

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790582

研究課題名(和文) ストレス誘発過敏性腸症候群モデルにおける消化管痛覚過敏発現メカニズムの網羅的解析

研究課題名(英文) Multiple analysis in colon of the stress-induced irritable bowel syndrome model

研究代表者

酒井 寛泰 (Sakai, Hiroyasu)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00328923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6JではなくBALB/c系マウスを用いたストレス負荷では、再現性の良い下痢発症が観察された。そこで、ストレス負荷BALB/cマウスの結腸組織における各種サイトカインの遺伝子発現変化を検討した。ストレス負荷時には結腸組織において、種々のサイトカインの遺伝子発現が著しく抑制されているにもかかわらず、ストレス負荷初期にはIL-4ならびにIL-17aを介する反応が亢進されている可能性が示唆された。これらのサイトカイン遺伝子発現変化と下痢発症との相関関係は得られなかったため、ストレス負荷時に発症する下痢発症は複雑であり系統差ならびに今回の研究で調べたもの以外の因子の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diarrhea was induced by stress loaded with communication box in BALB/c mouse, although diarrhea was not caused in C57BL/6J mouse. Irritable bowel syndrome produces some symptoms similar to those of inflammatory bowel disease. In the present study, the gene expression of inflammatory cytokines in colon of the stress-loaded BALB/c mouse was examined. The expressions of various cytokines were attenuated by stress-loaded, although IL-4 and IL-17a gene expressions were increased by acute stress loaded, respectively. However, augmentation of these gene expressions was not correlated with development of diarrhea. On the other hand, gene expressions of TRPA1 and TRPV1 were increased by acute stress loaded. Furthermore, gene expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) was increased by stress loaded. These results showed that the mechanism of stress-induced diarrhea is complicated in inflammation. Further studies are needed about involvement of TRPA1, TRPV1 and CFTR.

研究分野：薬理学

キーワード：過敏性腸症候群 炎症 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

過敏性腸症候群 (Irritable Bowel Syndrome: IBS)は臨床において最も高頻度に診断され、10人に1~2人がIBSで悩んでいると言われている。IBSは、ストレスにより、腸管運動の異常や脳・腸管の知覚過敏が生じることが原因とされている。つまり、IBSはストレスが関与している機能性消化管障害の1つであると言える。IBSの主な症状は慢性的な腹痛あるいは腹部不快感(内臓知覚の変化)と便通異常であり、結腸組織に潰瘍等の基質的病変を認めないことを特徴とする。IBSの便通異常は下痢型、便秘型、交換型(下痢と便秘を繰り返す)の3種類に分類される(1)。現在のIBS治療は、患者のストレスを緩和する方法や、便通異常への対症療法に注力しており、ストレス因子の排除、抗不安薬投与と共に、下痢型IBSに対しては5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬等が使用されている(2)。しかしながら、最も重要なIBSの主症状である慢性腹痛については、未だ発症機序が解明されていない。一方、便通異常は内臓知覚神経過敏が原因となる可能性が高く、そのトリガーとなりうる要因として局所性の神経免疫応答異常が推察される。

消化管は第2の脳と言われるように、脳に匹敵するほどの神経細胞が存在し、細部では神経ネットワークが発達している。このネットワークは消化管神経叢(Enteric Nerve System: ENS)と総称される。内臓知覚の発現メカニズムは、下部消化管では内在性1次知覚神経と脊髄性求心性知覚神経が調節しており、後者に集められたシグナルは骨盤神経を経て脊髄に入力される。

