

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590710  
 研究課題名 (和文) 食道・胃接合部の内腔で発生する一酸化窒素による周囲組織細胞間結合装置の障害  
 研究課題名 (英文) Disruption of gastric barrier function by luminal nitrosative stress: A potential chemical insult to human gastro-oesophageal junction  
 研究代表者  
 飯島 克則 (IIJIMA KATSUNORI)  
 東北大学・病院・助教  
 研究者番号：60375003

## 研究成果の概要：

食道・胃接合部で発生する癌は、欧米を中心に急速に増加しており、食生活の欧米化などに伴い、今後、本邦でもその増加が危惧されている。私は、これまでヒトの食道・胃接合部で限局性に発生する一酸化窒素 (NO) が同部の炎症・発がんに関連しているという仮説をたて研究を進めてきた。今回のラットの動物モデルを用いた研究で、NO が食道・胃接合部の粘膜表面に傷害を及ぼすことを明らかにされ、今後、発がんとの関連に関する検討が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器内科学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、欧米を中心に食道腺癌を含めた食道・胃接合部に発生する癌が急速に増加しており、胃酸、ペプシン、胆汁酸逆流の関連での検討が進められているが、いまだその原因は不明である。私は、グラスゴー大学との共同研究で、ヒトにおいて硝酸塩摂取後、食道・胃接合部の内腔で限局性に  $50 \mu\text{M}$  という高濃

度の一酸化窒素 (NO) が発生することを明らかにした。ヒトでは、経口摂取された硝酸塩は、小腸で吸収された後、唾液中に数時間わたり分泌され、この約 20% が口腔内細菌によって亜硝酸塩に変換される。唾液とともに嚥下された亜硝酸塩は初めて胃酸と接触する地点である食道・胃接合部でアスコルビン

酸を含む強酸性の胃液と瞬時に化学反応し、大量の NO が食道・胃接合部に限局して発生すると考えられる。また、この消化管内腔での NO の発生は胃酸の食道内逆流を認める場合、下部食道に移動する。

NO は生体内で様々な作用を有していることが知られているが、高濃度では細胞障害作用を呈し、発癌因子となりうることが示唆されている。したがって 50  $\mu$ M というヒトの食道・胃接合部内腔で検出された高濃度の NO が、同部位の発癌の原因になり得るとする仮説を提唱してきた。

食道・胃接合部の発癌に至る過程で同部位の炎症（噴門炎、または逆流性食道炎）、それに続く腸上皮化生（噴門部腸上皮化生、またはバレット食道）との関連が注目されている。こうした病態の原因はまだ明らかになっていないが、食道・胃接合部内腔で発生し、周囲組織に拡散する高濃度の NO が関係している可能性がある。

## 2. 研究の目的

これまでの実験結果から食道・胃接合部内腔で発生した NO は周囲組織に拡散し、ニトロソ化ストレスを及ぼしうるということが明らかになったが、実際に考えられる組織障害がどこでどのように始まるかは不明である。

tight junction は細胞と細胞の間にある細胞間結合装置であり、胃粘膜では細胞それ自体とともに管腔側と基底側とを境する粘膜の barrier 機構をなす構造物である。培養細胞を用いた実験で NO は消化管上皮の tight junction を破壊し、上皮の barrier 機能を障害することが示されている。また、LPS 投与によって内因性に NO を発生させた in vivo の状態でも同様の障害が惹起されることが明らかにされている。

本研究では、食道・胃接合部の内腔で発生した NO による周囲組織 tight junction に及

ぼす影響に関してラットモデルを用いて ex vivo、in vivo にて評価する。

## 3. 研究の方法

消化管上皮には障害に対し、神経や血流を介して種々の防御機構を有している。そこで、神経や血流の影響を受けず、胃粘膜上皮のみで検討可能な Ussing chamber モデルを用いて、食道胃接合部内腔および周囲粘膜の微小環境を再現する。この chamber では粘膜を中央にセットし、左右の chamber はそれぞれ別々の溶液を還流ことができ、種々の測定が可能である。tight junction が形成する電気的抵抗は、細胞膜自体の膜抵抗とともに粘膜抵抗の主要な構成要素であり、また膜の透過経路としても、単純拡散による受動輸送を中心とした paracellular pathway を形成している。

