフィラキシーを引き起こす食物アレルギーの例が増加していることが注目され始めている。さらに欧米を中心に食道粘膜扁平上皮内に多数の好酸球の浸潤を認め、好酸球を中心とする慢性炎症のために食道壁の痙攣性収縮や線維化による狭窄をおこし、胸痛、胸やけ、嚥下障害を生じる遅延型のアレルギー疾患の一つである好酸球性食道炎が存在すること、また、その有病率が増加していることが報告されていた。私達は多施設共同の前向き調査を行い、日本においても好酸球性食道炎が増加していること、また、その頻度が 5000 件の上部消化管内視鏡検査あたり 1 件であることを明らかにして報告してきた (J. Gastroenterol 2011)。また、私たちの最近の調査では日本において好酸球性食道炎の有病率がさらに増加してきたことが明らかとなっている (World J Gastroenterology 2015)。そこで私たちは、好酸球性食道炎の全国調査を行って診療の実態の調査を行うとともに、その発症に Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、eotaxin-3、IL-5、-13、-15 等の Th2 系の免疫反応が関わっていることを食道粘膜組織の mRNA のマイクロアレイ解析と血中サイトカイン類の測定を行って確認してきた (J. Gastroenterol 2012, Digestion 2012)。さらに、好酸球性食道炎例は、年齢、性別をマッチさせたコントロー

ルに比べて、ヘリコバクタ・ピロリ感染者が少なく、Th1 への免疫のシフトがおこっていない例が多いこと、また、好酸球性食道炎の発症には IgE の関与は大きくないことも明らかにしてきた。

好酸球性食道炎の標準的な治療は、局所作用型のグルココルチコイドを経口的に投与することで行われている。ところが、高用量の PPI を用いて胃酸分泌を抑制すると、好酸球性食道炎例の一部において症状が消失するとともに食道粘膜への好酸球浸潤が消失し、炎症も消退する例が存在することが報告されるようになってきた。PPI 投与に伴って好酸球性食道炎の病態が改善する原因としては PPI の直接作用と、PPI による胃酸分泌抑制作用を介した間接作用の両方の可能性を考えることができる。好酸球の生存期間は酸性条件下で延長するとの報告の存在や、食道内で胃酸と接しやすい下部食道で食道上皮内の好酸球浸潤が著明で炎症が強いことを考慮すると、胃酸の存在が食物アレルギーに対する免疫反応である好酸球性食道炎の成立に重要な役割を有する可能性が考えられる。実際我々は逆流性食道炎を有しない健常者においても、生理的に食道下端には胃酸の逆流が高頻度におこっていること、この逆流が一過性下部食道括約筋弛緩に伴っておこるのではなく、常に微小逆流がおこり食道下端部粘膜は常に酸に曝露されていることを見い出している (J. Gastroenterol 2012)。このため Th2 系のアレルギー反応と胃酸の関与を検討することは重要であり、この研究を通じて好酸球性食道炎の病態を明らかにすることができるかと期待された。

## 2. 研究の目的

胃酸の食道内逆流が好酸球性食道炎の発症に増悪因子として関わっている可能性を明きらかとすることを本研究の目的とした。この目的のために実験動物を用いた系、培養

細胞を用いた系、人を対象とした検討を行い、それらを総合して判断し、胃酸の好酸球性食道炎への関与を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 好酸球性食道炎モデルラットの成立に及ぼす胃酸食道内逆流の影響

生後 6-8 週齢の Wister 系雄性ラットを以下の 4 群に分ける。

コントロール：好酸球性食道炎(-)、慢性逆流性食道炎(-)

好酸球性食道炎のみ

慢性逆流性食道炎のみ

慢性逆流性食道炎 + 好酸球性食道炎

それぞれのモデルラットの作成方法を次に示す。

##### 好酸球性食道炎モデルラットの作成

生後 6-8 週齢の Wister 系雄性ラットに、卵白アルブミン(OVA)+水酸化アルミニウムゲルを 1 週毎に 2 回腹腔内投与する。続いて、その 1 週間後にチャンバーの中に入れたラットにネブライザーで 2%OVA 溶液を 30 分間暴露させ、24 時間後に解剖を行う。

##### 慢性逆流性食道炎モデルラットの作成

Wister 系雄性ラットの前胃結紮とネラトンカテーテルによる十二指腸の狭窄形成により、胃酸分泌亢進、逆流を誘導し逆流性食道炎モデルを作成する。

作成後に 4 群それぞれの食道組織を摘出し、好酸球浸潤また各種炎症細胞の程度を HE 染色、免疫染色で評価する。また、食道粘膜組織から mRNA を抽出し、Real-Time PCR 法で IL-5、IL-13、TSLP などの Th2 系サイトカインの測定を行う。さらに蛋白を抽出し同サイトカインを ELISA 法で評価する。

続いて胃酸分泌抑制効果の検討を行うために、上記 4 群においてプロトンポンプ阻害剤(ラベプラゾール)を連日経口投与し、同様の検討を行った。

#### (2) 好酸球性食道炎モデルマウスの成立に及ぼす胃酸食道内逆流の影響

上記のラットモデル作成とほぼ同じ検討を実験動物をマウスに変えて行った。マウスは多くのサイトカインの測定系が開発されているために免疫系の変化を検討しやすい。一方、動物が小型であるため逆流手術操作が困難で胃酸逆流手術後の胃酸逆流の程度にばらつきが起こりやすいことが欠点であった。好酸球性食道炎作成のためにはラットと異なって卵白アルブミンとピーナツ抽出液を刺激抗原として用いた。

#### (3) 食道扁平上皮細胞における酸暴露の影響

ヒト食道扁平上皮細胞株 Het-1A に対して酸・胆汁酸刺激を行い Th2 系サイトカインの発現を mRNA レベル及び蛋白レベルで解析した。

#### (4) 好酸球性食道炎患者を対象とした検討

好酸球性食道炎患者を対象としてプロトンポンプ阻害薬の標準用量を 2 か月間投薬した。その後、自覚症状の変化とともに内視鏡検査と食道粘膜の生検を行って好酸球性食道炎がプロトンポンプ阻害薬で酸分泌を抑制することでどの程度軽快するかの検討を行った。さらにプロトンポンプ阻害薬が有効でなかった例に対しては、より胃酸分泌抑制力が強いボノプラザンの標準用量の投薬を 2 か月間行い同様に治療効果の判定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 好酸球性食道炎モデルラットの成立に及ぼす胃酸逆流の影響

逆流性食道炎モデルでは、コントロールと比較してマクロ像において中部食道から下部食道粘膜にかけてびらん、小潰瘍の形成を認め、ミクロ像では著明な粘膜上皮の肥厚、粘膜固有層乳頭の延長、基底細胞層の過形成

を認めた。一方、好酸球性食道炎モデルにおいては、粘膜固有層を中心にエオジン親和性の好酸球を認め、基底膜側から粘膜上皮に浸潤する像が観察された。また、各種サイトカインの動態は、逆流性食道炎モデルにおいてIL-1などの炎症性サイトカインの著明な上昇、また好酸球性食道炎モデルにおいては、IL-13、IL-5、TSLPなどのTh2系サイトカインの発現亢進を認めた。さらに興味深い事に、逆流性食道炎のみのモデルにおいてもTh2系サイトカインの軽度上昇が観察された。また、逆流性食道炎を形成した後に好酸球性食道炎を誘導した群においては、好酸球性食道炎のみの群と比較して、好酸球、炎症細胞の浸潤が高度であり、Th2系サイトカインの発現亢進を認めた。一方、逆流性食道炎+好酸球性食道炎にプロトンポンプ阻害剤を投与した群においては胃酸分泌抑制作用により逆流性食道炎の形成は軽度であり、さらに好酸球の浸潤も抑制されていた。また、好酸球性食道炎のみの群においてもプロトンポンプ阻害剤の投与は好酸球の浸潤を軽度抑制する傾向を認めた。これらの結果から胃酸分泌が好酸球性食道炎の病態形成に関与し、胃酸分泌抑制療法は好酸球性食道炎の治療に効果的である可能性が示唆された。

## **(2) 好酸球性食道炎モデルマウスの成立に及ぼす胃酸食道内逆流の影響**

ラットモデルと比較したデータのばらつきが大きく、マウスに胃食道逆流モデルを作成することの困難さが明らかとなった。一方、卵白アルブミンとピーナツ抽出液を用いた好酸球性食道炎のモデルでは食道の粘膜固有層には多数の好酸球の浸潤を見たが、上皮層内への好酸球の浸潤はわずかであった。胃酸逆流を誘発することで好酸球の浸潤数は増加する傾向がみられ、IL-5, 13などのサイトカインの発現量も増加する傾向にあったが、個体間のばらつきが大きいため、統計学

的な優位さには達しない部分も多くみられた。

## **(3) 食道扁平上皮細胞における酸暴露の影響**

ヒト食道扁平上皮細胞株 Het-1A に対して酸・胆汁酸(DCA, CA)暴露を行った所、TNF $\alpha$ 、IL-1などの炎症性サイトカインの発現亢進と、軽度ではあるがIL-13、IL-33などのTh2系サイトカインの上昇を認めた。

## **(4) 好酸球性食道炎患者を対象とした検討**

嚥下障害を中心とした症状を有し食道粘膜に生検診断で上皮内の好酸球浸潤が400倍の高倍率視野1視野当たり15個以上の食道好酸球浸潤を有する患者50例を検討の対象とした。この50例を対象としてエソメプラゾール20mgの1日1回投薬を最低2か月間行った。その後本胃酸分泌抑制療法に対する反応性を症状、内視鏡像、食道上皮層内の好酸球浸潤数をメルクマールとして判定した。その結果、胃酸分泌をプロトンポンプ阻害薬を用いて抑制することで全症例の60%の例で胃酸分泌抑制療法後に緩解が得られることが明らかとなった。プロトンポンプ阻害薬に反応しなかった例に対してネキシウムよりも胃酸分泌抑制作用が強力であることがすでに多くの研究から明らかとなっているポノプラザン20mgの投薬をさらに最低2か月行ったところ、プロトンポンプ阻害薬抵抗性であった例の70%の例が緩解となることが明らかとなった。この成績は強力に胃酸分泌抑制を行えば、強力に行うほど好酸球性食道炎の緩解率が高いことを示しており、人においても好酸球性食道炎の発症に胃酸の存在が重要であることが明らかとなったものと考えられた。

## 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 15件)

Ishihara S, Kinoshita Y, Schoepfer A. Eosinophilic, eosinophilic gastroenteritis and eosinophilic colitis: common mechanisms and differences between Japan and Switzerland. *Inflammatory Intestinal Diseases* in press. (査読有)

Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y. Sustained acid suppression by potassium-competitive acid blocker(P-CAB) may be an attractive treatment candidate for patients with eosinophilic esophagitis. *Am J gastroenterol* in press. (査読有)

Jiao D, Ishimura N, Maruyama R, Ishikawa N, Nagase M, Oshima N, Aimi M, Okimoto E, Mikami H, Izumi D, Okada M, Ishihara S, Kinoshita Y. Similarities and differences among eosinophilic esophagitis, proton-pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia, and reflux esophagitis: comparisons of clinical, endoscopic, and histopathological findings in Japanese patients. *J. Gastroenterol.* in press. (査読有)

Kinoshita Y, Ishimura N, Oshima N, Mikami H, Okimoto E, Jiao DJ, Ishihara S. Recent progress in research of eosinophilic esophagitis and gastroenteritis: review. *Digestion* 93: 7-12, 2016. (査読有)  
DOI: 10.1159/000441668

Adachi K, Mishiro T, Tanaka S, Kinoshita Y. Suitable biopsy site for detection of esophageal eosinophilia in eosinophilic esophagitis suspected cases. *Digestive Endoscopy* 28: 139-144, 2016. (査読有)  
DOI: 10.1111/den.12555

Noothalapati H, Uemura S, Oshima N, Kinoshita Y, Ando M, Hamaguchi H, Yamamoto T. Towards the development of non-biopic diagnostic technique for eosinophilic esophagitis using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 85: 7-10, 2016. (査読有)  
DOI:10.1016/j.vibspec

Ishimura N, Shimura S, Jiao DJ, Mikami H, Okimoto E, Uno G, Aimi M, Oshima N, Ishihara S, Kinoshita Y. Clinical features of eosinophilic esophagitis: Differences between Asian and Western populations. *J. Gastroenterol Hepatol.* 30(Suppl. 1): 71-77, 2015. (査読有)  
DOI: 10.1111/jgh.12746

Matsushita T, Maruyama R, Ishikawa N,

Harada Y, Araki A, Chen D, Tauchi-Nishi P, Yuki T, Kinoshita Y. The number and distribution of eosinophils in the adult human gastrointestinal tract: a study and comparison of racial and environmental factors. *Am J. Surg Pathol.* 39: 521-527, 2015. (査読有)