一方、炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease: IBD)の罹患率は近年我が国において急激に増加している疾患である。IBDにおいては精神的影響がその臨床経過に大きく影響すると考えられており、とくに精神的ストレスが活動性を高める可能性が以前より示唆されている。精神的ストレスとIBDに関して、Levensteinら(3)は比較的長期に渡るストレス感受性の増加が、潰瘍性大腸炎の寛解期からの再発のリスクファクターとなることを立証している。一方、IBDと診断される以前にIBS症状が年余にわたり続き、IBSとして治療されていたケースも多く、また、IBSからIBDに発展するケースも多いことが知られている。さらに、IBS患者は一般に比べIBDの発症が16倍以上との報告が見られる(4)。これらの事実は、器質的疾患のIBDと機能性疾患であるIBSの間には想像以上に相関が認められることを意味しており、IBS、IBD両者に共通する因子/現象としてストレスに伴うENSの異常が考えられる。近年、腸管感染症後に年余に

みられるIBSであるpost-infectious IBSが注目されているが、感染が存在しないと考えられていたIBS患者の腸管粘膜を詳細に調べると、肉眼的には正常にみられる粘膜においてリンパ球浸潤がみられたり、神経叢の異常がみられたりする所見が報告されている(5)。これらの知見から、IBS、IBD両者は共に腸管内神経免疫異常を伴う疾患である可能性が考えられる。

## 引用文献

- (1) Drossman DA. 130:1377-90, 2006.
- (2) Mayer EA and Bradesi S. 4:2089-98. 2003.
- (3) Levenstein S et al. Am J Gastroenterol 95:1213-1220, 2000.
- (4) Garcia-Rodriguez LA et al. Scand J Gastroenterol 35: 306-311, 2000.
- (5) Törnblom H et al. Gastroenterology 123: 1972-1979, 2002.

## 2. 研究の目的

本研究では、コミュニケーションボックスによるストレス負荷と下痢の発症ならびに直腸の炎症性サイトカイン等の遺伝子発現変化を検討した。

## 3. 研究の方法

① コミュニケーションボックスを用いたC7B1/6J および BALB/c マウスストレス負荷

1日当たり2時間(2mA, 15sec間隔)または(1mA, 15sec間隔)の心理および物理的ストレスを連続5または12日間曝露させ、下痢の発症および体重変化を検討した。

### ② 下痢発症の評価

下痢の発症度はスコア化し、評価した。スコアは0-4の以下の5段階で評価した。0: 硬く水分の少ないもの。1: ペースト状で少し柔らかい軟便。膨潤し僅かに大きくなっている。2: 水分がさらに多くなり色が薄くなった軟便。スパーテルで潰すと試験紙が湿る。3: 水分と粘液が多くなり、形状が崩れやすいあるいは崩れている下痢便。4: ほとんどが水分あるいは粘液からなり固形物がほとんどない下痢便。

### ③ ストレス負荷時の誘発各種遺伝子発現変化

動物を麻酔下(イソフルラン吸入)、瀉血致死させ、結腸を摘出する。氷冷した生理食塩水中にて、速やかに糞便や結合組織などを取り除き、Tri reagent (Sigma-Aldrich)に浸す。マニュアルに従い、total RNAを抽出した。QuntiTect Reverse Transcription Kitを用いてcDNA

を作製し、各種プライマーを用いて real time PCR (StepOnePlus リアルタイム PCR システム; Life technologies)にて遺伝子発現変化を検討した。

#### 4. 研究成果

C57BL/6J ならびに BALB/c マウスにコミュニケーションボックスを用いて5日間ストレス負荷(2 mA, 15 sec 間隔、2hr)したところ BALB/c マウスでは下痢の発症が観察されたが、ストレス負荷 4 日目には死亡したマウスが観察された。また、C57BL/6J マウスはコミュニケーションボックスによるストレス負荷に対して抵抗性を示した。体重変化は両系統において明らかな変化は認められなかった(図 1)。

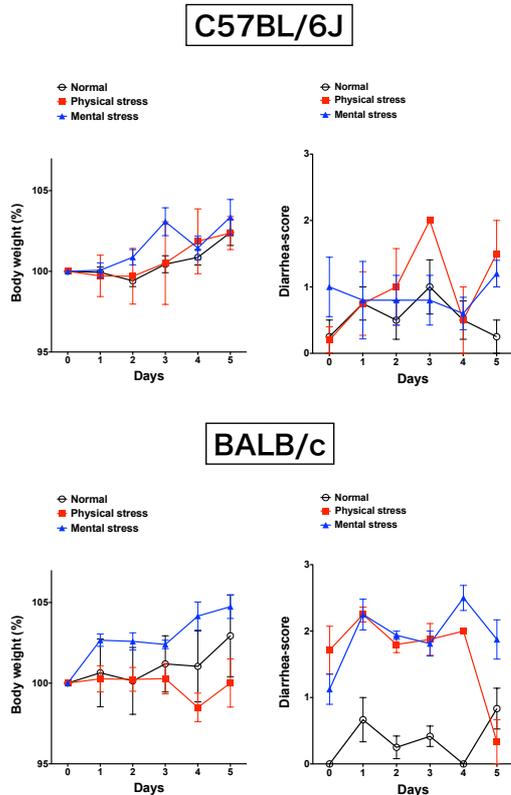


図 1. コミュニケーションボックス (2 mA, 15 sec 間隔、2 時間) をも用いたストレス負荷時の体重変化と下痢発症

そこで、緩和な条件 (1 mA, 15 sec 間隔、2 hr) に変更し BALB/c マウスを用い、mental および physical stress (MS および PS) を亜急性 (5 日間) および慢性的 (12 日間) に負荷させたところ、MS 負荷マウスでは体重の変化が認められなかったが、PS 負荷群では有意な体重減少を認めた。また、MS および PS 負荷群において正常動物と比べ有意な下痢の発症が認められた (図 2)。

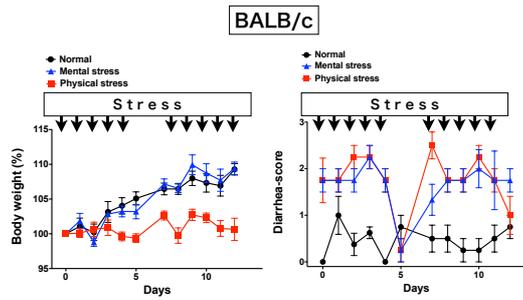


図 2. コミュニケーションボックス (1 mA, 15 sec 間隔、2 時間) をも用いたストレス負荷時の体重変化と下痢発症

さらに、結腸の proinflammatory cytokine である TNF-alpha、IL-1beta、IL-6 および Th1 type cytokine である IFNgamma の遺伝子発現は MS ならびに PS 群において慢性ストレス負荷により有意に減少することが明らかとなった。さらに、Th2 type cytokine である IL-4 は亜急性 mental stress のみでの発現上昇が観察された。Th17 type cytokine である IL-17a は亜急性負荷において MS ならびに PS 群において有意に亢進した (図 3)。

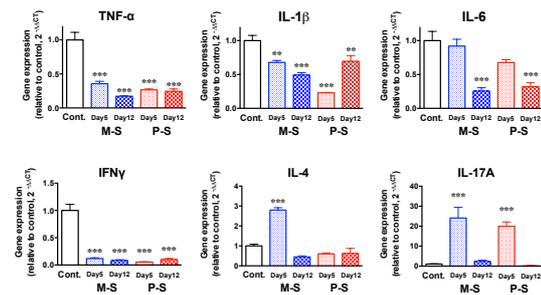


図 3. コミュニケーションボックス (1 mA, 15 sec 間隔、2 時間) をも用いたストレス負荷時の結腸における炎症性サイトカインの遺伝子変化

さらに、腸管炎症ならびに痛覚過敏に関与していることが知られている transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ならびに TRP vanilloid 1 (TRPV1) の遺伝子発現変化を解析したところ、TRPA1 および TRPV1 は亜急性 MS 負荷では有意に亢進され、慢性 PS 負荷においては有意に亢進した (図 4)。

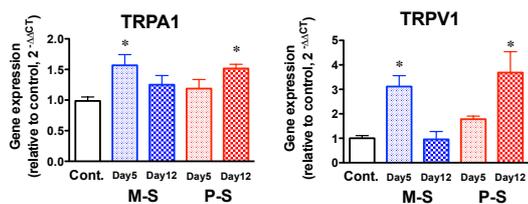


図 4. コミュニケーションボックス (1 mA, 15 sec 間隔、2 時間) をも用いたストレス負荷時の結腸における TRPA1 および TRPV1 の遺伝子変化

以上の知見より、コミュニケーションボックスによるストレス負荷では、結腸において、proinflammatory cytokine、IFN-gamma が関与する炎症が引き起こされているのではなく、逆に免疫抑制が引き起こされているという知見を得たが、ストレス負荷初期には IL-4 ならびに IL-17a を介する Th2 や Th17 を介した反応が亢進されている可能性が示唆されたが、これらの変化と下痢発症との相関関係は得られなかった。

一方、下痢の原因の1つとして考えられる分泌亢進に着目して研究を進めた。分泌性下痢といわれるものは、小腸や大腸の粘膜に存在する腸管上皮細胞が塩素イオン (Cl<sup>-</sup>) を分泌して起こり、そのためには腸管上皮細胞の塩素イオンチャンネル (Cl<sup>-</sup>チャンネル) が作動することが知られており、このチャンネルとして cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) が知られている。この CFTR の結腸における遺伝子発現を検討したところ、PS 負荷だけではなく MS 負荷においても発現が上昇していることを明らかにした (図 5)。

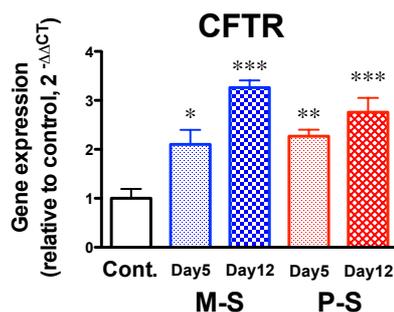


図 5. コミュニケーションボックス (1 mA, 15 sec 間隔、2 時間) をも用いたストレス負荷時の結腸における CFTR の遺伝子変化

以上の結果から、マウスの系統差があるものの、stress 負荷時には下痢が発症し、結腸において種々の炎症に関与する遺伝子発現が変動することが明らかになった。また、長期 stress 負荷時には proinflammatory cytokines の発現が減少し、腸内細菌による感染による炎症反応が惹起しやすい可能性も示唆できた。この状況は、結腸において炎症を引き起こしやすく、下痢が発症しやすくなる可能性が非常に高い。また、慢性だけでなく亜急性 mental および physical stress 負荷時には Cl<sup>-</sup>チャンネルである CFTR の発現が増強し、結腸における分泌が亢進し下痢を発症しうる可能性も示唆できた。今後、ストレス負荷時の下痢に対する CFTR 阻害薬の効果や stress 負荷時における TRPA1 や TRPV1 を介する消化管の痛覚閾値変動を検討して行く必要がある。

## 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 13 件)

1. Shibata K, Sakai H, Huang Q, Kamata H, Chiba Y, Misawa M, Ikebe R, Ikebe M. Rac1 regulates myosin II phosphorylation through regulation of myosin light chain phosphatase. *J Cell Physiol.* (査読有り) 2015;230:1352-64.

2. Koh K, Hamada A, Hamada Y, Yanase M, Sakaki M, Someya K, Narita M, Kuzumaki N, Ikegami D, Sakai H, Iseki M, Inada E, Narita M. Possible involvement of activated locus coeruleus-noradrenergic neurons in pain-related sleep disorders. *Neurosci Lett.* (査読有り) 2015;589:200-6.

