

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860484

研究課題名(和文)慢性ストレス環境での、グリア細胞由来神経栄養因子による十二指腸上皮透過性の制御

研究課題名(英文)The regulation of duodenal epithelial barrier by the glial cell line-derived neurotrophic factor on chronic psychological stress

研究代表者

田中 史生(TANAKA, Fumio)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20623292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性心理的ストレスによって、十二指腸のグリア細胞由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF)の発現が変化、上皮バリア機能に関与するとの仮説を検証した。方法としてマウスに水回避ストレス負荷を行い、GDNF蛋白発現量、細胞間接着分子mRNA発現量等を解析した。その結果、慢性ストレス環境下ではGDNF発現量がストレス負荷時間依存的に有意に抑制され、接着結合の構成分子の一つであるE-cadherinを介して上皮バリア機能に影響を与え得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in duodenal epithelial barrier function. Mice were subjected to water avoidance stress as a chronic psychological stress and we investigated the duodenal protein expressions of GDNF and mRNA expressions of some kinds of cell-to-cell adhesion molecules. As a result, chronic stress suppressed the expression levels of GDNF in a time-dependent manner during the stress period. mRNA expression levels of E-cadherin, which was a kind of cell-to-cell adhesion molecules at the level of adherent junction, were significantly suppressed by the stress as well as GDNF. Other molecules did not have significant change. Furthermore, the expression levels of E-cadherin were positively correlated with the levels of GDNF. In conclusion, chronic stress down-regulated GDNF and E-cadherin, which were associated with duodenal epithelial barrier dysfunction at the level of adherent junction.

研究分野：内科(含心身医学)、消化器内科

キーワード：心身医学 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 機能性ディスぺプシア (functional dyspepsia; FD)の病態は、胃酸分泌異常、消化管運動・知覚機能異常、心理社会的因子などが複雑に関与した多因子疾患だとされる。特に、十二指腸に微小炎症があり上皮透過性が亢進することが症状発現に関与するとの報告があるが、全身ストレス応答の十二指腸への影響については不明な点が多い。

(2) 腸管グリア細胞は消化管神経システムの構成細胞であり、上皮透過性制御をはじめ消化管運動・知覚機能、神経保護作用など様々な消化管機能に関与するとされる。グリア細胞はグリア細胞由来神経栄養因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF)を産生し、GDNF は上皮透過性亢進を抑制する報告がある。すなわち、慢性ストレス負荷により十二指腸 GDNF の発現量が低下し、上皮透過性亢進を来す可能性が示唆されるのである。

## 2. 研究の目的

機能性ディスぺプシアの病態解明の一助として、本研究は慢性ストレス環境下におけるマウス十二指腸上皮透過性の制御機構の解明を目的とする。具体的には、慢性心理的ストレス負荷による、十二指腸粘膜・粘膜下層中の GDNF 発現量に及ぼす影響、上皮細胞間接着分子の発現量への影響、GDNF 発現量と上皮細胞間接着分子発現量との相関性の検討を目的とする。

## 3. 研究の方法

7 週齢 C57BL/6N 雌性マウスを用い、慢性心理的ストレスとして水回避ストレス (Water avoidance stress; WAS)負荷を 10 日間行った。ストレス負荷第 3、6、10 日目に屠殺、十二指腸粘膜・粘膜下層を剥離採取以下の項目を無ストレス群 (No stress 群)、偽ストレス群 (Sham stress 群)と比較検討した。GDNF 蛋白発現量を ELISA 法で測定し、細胞間接着分子の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて網羅的に解析した。解析した接着分子は以下の通りである; タイト結合; Occludin, Zonula occludens (ZO)-1, Claudin-3, Claudin-4, 接着結合; E-cadherin,  $\beta$ -catenin, デスモゾーム; Desmoglein-2, Desmocollin-2。さらには E-cadherin 蛋白発現量を western blot 法で定量し、GDNF 発現量との相関性解析を行った。

## 4. 研究成果

(1)慢性心理的ストレス負荷による GDNF 蛋白発現量への影響

GDNF 発現量はストレス負荷時間依存的に抑制された (図 1)。ストレス負荷第 10 日目では、GDNF 蛋白発現量は無ストレス群に比し有意に低下した ( $53.8 \pm 19.2$  vs.  $352.7 \pm 36.9$  pg/mg protein、平均値  $\pm$  標準誤差、 $P < 0.01$ )。また GDNF 蛋白発現量は、偽ストレス群に比しても同様に有意な発現低下が認められた ( $53.8 \pm 19.2$  vs.  $188.9 \pm 24.2$  pg/mg protein、 $P < 0.05$ )。

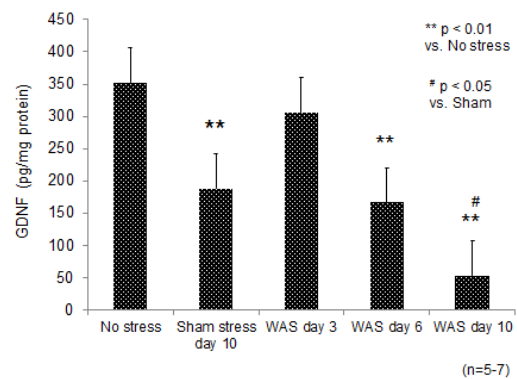


図1 慢性ストレス負荷による十二指腸 GDNF 蛋白発現量

(2)慢性心理的ストレス負荷による上皮細胞間接着分子発現量への影響

細胞間接着因子のなかでも特に、E-cadherin mRNA 発現量は GDNF と同様、ストレス負荷時間依存的に抑制された (図 2)。ストレス負荷第 6 日目では、水回避ストレス群での E-cadherin mRNA 発現量は偽ストレス群、無ストレス群のいずれに対しても有意な低下が認められた (それぞれ  $0.255 \pm 0.0801$ 、 $0.767 \pm 0.105$ 、 $1.01 \pm 0.0636$ 、 $P < 0.01$ ; vs. sham, no stress)。負荷第 10 日目においても同様に、ストレス群において有意な発現抑制作用がみられた ( $0.179 \pm 0.0432$ 、 $P < 0.01$ )。E-cadherin 以外の細胞間接着分子は、ほとんどストレスの影響を認めなかった。