DOI: 10.1097/PAS.0000000000000370

Ishimura N, Owada Y, Aimi M, Oshima T, Kawada T, Inoue K, Mikami H, Takeuchi T, Miwa H, Higuchi K, Kinoshita Y. No increase in gastric acid secretion in healthy Japanese over past two decades. *J. Gastroenterol.* 50: 844-852, 2015. (査読有)

DOI: 10.1007/s00535-014-1027-y

Shoda T, Morita H, Nomura I, Ishimura N, Ishihara S, Matsuda A, Matsumoto K, Kinoshita Y. Comparison of gene expression profiles in eosinophilic esophagitis (EoE) between Japan and Western countries. *Allergology International* 64: 260-265, 2015. (査読有)

DOI: 10.1016/j.alit.2015.03.002

Kinoshita Y, Ishimura N, Oshima N, Ishihara S. Systematic review: Eosinophilic esophagitis in Asian countries. *World J Gastroenterology.* 21: 8433-8440, 2015. (査読有)

DOI: 10.3748/wjg.v21.i27.8433

Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y. Gastroesophageal acid reflux mainly occurs on right side of esophagus. *Gastrointest Endoscopy.* 79: 180-181, 2014. (査読有)

DOI: 10.1016/j.gie.2013.08.004

Shimura S, Ishimura N, Tanimura T, Yuki T, Miyake T, Kushiya Y, Sato S, Fujishiro H, Ishihara S, Komatsu T, Kaneto E, Izumi A, Ishikawa N, Maruyama R, Kinoshita Y. Reliability of symptoms and endoscopic findings for diagnosis of esophageal eosinophilia in a Japanese population. *Digestion.* 90(1): 49-57, 2014. (査読有)

DOI: 10.1159/000365209

Furuta K, Adachi K, Aimi M, Ishimura N, Sato S, Ishihara S, Kinoshita Y. Case-control study of gastrointestinal disorders with *Helicobacter pylori* infection in Japan. *J.Clin Biochem Nutrition* 53: 60-62, 2013. (査読有)

DOI: 10.3164/jcbrn.13-15

Ishimura N, Furuta K, Sato S, Ishihara S, Kinoshita Y. Limited role of allergy testing in patients with eosinophilic gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol Hepatol.* 28: 1306-1313, 2013. (査読有)

DOI: 10.1111/jgh.12197.

〔学会発表〕(計 4 件)

泉 大輔、石村典久、三上博信、相見正史、木下芳一：好酸球性食道炎の内視鏡所見に関する正診率および検者間診断一致率の検討．第 90 回日本消化器内視鏡学会総会，2015.10.09，グランドプリンスホテル新高輪：東京．

石村典久、相見正史、木下芳一：好酸球性食道炎における内視鏡検査の意義 - 当院で経験した 44 例の解析．第 89 回日本消化器内視鏡学会総会，2015.05.31，名古屋国際会議場：名古屋．

大嶋直樹、石村典久、木下芳一：好酸球を可視化する～ラマン分光法を用いた好酸球性食道炎の診断～．第 89 回日本消化器内視鏡学会総会，2015.05.29，名古屋国際会議場：名古屋．

Kinoshita Y: Clinical Characteristics and Diagnosis of Eosinophilic in Asia. The 5th Asian Postgraduate Course on Neurogastroenterology & motility, 2014.04.05, Seoul, Korea. (招聘口演)

〔図書〕(計 5 件)

木下芳一、石村典久：南江堂，臨床食道学：好酸球性食道炎，2015，345 (pp118-123)．

木下芳一：日本気管食道科学会，好酸球性食道炎・胃腸炎の診断と治療：第 24 回気管食道科専門医大会テキスト(友田幸一編)，2014，58 (pp20-23)．

木下芳一：南江堂，序文：好酸球性消化管疾患診療ガイド(木下芳一編)，2014，103 (pp )．

木下芳一：南江堂，好酸球性消化管障害：消化器疾患最新の治療 2013-2014(菅野健太郎、上西紀夫、井廻道夫編)，2013，482 (pp270-272)．

木下芳一：西村書店，好酸球性胃腸炎：カラー版消化器病学 基礎と臨床(浅香正博、菅野健太郎、千葉勉編)，2013，1541 (pp672-674)．

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

木下 芳一 (KINOSHITA Yosikazu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30243306

### (2)研究分担者

大嶋 直樹 (OSHIMA Naoki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10403461