3. Sakai H, Watanabe A, Fujita A, Misawa M, Narita M, Chiba Y. Augmented bronchial smooth muscle contractility induced by aqueous cigarette smoke extract in rats. *J Smooth Muscle Res.* (査読有り) 2014;50:39-47.

4. Sakai H, Sato K, Kai Y, Shoji T, Hasegawa S, Nishizaki M, Sagara A, Yamashita A, Narita M. Distribution of aquaporin genes and selection of individual reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in multiple tissues of the mouse. *Can J Physiol Pharmacol.* (査読有り) 2014;92:789-96.

5. Sakai H, Watanabe A, Fujita A, Misawa M, Narita M, Chiba Y. Augmented bronchial smooth muscle contractility induced by aqueous cigarette smoke extract in rats. *J Smooth Muscle Res.* (査読有り) 2014;50:39-47.

6. Sakai H, Sagara A, Matsumoto K, Jo A, Hirotsuki A, Takase K, Sugiyama R, Sato K, Ikegami D, Horie S, Matoba M, Narita M. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon. *Pharmacol Res.* (査読有り) 2014;87:71-9.

7. Sakai H, Sagara A, Arakawa K, Sugiyama R, Hirotsuki A, Takase K, Jo A, Sato K, Chiba Y, Yamazaki M, Matoba M, Narita M. Mechanisms of cisplatin-induced muscle atrophy. *Toxicol Appl Pharmacol.* (査読有り) 2014;278:190-9.

8. Odo M, Koh K, Takada T, Yamashita A, Narita M, Kuzumaki N, Ikegami D, Sakai H,

Iseki M, Inada E, Narita M. Changes in circadian rhythm for mRNA expression of melatonin 1A and 1B receptors in the hypothalamus under a neuropathic pain-like state. *Synapse*. (査読有り) 2014;68:153-8.

9. Ito H, Yanase M, Yamashita A, Kitabatake C, Hamada A, Suhara Y, Narita M, Ikegami D, Sakai H, Yamazaki M, Narita M. Analysis of sleep disorders under pain using an optogenetic tool: possible involvement of the activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neurons. *Mol Brain*. (査読有り) 2013;6:59.

10. Sakai H, Hara T, Todoroki K, Igarashi Y, Misawa M, Narita M, Chiba Y. Elevated guanylate cyclase and cyclic-guanosine monophosphate-dependent protein kinase levels in nasal mucosae of antigen-challenged rats. *Microvasc Res*. (査読有り) 2013;90:150-3.

11. Matsumoto K, Nakajima T, Sakai H, Kato S, Sagara A, Arakawa K, Tashima K, Narita M, Horie S. Increased expression of 5-HT3 and NK 1 receptors in 5-fluorouracil-induced mucositis in mouse jejunum. *Dig Dis Sci*. (査読有り) 2013;58:3440-51.

12. Sakai H, Sagara A, Matsumoto K, Hasegawa S, Sato K, Nishizaki M, Shoji T, Horie S, Nakagawa T, Tokuyama S, Narita M. 5-Fluorouracil induces diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines. *PLoS One*. (査読有り) 2013;8:e54788.

13. Sakai H, Watanabe Y, Honda M, Tsuiki R, Ueda Y, Nagai Y, Narita M, Misawa M, Chiba Y. Involvement of the Tyr kinase/JNK pathway in carbachol-induced bronchial smooth muscle contraction in the rat. *Anesthesiology*. (査読有り) 2013;118:1076-85.