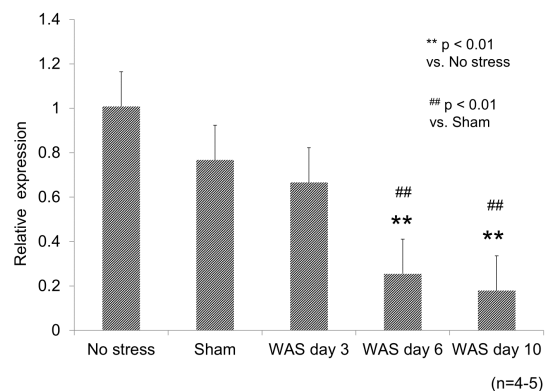


図2 慢性ストレス負荷による十二指腸 E-cadherin mRNA 発現量

また蛋白レベルでは、ストレス負荷第 10 日目の E-cadherin 蛋白発現量は、無ストレス群の約 30%まで抑制された ( $31.1 \pm 13.6$  vs.  $100 \pm 11.9\%$ ,  $P < 0.05$ , 図 3)。

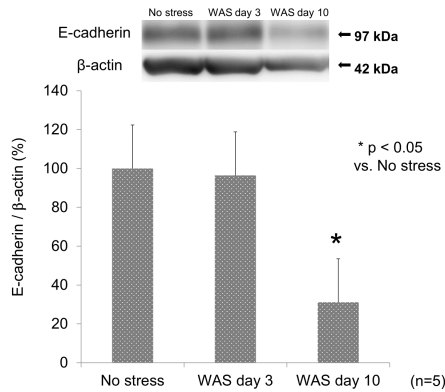


図 3 慢性ストレス負荷による E-cadherin 蛋白発現量

### (3) GDNF と E-cadherin 発現量の相関性解析

E-cadherin mRNA 発現量は GDNF 蛋白発現量と有意な正の相関を認めた ( $P = 0.0002$ ;  $r = 0.68$ , 図 4)。

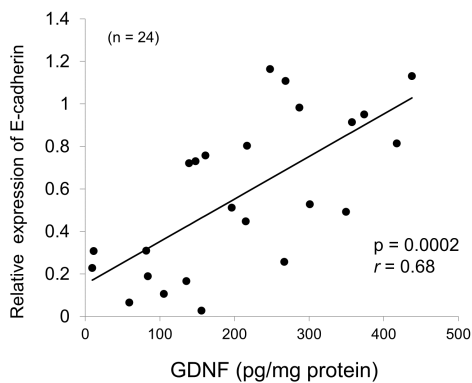


図 4 GDNF 蛋白と E-cadherin mRNA 発現量の相関性

また、E-cadherin 蛋白発現量も、mRNA と同様に GDNF 蛋白発現量と有意な正の相関を認めた ( $P = 0.002$ ;  $r = 0.82$ , 図 5)。

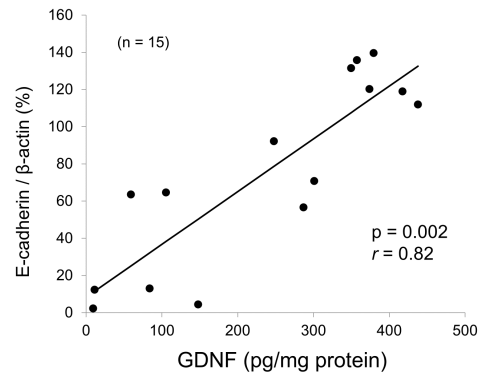


図 5 GDNF 蛋白と E-cadherin 蛋白発現量の相関性

蛍光二重染色では、上皮細胞の管腔側、細胞接着装置に一致して GDNF と E-cadherin が共発現していた。

### (6) 結論

慢性ストレス環境により十二指腸 GDNF 発現量が有意に抑制され、E-cadherin を介して上皮バリア機能に与える可能性が示唆された。

本研究成果は機能性ディスぺプシアの病態生理を探索するうえで先端的な概念を示しており、そのため世界的な消化器系学会 (Digestive Disease Week) や国内学会においても高く注目された。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

田中 史生 他

慢性ストレス環境下での十二指腸粘膜内グリア細胞由来神経栄養因子の発現と、細胞接着分子発現量との相関性解析

第 16 回神経消化器病学会

2014 年 11 月 7 日

学術情報センター (一橋講堂) (東京都千代田区)

田中 史生 他

慢性ストレス負荷による十二指腸粘膜内グリア細胞由来神経栄養因子の発現と、細胞接着分子発現量との相関性解析

第 46 回胃病態機能研究会

2014 年 8 月 2 日

新横浜プリンスホテル (神奈川県横浜市)

Fumio Tanaka et al.

Chronic psychological stress down-regulates the expressions of glial cell line-derived neurotrophic factor and E-cadherin, which are associated with duodenal mucosal barrier dysfunction in mice

DDW2014 (Digestive Disease Week)

2014年5月3日

シカゴ(米国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 史生 (TANAKA, Fumio)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 20623292

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし