

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460287

研究課題名(和文) LPS, 炎症性サイトカインと末梢CRF受容体サブタイプの消化管機能における相関

研究課題名(英文) Roles of LPS, cytokine and peripheral CRF receptors on gastrointestinal function

研究代表者

野津 司 (Nozu, Tsukasa)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30312367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Corticotropin-releasing factor (CRF) はCRF1, CRF2の2種類の受容体を介して作用を發揮する。我々はストレスによって起きる大腸胃運動促進, 内臓知覚過敏はCRF1を介する反応であり, CRF2はCRF1によるこれらの反応を抑制し, CRF1, CRF2シグナルのバランスにより, これら消化管の機能変化を既定することを示し, CRFシグナルのバランス説として発表した。また動物IBSモデルで認められる内臓知覚過敏は, LPS-サイトカイン系を介する反応であり, CRFは免疫反応を制御することで, 作用を發揮していること, またこの反応でもバランス説が成立することを報告した。

研究成果の概要(英文)：Corticotropin-releasing factor (CRF) exerts the action via CRF receptor subtype 1 (CRF1) and subtype 2 (CRF2). We demonstrated that enhanced colonic contractility and visceral hypersensitivity induced by stress were CRF1-triggered responses, and CRF2 suppressed these ones. Moreover, the signal balance of CRF1 and CRF2 may determined these colonic functional changes. Therefore, we advocated the balance theory of CRF signaling. Incidentally, we also showed that visceral hypersensitivity induced by stress was mediated via LPS-cytokine system, and CRF also regulated the immune system to contribute to this altered visceral sensation. Moreover, this response followed the balance theory of CRF signaling.

研究分野：消化管機能

キーワード：内臓知覚 消化管運動 ストレス CRF 過敏性腸症候群

### 1. 研究開始当初の背景

過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) や機能性胃腸症 (functional dyspepsia: FD) は、消化管の機能異常に起因すると思われる慢性の消化器症状をきたす疾患であり、functional gastrointestinal disorders (FGIDs) と総称される。本症ではストレスや精神的な要因が症状の増悪に深く関連しており、ストレスに対する生体反応の key mediator である CRF が病態に重要な役割を果たしていると考えられている。我々はこれまで、主としてストレスと消化管機能異常についての研究を進めてきた。ストレスによって生じる胃排出の抑制、大腸運動の促進は内因性 CRF を介する反応であることを明らかにし、また関与する CRF サブタイプ受容体が上部では CRF2、下部消化管では CRF1 と異なることも報告した。また IBS 患者はストレスによって誘導される直腸知覚過敏が疾患に特異的な反応であり、この反応には CRF が関与している可能性を報告した。さらに我々は最近ラットで CRF の末梢投与は胃排出を抑制するにもかかわらず、CRF1 の刺激は胃収縮を促進し CRF2 の刺激は CRF1 によって刺激された胃収縮を抑制することを世界で初めて報告した。この結果よりストレス負荷時には両方の CRF サブタイプ受容体が同時に活性化され、その作用は CRF1/2 が interaction し、その信号強度のバランスにより決定されるという仮説 (CRF サブタイプ受容体 signaling balance theory) を提唱するに至った。

FGIDs の病態として最近特に注目されているのが、慢性炎症である。消化管感染後に、IBS あるいは FD の発症頻度が多いことは古くから知られており、また IBS 患者では血中の lipopolysaccharide (LPS)、炎症性サイトカインレベルが増加しており、さらに、LPS の単核球刺激に伴うサイトカイン産生反応が IBS の症状重症度と相関すると言った報告がなされるようになった。これらの報告は、LPS-サイトカイン経路が IBS の病態に深く関与していることを示している。しかし、これら免疫反応が FGIDs で認められる消化管運動や内臓感覚の変化にどのように関与しているかは知られていない。一方 CRF は免疫反応を制御することも知られているが、抗炎症、あるいは炎症惹起作用を発揮するという相反する報告があり、作用の詳細は明らかではない。