Wistar rat 雄 8 週齢の胃を摘出し胃粘膜層のみを剥ぎとって chamber にセットし、Serosa 側には pH 7.4 Krebs buffer を、mucosa 側に control 群は pH 2.5HCL、NO 群はそれに亜硝酸塩を生理的範囲内の濃度で加え還流する。ここで NO 群は pH 2.5 の酸性条件下で亜硝酸炎から発生した NO に曝露される。

検討項目として電気生理学的検討、膜透過性変化、tight junction 関連蛋白である occludin、ZO-1 の変化、位相差電顕を用いた消化管上皮微細構造の観察などを行う。

## 4. 研究成果

粘膜のバリア機構の評価に関しては、電気生理学的な粘膜抵抗の測定、<sup>3</sup>H で標識したマンニトールの管腔側から基底側への透過速度の測定、さらに粘膜表層上皮細胞間でバリア機構を形成する tight junction の傷害をみるため、tight junction 関連蛋白である occludin の免疫染色および Western blot を行った。実際に粘膜内に NO をはじめとした

reactive nitrogen oxygen species (RNOS) が拡散しているか確認するために、RNOS と組織中蛋白との反応生成物である DNIC (Dinitrosyl dithiolato iron complex) を低温下で EPR 法 (electron paramagnetic resonance spectroscopy) を用いて測定することで検討した。

Ussing chamber にて粘膜側に RNOS を曝露した結果、粘膜抵抗の低下および粘膜透過性の亢進、さらに免疫染色と Western blot で tight junction 関連蛋白である occludin の発現低下を認めた。また発生した RNOS の粘膜内への拡散を組織中 DNIC を低温 EPR 法で検出することにより確認した。

ヒト食道胃接合部内腔およびその周囲粘膜の微小環境を再現したこのラットにおける検討において、食道胃接合部内腔で発生した RNOS がその周囲粘膜の tight junction を傷害し、それによって粘膜防御機構を低下させることが示された。RNOS の化学修飾作用によるストレスが、ヒト食道胃接合部における重要な傷害因子となることが示唆された。

#### 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 7 件)

1. Ara N, Iijima K, Asanuma K, et al. Disruption of gastric barrier function by luminal nitrosative stress: a potential chemical insult to the human gastro-oesophageal junction. *Gut* 2008;57(3):306-313. 査読有
2. Terai S, Iijima K, Kato K, et al. Long-term outcomes of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas after *Helicobacter pylori*

eradication therapy. *Tohoku J Exp Med* 2008;214(1):79-87. 査読有

3. Asanuma K, Iijima K, Ara N, et al. Fe-S cluster proteins are intracellular targets for nitric oxide generated luminally at the gastro-oesophageal junction. *Nitric Oxide* 2007;16(4):395-402. 査読有
4. Iijima K, Koike T, Abe Y, et al. Extensive gastric atrophy: an increased risk factor for superficial esophageal squamous-cell carcinoma in Japan. *Am J Gastroenterol* 2007;102(8):1603-1609. 査読有
5. Combet E, Paterson S, Iijima K, et al. Fat transforms ascorbic acid from inhibiting to promoting acid-catalysed N-nitrosation. *Gut* 2007;56(12):1678-1684. 査読有
6. 飯島克則、浅沼清孝、大原秀一、下瀬川徹、今月のテーマ：食道・胃接合部における一酸化窒素(NO)の発生、日消誌 2007; 104: 17-22 査読無
7. 飯島克則、浅沼清孝、小池智幸、ほか、硝酸塩と胃酸分泌：噴門部癌、非噴門部胃癌との関連、*Helicobacter Research* 2007; 11: 335-339. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① 飯島克則、他、ラット逆流性食道炎モデルにおける外因性一酸化窒素食道暴露による影響、第8回日本NO学会学術集会、2008年5月9日、仙台
- ② 飯島克則、食道・胃接合部と一酸化窒素、第7回日本NO学会学術集会、2007年5月17日、大津

③荒 誠之、飯島克則、ほか、食道・胃接合部で発生したNOによる周囲組織 tight junctionの傷害、第7回日本NO学会学術集会、2007年5月17日、大津

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 克則 (IIJIMA KATSUNORI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：60375003

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし