

令和 3 年 10 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2019

課題番号：26461050

研究課題名(和文)内視鏡下食道粘膜透過性評価法の確立とその臨床応用に関する検討

研究課題名(英文) Establishment of evaluation method for endoscopic esophageal mucosa permeability and its clinical application

研究代表者

眞部 紀明 (Manabe, Noriaki)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：50403572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：背景と目的：この研究の最初の目的は、新しく開発した生体電気アドミタンス法(BAM)をin-vitroおよびIn-vivoで検証することである。方法：Caco-2単層および3D組織を用い周波数応答アナライザーを使用し、インピーダンスを測定した。次にBAMを、食道粘膜傷害のない胸やけ患者の食道粘膜透過性評価に臨床応用した。結果：インピーダンスは、8層の正常なヒト皮膚線維芽細胞上にある単層Caco-2で最も高かった。また、患者の治療経過によりアドミタンス値が異なった。結論：BAMは食道の上皮下層の異常を検出した。この測定は、上部内視鏡下の食道粘膜の透過性を評価する際も臨床的に有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法が確立されると、内視鏡検査で観察できる全ての消化管各部位の粘膜透過性が測定できる検査法となる。また、これまでの研究から消化管粘膜透過性の変調は、非びらん性胃食道逆流症のみならず機能性胃腸症、薬剤性消化管粘膜障害、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病などの慢性炎症性腸疾患など各種消化管疾患に幅広く関係している可能性があり、これらの疾患の病態解明にも繋がることになる。上記のことから、今後の各種消化管疾患の病態解明、治療方針決定のために幅広く臨床応用される可能性が考えられ、臨床上の有用性は極めて高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：BACKGROUND & AIMS: The first aim of this study is to validate the newly developed bioelectrical admittance method (BAM) in-vitro and in-vivo experiment. METHOD: Impedance was measured using a frequency response analyzer with Caco-2 monolayer and 3D tissue. Next, BAM was clinically applied to the evaluation of esophageal mucosal permeability in heartburn patients without esophageal mucosal break. RESULTS: Impedance was highest with monolayer Caco-2 on 8 layers of normal human dermal fibroblasts. In addition, the admittance value varied depending on the treatment course of the patient. CONCLUSION: BAM detected an abnormality of the subepithelial layer of the esophagus. This measurement was also clinically useful in assessing the permeability of the esophageal mucosa under upper gastrointestinal endoscopy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃食道逆流症 慢性微細炎症 プロトンポンプ阻害薬 治療抵抗 電気抵抗

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間ジャンクションとは細胞間の接着装置のことで、機械的な接着だけではなく、様々な生理学的役割を担っていることが解明されつつある。形態学的には、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモゾーム、ギャップジャンクションという異なる細胞接着構造から構成されている。この中で、タイトジャンクションは、細胞間の距離がほぼゼロに近い構造を示しており、細胞間をシールすることで内と外を区切り、物質透過性を制御していることが判明している(Groschwitz KR. J Allergy Clin Immunol 2009; 124: 3-20)。また、タイトジャンクションを構成する蛋白質として、claudin、occludin や ZO-1 などが明らかになってきており、興味深いことに臓器ごとに claudin の発現分布が異なっていることも報告されている(食道では claudin-1、4、7 が、胃では claudin-1、3、4、7、18 が、大腸では claudin-3、4 の発現が重要であると報告されている(Ahrne A, et al. Nutrients 2011; 3: 104-117)。

近年のこの分野における数多くの研究により、各種消化管疾患とタイトジャンクションの関係が、少しずつ明らかになってきている。大腸のタイトジャンクション機能が低下すると、腸管内に水分が漏出することで下痢になることが考えられており、過敏性腸症候群では、健常者に比較してタイトジャンクション機能が変化していることが報告されている(Piche T, et al. Gut 2009; 58: 196-201)。また、潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患では、開大した細胞間隙を腸内細菌が通過しやすくなり、発症要因の一つとなることが推察されている(Ahrne A, et al. Nutrients 2011; 3: 104-117)。更に、近年における高齢者の増加とそれに伴う整形外科疾患や循環器疾患患者の増加から、非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)をはじめとする各種薬剤による小腸粘膜傷害が注目されているが、肉眼的には異常が見られなくても、NSAID などの薬剤により小腸粘膜バリア機能が障害され、粘膜透過性が亢進することが判明している(Choi VM, et al. Clin Invest Med 1995; 18: 357-361)。

以上の様に、物質透過性の変動がその病態に関与する可能性のある消化管疾患は多いが、これまでの所、その測定には Ussing chamber 法を用いた *in vitro* な検討しかない(Tobey NA, et al. Am J Gastroenterol 2004; 99: 13-22)。同手法は、生検組織を Ussing chamber に浸した後、transepithelial electrical resistance (TEER)を測定するものであるが、煩雑で時間と労力を要し、また費用もかかることから、臨床応用するには問題点が多かった。現在、皮膚科領域では、アトピー性皮膚炎の病状把握、火傷の治療判定に 2 種類の交流を印加して測定する各層膜厚・水分計が臨床応用されているが(Yamamoto Y, et al. Japan Soc. ME&BE (June 2003)、2 種類の交流を粘膜表面に印加して、印加部位における上皮全層の電気抵抗を測定する本手法は、理論的に Ussing chamber を用いた TEER の測定と同様であり、消化管粘膜の透過性評価に臨床応用可能と考えられる。しかしながら、これまで同手法を消化管粘膜透過性の測定に臨床応用した報告はない。今回我々は 2 種類の交流を印加して測定する各層膜厚・水分計に改良を加え、上部消化管内視鏡の鉗子孔を通る太さにまでセンサーを細径化し、上部消化管内視鏡検査施行時に同時に測定ができる様にした。

## 2. 研究の目的

今日、わが国で特に注目されている酸関連疾患の一つに、胃食道逆流症(GERD)が挙げられる。日常臨床の中で最も多い GERD のサブタイプは、上部消化管内視鏡検査で食道に粘膜傷害を認めないものの胸やけ症状を訴える非びらん性胃食道逆流症(NERD)である。しかしながら、その胸やけ症状発現のメカニズムに関しては不明な点が多い。近年、欧米から食道粘膜の透過性が胸やけ症状発現に関与している可能性が報告されており、注目されている(Barlow WJ, et al. Gastroenterology 2005; 128: 771-8)。また、本年に入り、NERD 患者の食道粘膜には肉眼では観察できない micro inflammation が生じており、これが症状発現と関連している可能性があるとの報告が出ている(Savario E, et al. J Gastroenterol 2013; 48: 473-82)。現在、我々は、第一に NERD の食道上皮における micro inflammation がタイトジャンクション機能に変化を生じ、胃酸が食道粘膜を透過しやすくなることで、知覚神経が刺激される機序を推測している。第二に、神経ペプチドの一つであるタキキニンの受容体であるニューロキニン受容体(NK1)の発現の程度と、内臓知覚は非常に密接な相関があり、NK1 の発現が多ければ多い程、内臓知覚過敏の傾向になりうるということが知られているが(Humes DJ, et al. Neurogastroenterol Motil 2012; 24: 318-e163)、NERD の食道粘膜では、micro inflammation により NK1 の発現も亢進していることを推察している。以上のことより、NERD は上部消化管内視鏡検査で食道に粘膜傷害を認めないものの、内臓知覚過敏が引き起こされることにより胸やけ症状を発症している可能性を推察している。

以上の背景のもと、本研究の目的は大きく 2 つから構成される。すなわち、2 種類の交流を印加して測定する各層膜厚・水分計を食道粘膜の透過性の評価に臨床応用可能かについて検討する。具体的には、*in vitro* で Caco-2 単層および 3D 組織を用い周波数応答アナライザーを使用しインピーダンスを測定した。その測定値が、組織構築と関連するか検討した。NERD の病

態における食道粘膜の micro inflammation と食道粘膜の細胞間隙の関係、胸やけ症状発現のメカニズムを主として micro inflammation と内臓知覚過敏の観点から明らかにした。