### 2. 研究の目的

LPS、炎症性サイトカインが消化管機能 (運動、感覚) に与える影響と末梢 CRF サブタイプ受容体の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

大腸収縮は、無麻酔・無拘束ラットにおいて、マノメトリー法で測定した。内臓感覚は、ラットで経肛門的に伸展バルーンを大腸に挿入し、伸展時の痛みに伴う腹筋収縮を筋電図

で測定することにより行った。腸管透過性は、ラットで麻酔下に腹部切開を行い、回盲部と4cm程肛門側の大腸2カ所を結紮し、この腸管ループに1.5%エバンスブルー1mlを注入する。15分後に大腸を取り出し、組織に取り込まれた色素を抽出して、その量を分光光度計で測定した。

### 4. 研究成果

(1) CRF、ストレスによって誘導される大腸収縮促進と内臓知覚過敏は、CRF1 依存性の反応であり、CRF2 シグナルはこの反応を抑制した (CRF2 の刺激は、それだけでは機能変化を起こさないが、CRF2 を遮断すると CRF によるこれらの変化を増強した。また CRF2 の刺激は CRF によるこれらの変化を抑制した)。これらにより大腸運動、感覚機能変化に対しても CRF signaling balance theory が成立することを示した。

(2) LPS を投与すると内臓知覚過敏が誘導され、この反応は IL-1 あるいは IL-6 拮抗薬で阻止された。また CRF 受容体拮抗薬でも反応は阻止され、さらにこれは CRF1 依存性であり、CRF2 は反応を抑制するという、balance theory が成立することが明らかとなった。IL-1 投与でも内臓知覚過敏は誘導されたが、この反応は CRF 受容体拮抗薬では阻止されなかった。これらの結果は LPS による内臓知覚過敏は内因性の CRF を介し、CRF はサイトカイン産生を制御することによりこの反応を調整していることを示唆している。

(3) water avoidance stress (WAS) は精神ストレスの古典的なモデルであるが、これを1時間/日で3日間負荷すると、内臓知覚過敏と大腸透過性亢進が誘導された。これらの反応は、サイトカイン、CRF、肥満細胞を介することを明らかにした。

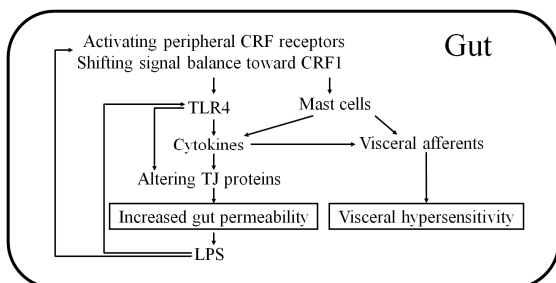
(4) GLP-1analogue のリラグルチドは、LPS あるいは WAS による内臓知覚過敏、大腸透過性亢進を阻止することを示した。一方 IL-1 によるこれらの変化は変化させなかったため、サイトカイン産生を抑制することにより、これらの効果を発揮していることが示唆された。

(5) ロバスタチンも(4)と同様の効果を示すことを明らかとした。

(6) メトフォルミンも同様の効果を示した。

これらの結果は、LPS-サイトカイン系が、IBS の最も直接的な病態だと考えられている内臓知覚過敏に対して、その変化を引き起こす原因となっており、これはこれまでの臨床報告 (IBS では血中 LPS、サイトカインレベルが高い) を裏付ける知見である。また IBS の key molecule と考えられている CRF は、これ

らの免疫反応を制御することで内臓知覚に作用していることを示し、CRF の IBS におけるさらなる重要性と理解を深める結果と考える。また精神ストレスによる内臓知覚過敏（一般的な IBS 患者での症状増悪をシミュレートする動物モデル）に対しても、サイトカインが関与することから、精神ストレスによってサイトカインシグナルが活性化し、LPS 投与と同様な機序で内臓知覚過敏が起きることが明らかとなった。サイトカインシグナルを抑制するリラグチド、ロバスタチン、メトフォルミンが予想通りこれらの大腸機能変化を阻止することが示されたので、サイトカインシグナルの IBS での重要性がさらに明らかとなったと共に、これら薬剤が、IBS 治療薬として使用できる可能性を示唆した。また CRF balance theory がこれらの反応で成立したことより、IBS 治療には CRF1 拮抗薬と共に CRF2 刺激薬が有効である可能性も指摘できた。



上記図に、今回の結果から推定された IBS の末梢メカニズムを示した。CRF シグナルは IBS で活性化しており<sup>1</sup>、シグナルバランスは CRF1 にシフトしている<sup>2</sup>。CRF は toll-like receptor 4 (TLR4)を活性化し、その結果 tight junction protein を変化させて腸管透過性を亢進する<sup>3</sup>。また TLR4 はサイトカイン産生を促進し、腸管透過性の亢進と内臓知覚過敏を誘導する<sup>4,5</sup>。一方 CRF は肥満細胞を活性化し、放出されるサイトカインを含むケミカルメディエーターもこれらの内臓機能変化を惹起する<sup>6</sup>。腸管透過性亢進は、免疫を活性化し、LPS を遊離させる。LPS は CRF シグナルを活性化させ（研究成果 2）、さらに TLR4-サイトカイン系を活性化させる。

#### <引用文献>

1. Taché Y, Kiank C, Stengel A. A role for corticotropin-releasing factor in functional gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11: 270-277.
2. Nozu T, Okumura T. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 interaction in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2015; 50: 819-830.
3. Yu Y, Liu ZQ, Liu XY, Yang L, Geng XR, Yang G, et al. Stress-Derived Corticotropin Releasing Factor Breaches Epithelial Endotoxin Tolerance. *PLoS One* 2013; 8: e65760.
4. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2

expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2011; 286: 31263-31271.

5. Obreja O, Rathee PK, Lips KS, Distler C, Kress M. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J* 2002; 16: 1497-1503.

6. Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ. CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF-alpha. *PLoS One* 2012; 7: e39935.

#### 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 11 件）

- ① Nozu T, Takakusaki K, Okumura T. A balance theory of peripheral corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 signaling to induce colonic contractions and visceral hyperalgesia in rats. *Endocrinology* 2014; 155: 4655-4664. 査読有.
- ② Nozu T, Okumura T. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 interaction in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2015; 50: 819-830. 査読有.
- ③ Okumura T, Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Miyagishi S, Ohhira M. Antinociceptive action against colonic distension by brain orexin in conscious rats. *Brain Res* 2015; 1598: 12-17. 査読有.
- ④ Okumura T, Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Miyagishi S, Ohhira M. Involvement of the dopaminergic system in the central orexin-induced antinociceptive action against colonic distension in conscious rats. *Neurosci Lett* 2015; 605: 34-38. 査読有.
- ⑤ Okumura T, Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Miyagishi S, Ohhira M. Adenosine A1 receptors mediate the intracisternal injection of orexin-induced antinociceptive action against colonic distension in conscious rats. *J Neurol Sci* 2016; 362: 106-110. 査読有.
- ⑥ Okumura T, Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Miyagishi S, Ohhira M. Levodopa acts centrally to induce an antinociceptive action against colonic distension through activation of D2 dopamine receptors and the orexinergic system in the brain in conscious rats. *J Pharmacol Sci* 2016; 130: 123-127. 査読有.
- ⑦ Nozu T, Miyagishi S, Kumei S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T. Lovastatin inhibits visceral allodynia and increased colonic permeability induced by lipopolysaccharide or repeated water avoidance stress in rats. *Eur J Pharmacol* 2017; 818: 228-234. 査読有.
- ⑧ Nozu T, Miyagishi S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T. Lipopolysaccharide induces visceral

hypersensitivity: role of interleukin-1, interleukin-6, and peripheral corticotropin-releasing factor in rats. J Gastroenterol 2017; 52: 72-80. 査読有.

⑨ Nozu T, Miyagishi S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T. Repeated water avoidance stress induces visceral hypersensitivity; role of IL-1, IL-6 and peripheral corticotropin-releasing factor. J Gastroenterol Hepatol 2017; 32: 1958-1965. 査読有.

⑩ Nozu T, Miyagishi S, Kumei S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T. Glucagon-like peptide-1 analog, liraglutide improves visceral sensation and gut permeability in rats. J Gastroenterol Hepatol 2018; 33: 232-239. 査読有.

⑪ Okumura T, Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Ohhira M. Ghrelin acts centrally to induce an antinociceptive action during colonic distension through the orexinergic, dopaminergic and opioid systems in conscious rats. Brain Res 2018; 1686: 48-54. 査読有.

[学会発表] (計 11 件)

① 野津 司, Peripheral corticotropin-releasing factor (CRF) induces stimulation of colonic contractions and visceral hyperalgesia in rats; role of CRF receptor type 1 and 2. International Session (Symposium) 4, Therapeutic strategy of IBS based on pathophysiology. Japanese Digestive Disease Week 2014 in Kobe, Oct 24.

② 野津 司, 消化管運動と内臓知覚における末梢 CRF 受容体サブタイプの役割—balance theory について. 第 17 回日本神経消化器病学会 2015 年 11 月 12 日沖縄.

③ 野津 司, リポポリサッカライドによって誘導される内臓知覚過敏—IL-1, IL-6 と末梢 CRF の役割. 第 18 回日本神経消化器病学会 2016 年 9 月 10 日札幌.

④ 野津 司, 腸管伸展によって誘導される急性, 遅発性の内臓知覚過敏—末梢 CRF と IL-1 の役割について. 第 18 回日本神経消化器病学会 2016 年 9 月 10 日札幌.

⑤ 野津 司, The role of peripheral CRF receptors on gastrointestinal contractions and visceral sensation. The balance theory of peripheral CRF signaling. 第 84 回消化器心身医学研究会 2016 年 9 月 9 日札幌.

⑥ 野津 司, Repeated water avoidance stress induces visceral hypersensitivity; role of IL-1, IL-6 and peripheral corticotropin-releasing factor. Asian Neurogastroenterology & Motility Association & Japanese Society of Neurogastroenterology and Motility Joint Meeting 2017. Osaka, March 23.

⑦ 野津 司, Water avoidance stress induces visceral hyposensitivity through peripheral corticotropin releasing factor receptor type 2 and central dopamine D2 receptor in rats. Asian Neurogastroenterology & Motility Association &

Japanese Society of Neurogastroenterology and Motility Joint Meeting 2017. Osaka, March 24.

⑧ 野津 司, 反復 water avoidance stress による内臓知覚過敏と腸管透過性の亢進—IBS 動物モデルにおける末梢 CRF 受容体, 炎症性サイトカインの役割. 第 121 回日本消化器病学会北海道支部例会 2017 年 9 月 2 日札幌.

⑨ 野津 司, 過敏性腸症候群と CRF. シンポジウム「機能性消化管疾患 up to date」. 第 121 回日本消化器病学会北海道支部例会 2017 年 9 月 2 日札幌.

⑩ 野津 司, ストレス, CRF, 過敏性腸症候群. シンポジウム 2, 大腸機能性疾患の病態, 診断治療の現状と展望. 第 72 回日本大腸肛門病学会学術集会 2017 年 11 月 10 日福岡.

⑪ 野津 司, Glucagon-like peptide-1 アナログ, リラグルチドの内臓知覚と腸管透過性に対する効果について. ワークショップ 15 「過敏性腸症候群のすべて」. 第 14 回日本消化管学会総会学術集会 2018 年 2 月 10 日東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野津 司 (NOZU, Tsukasa)  
旭川医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 30312367

### (2) 研究分担者

奥村 利勝 (OKUMURA, Toshikatsu)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 60281903