[学会発表] (計 12 件)

1. 小口 綾、甲斐友規、加藤伸一、成田 年、酒井寛泰：5-FU 誘発下痢発症時の結腸における網羅的遺伝子発現変動とクルクミンの効果、第 135 回国日本薬学会年会、神戸、2015 年 3 月

2. 酒井寛泰：シンポジウム 抗がん剤副作用対策 抗がん剤による消化管障害～5-fluorouracil 投与時の下痢発症における

好中球の関与～、第 8 回緩和医療薬学会年会、熊本、2014 年 10 月

3. 酒井寛泰、相良篤信、佐藤 健、甲斐友規、小口 綾、石川裕子、松本健次郎、唐沢武司、政所和孝、加藤伸一、成田 年：結腸器官培養法を用いた 5-fluorouracil 誘発 CXCL1 発現増加、第 130 回日本薬理学会関東部会、東京、2014 年 7 月

4. 相良篤信、酒井寛泰、松本健次郎、廣崎皓子、趙 娥羅、杉山諒人、高瀬和秀、佐藤 健、池上大悟、堀江俊治、成田 年：5-fluorouracil 誘発下痢発症時における好中球エラスターゼの役割、第 87 年会日本薬理学会年会、仙台、2014 年 3 月

5. 高瀬和秀、酒井 寛泰、相良篤信、廣崎皓子、趙 娥羅、杉山諒人、佐藤 健、成田 年：5-fluorouracil 誘発摂食量抑制時の結腸における peptide YY および GLP-1 遺伝子発現増加、第 87 年会日本薬理学会年会、仙台、2014 年 3 月

6. 趙 娥羅、酒井寛泰、高瀬和秀、廣崎皓子、杉山諒人、山田友美、相良篤信、松本健次郎、堀江俊治、中川貴之、徳山尚吾、成田 年：抗がん剤による神経障害ならびに下痢発現メカニズム解明における多施設共同研究(第 4 報)：結腸における 5-FU 誘発下痢発症時の好中球の関与、第 7 回緩和医療薬学会年会、幕張、2013 年 9 月

7. 相良篤信、酒井寛泰、杉山諒人、高瀬和秀、趙 娥羅、廣崎皓子、山田友美、成田 年：5-FU 投与誘発食欲低下時における食欲調節消化管ホルモンの発現変化、第 7 回緩和医療薬学会年会、幕張、2013 年 9 月

8. 酒井寛泰、相良篤信、池上大悟、松本健次郎、堀江俊治<sup>2</sup>、中川貴之<sup>3</sup>、徳山尚吾、成田 年：シンポジウム 「研究推進委員会企画：緩和医療における抗がん剤の最新知見」 抗がん剤による消化管障害、第 7 回緩和医療薬学会年会、幕張、2013 年 9 月

9. 酒井寛泰、相良篤信、石丸喜朗、阿部啓子、成田 年：シンポジウム 抗がん剤による舌上味覚受容体の発現変化、第 7 回緩和医療薬学会年会、幕張、2013 年 9 月

10. 佐藤 健、酒井寛泰、杉山諒人、高瀬和秀、趙 娥羅、廣崎皓子、山田友美、相良篤信、轟 憲二、佐々木菜風、上田悠介、本田麻衣、西崎麻衣子、長谷川哲、千葉義彦、成田 年：苦味受容体である T2R8 遺伝子の組織発現分布ならびに T2R8 を介した平滑筋弛緩作用、第 133 回日本薬学会年会、横浜、2013 年 3 月

11. 相良篤信、酒井寛泰、佐藤 健、長谷川哲、西崎麻衣子、庄司哲郎、松本健次郎、堀江俊治、中川貴之、徳山尚吾、成田 年：抗がん剤による神経障害ならびに下痢発症メカニズム解明における多施設共同研究(第3報)：抗がん剤投与による下痢発症時の大腸における炎症性サイトカイン発現変化、第6回日本緩和医療薬学会、兵庫、2012年10月

12. 酒井寛泰、相良篤信、佐藤 健、松本健次郎、長谷川哲、西崎麻衣子、庄司哲郎、堀江俊治、中川貴之、徳山尚吾、成田 年：抗がん剤による下痢メカニズムの解析および舌における味覚受容体の遺伝子発現変化、第6回日本緩和医療薬学会、兵庫、2012年10月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 寛泰 (SAKAI HIROYASU)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00328923