### 3. 研究の方法

(1) Caco-2 単層および 3D 組織を用い周波数応答アナライザーを使用し、インピーダンスを測定した。

(2) 各層膜厚・水分計を、NERD 患者の食道粘膜透過性評価に臨床応用し治療経過予測になり得るか検討した。上部消化管内視鏡検査で食道粘膜傷害を認めないことを確認した胸やけ患者を対象に、鉗子孔から挿入したセンサーを食道胃接合部より 5cm 口側の食道粘膜に接触させ電気抵抗を測定した。その後、同部より採取した 2 個の生検組織を用いて、microscopic esophagitis の頻度、定量的 RT-PCR 法を用いたタイトジャンクション蛋白および炎症性サイトカインの評価を行った。GERD 症状は F スケール問診票により評価し、microscopic esophagitis は Savarino らの方法に従い評価した(J Gastroenterol 2013)。対象患者はプロトンポンプ阻害薬(PPI)倍量を 2 週間服薬し、胸やけ症状が消失した症例を PPI 奏功群(Group A)、消失しなかった症例を抵抗群(Group B)に分類した。次に両群間における病態の差異を食道粘膜微細炎症および粘膜抵抗性の観点から検討した。

### 4. 研究成果

(1) インピーダンスは、8 層の正常なヒト皮膚線維芽細胞上にある単層 Caco-2 で最も高かった。

(2) 対象患者を Group A と Group B にそれぞれ分類できた。GERD 症状は 2 群間で差を認めなかったが、microscopic esophagitis は Group A で有意に頻度が高く、炎症性サイトカインの上昇も認められた。一方、claudin1 以外のタイトジャンクション蛋白については、2 群間で差を認めなかった。内視鏡下に測定した食道粘膜の admittance (impedance の逆数)については、Group A が有意に高い結果であった ( $P < 0.05$ )。さらに粘膜抵抗と粘膜微細炎症の組織学的指標の一つである basal cell hyperplasia との間に有意な正の相関を認めた( $r=0.68, p < 0.05$ )。食道粘膜の微細炎症の有無および粘膜抵抗性の多寡により、NERD の PPI 反応性が予測できることが証明できた。

以上の結果より、in-vitro の研究で各層膜厚・水分計は食道の上皮下層の異常を検出し得る検査法であることが明らかになった。in-vivo の研究で同測定法を用いることにより、上部内視鏡検査下の食道粘膜透過性を評価でき、NERD 患者の治療効果予測に役立つことが判明し、臨床的に有用であることが明らかになった。

(3) 本研究により、NERD の病態における食道粘膜の micro inflammation と食道粘膜の細胞間隙の関係、更には神経ペプチドの発現の多寡と胸やけ症状発現との関連性が明らかになれば、NERD の新たな病態解明に繋がり、適切な治療方針決定に寄与できると考えられる。また、これまで消化管粘膜透過性の評価は、電子顕微鏡により生検組織の細胞間隙を評価していく方法、生検組織を Ussing chamber に浸した後、transepithelial electrical resistance (TEER)を測定する方法や、蛍光分子量を用いて transepithelial flux を測定する方法が用いられてきた。しかし、いずれの方法も時間と労力を要し、また費用もかかることが欠点として挙げられていた。更に、患者の中には抗凝固療法中のため、内視鏡下の生検が困難な場合もあり、従来法では消化管粘膜透過性の評価そのものが困難なケースも存在した。これまでに、消化管粘膜の透過性を内視鏡観察下に評価した方法は海外から数編見られるものの国内からの報告はない。また、これまでの評価方法は、その手技の煩雑さから、食道粘膜透過性の評価に限られており、その他の部位の消化管粘膜における透過性の評価は困難とされてきた。本結果により、内視鏡検査で観察できる全ての消化管各部位の粘膜透過性が測定できる検査法となる。また、これまでの研究から消化管粘膜透過性の変調は、NERD のみならず機能性胃腸症、NSAID や低用量アスピリン内服に伴う薬剤性消化管粘膜障害、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病などの慢性炎症性腸疾患など各種消化管疾患に幅広く関係している可能性があり、これらの疾患の病態解明にも繋がることになる。ダブルバルーン小腸内視鏡が登場し、内視鏡で観察できない領域の消化管がなくなった現在、小腸内視鏡検査や大腸内視鏡検査に同手法を応用すれば、食道・胃・十二指腸のみならずその他の消化管領域の粘膜透過性の評価も可能と考えられ、同手技が確立されれば、今後の各種消化管疾患の病態解明、治療方針決定のために幅広く臨床応用される可能性が考えられ、臨床上的有用性は極めて高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Manabe N, Haruma K, Kusunoki H, Kamada T, Hata J.	4. 巻 4(33)
2. 論文標題 Differences in salivary secretory function between patients with erosive esophagitis and those with nonerosive reflux disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 807-813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14002.	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 該当する

1. 著者名 Isshi K, Matsushashi N, Joh T, Higuchi K, Iwakiri K, Kamiya T, Manabe N, Ogawa M, Arihiro S, Haruma K, Nakada K.	4. 巻 54
2. 論文標題 Proton pump inhibitor monotherapy is effective to attenuate dyspepsia symptoms associated with gastroesophageal reflux disease: a multicenter prospective observational study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 492-500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01546-0.	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 該当する

1. 著者名 眞部紀明, 春間 賢	4. 巻 33
2. 論文標題 軽症・重症逆流性食道炎の治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 329-333
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 無
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 眞部紀明, 春間 賢	4. 巻 29
2. 論文標題 SSBEとLSBE, どこがちがう? どうして違う?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 消化器内視鏡	6. 最初と最後の頁 1680-1685
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 無
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 Manabe N, Haruma K, Kusunoki H, Kamada T, Hata J.	4. 巻 33
2. 論文標題 Differences in salivary secretory function between patients with erosive esophagitis and those with nonerosive reflux disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 807-813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14002.	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 Sakaguchi M, Manabe N, Ueki N, Miwa J, Inaba T, Yoshida N, Sakurai K, Nakagawa M, Yamada H, Saito M, Nakada K, Iwakiri K, Joh T, Haruma K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Factors associated with complicated erosive esophagitis: A Japanese multicenter, prospective, cross-sectional study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 318-327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v23.i2.318.	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 Manabe N, Haruma K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Optimal acid suppressive treatment for adequate symptom relief and prevention of the complications of gastroesophageal reflux disease: differences in long-term clinical course and pathophysiology among disease subtypes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 113-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-016-0558-0	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 眞部紀明	4. 巻 36
2. 論文標題 GERD治療における胃酸分泌抑制の役割	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Progress in Medicine	6. 最初と最後の頁 1687-1693
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 無
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 Katsuhiko Iwakiri, Yoshikazu Kinoshita, Yasuki Habu, Tadayuki Oshima, Noriaki Manabe, et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Evidence-based clinical practice guidelines for gastroesophageal reflux disease 2015	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 751-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-016-1227-8	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 Manabe N, Yamamoto T, Matsusaki M, Akashi M, Haruma K.	4. 巻 321(1)
2. 論文標題 Measurement of low-grade inflammation of the esophageal mucosa with electrical conductivity shows promise in assessing PPI responsiveness in patients with GERD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	6. 最初と最後の頁 G29-G40.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00365.2020.	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 0件)

1. 発表者名 眞部紀明
2. 発表標題 重症型逆流性食道炎の治療戦略 PPI抵抗例の特徴像
3. 学会等名 第102回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 眞部紀明
2. 発表標題 Differences in responsiveness of PPI in patients with NERD from the viewpoint of micro inflammation and bioelectrical admittance on esophageal mucosa
3. 学会等名 第69回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2015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
研究 分担者	畠 二郎  (Jiro Hata)  (00368630)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究 分担者	春間 賢  (Ken Haruma)  (40156526)	川崎医科大学・医学部・特任教授   (35303)	

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