

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460718

研究課題名(和文) 機能性胃腸症における胃の痛覚過敏への副腎皮質刺激ホルモン放出因子受容体の関与

研究課題名(英文) Role of corticotropin-releasing factor receptor on gastric hyperalgesia associated with functional dyspepsia

研究代表者

尾崎 紀之(Ozaki, Noriyuki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40244371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】明らかな器質的病変が見られないにも関わらず痛みなどの上部消化管症状を呈す機能性胃腸症(FD)のメカニズムを明らかにするため、動物にストレスを加えたときの胃の痛覚の変化を調べ、痛覚の亢進への副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)ファミリーおよびIL-6の関与を調べた。【結果】ストレスにより胃の痛覚が亢進し、CRF2受容体拮抗薬及びIL-6中和抗体で抑制された。胃粘膜にはCRF、CRFファミリーのUCN1、UCN2及びCRF2受容体が発現し、一部は肥満細胞に発現していた。【結論】ストレスによる胃の痛覚過敏には胃粘膜のCRF2受容体及びIL-6が関与し、FDのメカニズムへの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional dyspepsia is defined as persistent or recurrent upper gastrointestinal tract symptoms such as pain without any obvious pathological changes. We examined the changes in pain sensation of the stomach after the stress in rat. In addition, involvements of corticotropin releasing factor (CRF), Type 2 CRF receptor (CRFR2) and CRF related peptides Urocortin (UCN) 1/2/3 in gastric hyperalgesia were investigated. Repeated WAS produced gastric hyperalgesia after the stress, with no obvious lesions in the gastric mucosa. Gastric hyperalgesia was inhibited by CRFR2 antagonists. CRF, CRFR2, and UCN1/2 positive cells existed in lamina propria. CRFR2 positive cells were increased after WAS. Mast cells co-expressed CRFR2 or UCN2 in the lamina propria. WAS developed gastric hyperalgesia even in the absence of detectable gastric pathology, suggesting its suitability for a potential animal model of FD. CRFR2 play important roles in gastric hyperalgesia observed after the stress.

研究分野：疼痛学

キーワード：機能性胃腸症 ストレス 副腎皮質刺激ホルモン放出因子 肥満細胞 痛覚過敏 内臓痛 CRF2 urocortin

## 1. 研究開始当初の背景

### **(1)機能性消化管障害、機能性胃腸症**

痛みや不快感など消化管に起因する症状を呈するものの器質的病変、生化学的所見が明らかでないものは機能性消化管障害とよばれ、上部消化管症状を呈する機能性胃腸症 (Functional Dyspepsia:FD)や下部消化管症状を呈する過敏性腸症候群(IFS)がある。機能性胃腸症は頻度が高く欧米でも日本でも成人の 15-20%が経験しており、潰瘍や悪性腫瘍など器質性の疾患との鑑別も必要であることから、メカニズムを明らかにすることは重要である。過敏性腸症候群では CRF やその関連ペプチドである urocortin1 (UCN1), urocortin2 (UCN2) が受容体 CRF1, 2 を介して結腸の運動や痛覚の変化に関与しているとの報告がある。機能性胃腸症についても胃の運動と知覚の異常が関係していると考えられるが、その病態生理は十分には解明されていない。

### **(2)胃の痛みの動物モデルの開発と胃潰瘍、胃炎の痛覚過敏に関与するメディエーターの解析**

我々は、これまで、胃の痛みの動物モデルを開発し、胃の急性の痛みには大内臓神経が関与していること(Ozaki et al., 1999, 2001)、胃炎や胃潰瘍を作成した動物では胃の痛覚過敏が見られ(Ozaki et al., 2002)、末梢の知覚神経の電位感受性ナトリウムチャンネルが興奮性を増していること(Bielefeldt, Ozaki, Gebhart 2002ab)、また、神経成長因子が胃潰瘍の組織に発現し(Ozaki et al., 2002)、電位感受性ナトリウムチャンネルの興奮性を亢進させ(Bielefeldt, Ozaki, Gebhart., 2003)、潰瘍で見られる胃の痛覚の亢進に関与していることを明らかにしてきた。

### **(3)機能性胃腸症モデル動物開発の試み**

一方、機能性胃腸症については、臨床的研究は見られるものの (Anand et al., 2007) 適切な動物モデルがなく、基礎的研究は少ない。我々は、ストレスがラットの胃に痛覚過敏をひき起こし、機能性胃腸症の動物モデルとして有用で、このモデルで見られた痛覚過敏は CRF1 ではなく、CRF2 が関与することを報告している(Kozakai, Ozaki et al., 2012)。過敏性腸症候群のモデル動物では結腸の痛覚や運動に亢進に CRF1 が関与し、CRF2 は鎮痛に働くとの報告があり(Million et al., 2006)、胃と腸とでは痛覚に関与する CRF 受容体が異なる可能性がある。胃の痛覚における CRF2 の関与はこれまで報告がないが、胃の運動を抑制し胃内容の排出遅延に関与することは分かっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が開発しているストレスによる胃の痛覚過敏の動物モデルの解析を進め、機能性胃腸症の動物モデルとしての妥当性を検証し、さらに胃の痛覚過敏に関与する CRF2 受容体を中心とした分子メカニズム

を分析することで機能性胃腸症のメカニズムを明らかにし、効果的な治療法を開発につなげることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1)ストレスによる胃の痛覚過敏の動物モデルの検証

我々はラットに water avoidance stress (Bradesi et al., 2007)を毎日 2 時間、10 日間加えるとストレス後に胃の痛覚が亢進することを報告した(尾崎、杉浦、2007)。このモデルが機能性胃腸症のモデルとして有用かどうか検証するため、以下の項目について調べた。

#### (1)-1. 胃の痛覚の変化

ラットの胃をバルーンで伸展したときの内臓運動反射を筋電図の変化として記録したものは胃の痛覚を反映することを我々は報告している(Ozaki et al., 2002)。これまでの実験では、ストレス終了後に胃の痛覚が亢進したので、ストレス曝露期間中の痛覚の変化について経時的な検討を行った。

#### (1)-2. 胃の排出能

胃の排出能はアンバーライトペレットを経口投与し、胃に滞留する量で評価した(Matsuda et al., 1993)。ヒトの機能性胃腸症では胃内容の排出遅延が報告されているが、ストレス後の胃の残渣を測定した予備実験では、有意な胃内容の排出遅延は見られなかった。

#### (1)-3. 胃壁の病変の有無の肉眼的・組織学的検査

胃壁の潰瘍、出血、炎症の有無を肉眼的、組織学的に調べた。10 日間のストレス後にあきらかな病変は見られなかったが、経時的変化の検討をした。

#### (1)-4. 体性痛の変化

ストレスは体性痛にも影響することが報告されているので、ストレスによる体性痛の変化を、von Frey test (皮膚の機械性痛覚試験)、Hargreaves test(皮膚の熱性痛覚試験)で調べた。

### (2)ストレスによる胃の痛覚過敏における CRF、CRF 関連ペプチドと受容体の関与の解析

#### (2)-1 行動薬理的解析

胃の痛覚に対する CRF1, 2 拮抗薬(-helical CRF)、CRF1 拮抗薬(Antaralmin)、CRF2 拮抗薬(Astressin 2B)の効果調べる。

#### (2)-2 胃の組織における CRF 関連ペプチドと受容体の発現解析

胃の組織では CRF, UCN1, 2 が消化管神経叢に、CRF1, 2 は消化管神経叢や粘膜上皮に発現しているとの報告がある(Porcher et al., 2006; Yuan et al., 2012)。CRF1, 2 は、結腸ではセロトニンを含む腸管の内分泌細胞や肥満細胞などの免疫細胞に発現しているとの報告もある。またピロリ菌による胃炎患者では、胃粘膜での UCN の発現が増強しているとの報告もある(Chatzaki et al., 2003)。

本研究では、CRF 及び UCN1, 2 と受容体 CRF1, 2 の胃の組織での発現が、ストレスによって変化するか免疫組織学的に調べる。

(3) ストレスによる胃の痛覚亢進に関わる分子の解析

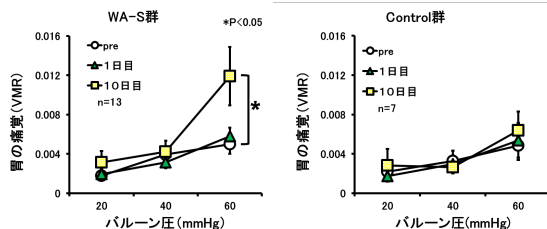
(3)-1. 神経成長因子 NGF の関与  
胃潰瘍では、胃粘膜に NGF 陽性細胞が発現し、胃の痛覚の亢進に関与していることを我々は報告している (Bielefeldt, Ozaki, Gebhart, 2003)。ストレスによる胃の痛覚の亢進に NGF が関与しているか調べるため、NGF に対する中和抗体の効果や、胃粘膜での NGF の発現を調べる。

(3)-2. IL-6 の関与  
CRF2 がストレスによる胃の痛覚の亢進をもたらすメカニズムとして IL-6 の関与を調べるため、ストレスによって亢進した胃の痛覚への IL-6 中和抗体の効果調べた。

#### 4. 研究成果

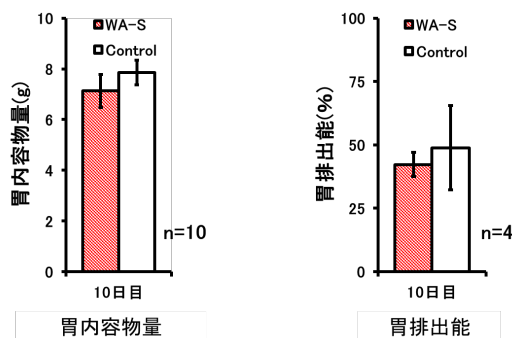
(1)-1. ストレスによる胃の痛覚の経時的変化

WAS を 10 日間加えると胃の痛覚が亢進したが、一日では変化が見られず、痛覚亢進にはストレスの反復が関与することがわかった。



(1)-2. 胃の排出能

WAS を加えたあとの胃の残渣量についても、アンバーライトペレットを経口投与し、胃に滞留した量についても、対照群と違いが見られず、本ストレスモデルでは胃排出能の遅延は見られなかった。

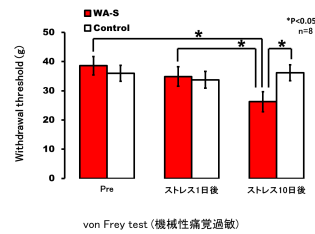


(1)-3. 胃壁の病変の有無の肉眼的・組織学的検索

WAS を 10 日間反復しても、WAS を一日行っても、粘膜には肉眼的にも組織学的にも変化は見られなかった。

(1)-4. 体性痛の変化

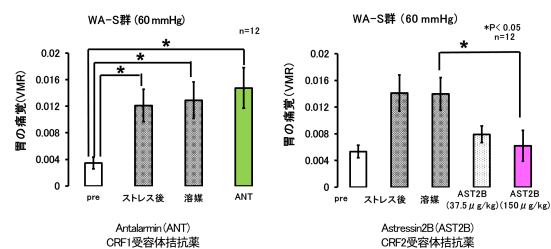
WAS 後、足底の機械性痛覚の亢進が見られた。



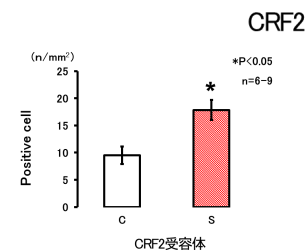
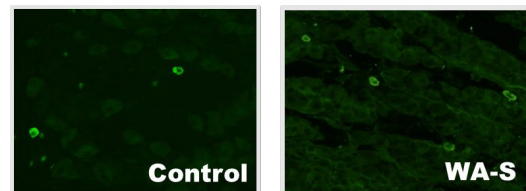
(2) ストレスによる胃の痛覚過敏における CRF の関与の解析

(2)-1 行動薬理的解析

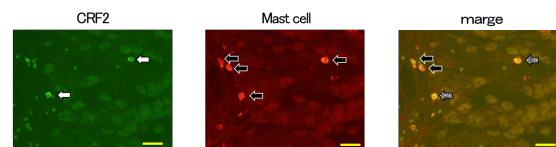
胃の痛覚に対する CRF 拮抗薬 (-helical CRF)、CRF1 拮抗薬 (Antalarmin)、CRF2 拮抗薬 (Astressin 2B) の効果を調べた。CRF1 拮抗薬は胃の痛覚に変化を起さなかったが、CRF2 拮抗薬はストレスによって亢進した痛覚を抑制した。



(2)-2 胃の組織における CRF 関連ペプチドと受容体の発現解析



胃粘膜に CRF、UCN1、UCN2 陽性細胞が見られたが、WAS で変化はみられなかった。胃粘膜には、CRF2 陽性細胞が見られ、WAS で陽性細胞数が増加した。



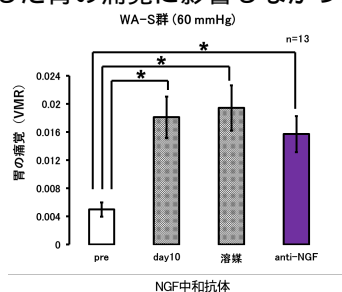
また、CRF2 は一部の肥満細胞に発現していた。

(3) ストレスによる胃の痛覚亢進に関わる分子の解析

(3)-1. 神経成長因子 (NGF) の関与

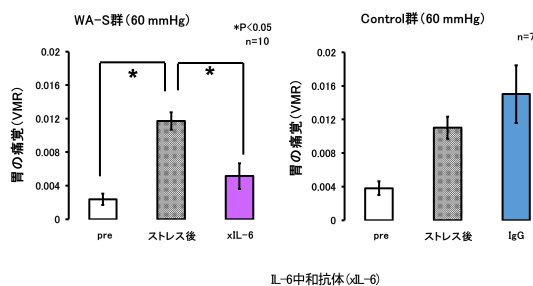
CRF2 の活性化が直接、知覚神経の興奮性に関与する報告は無い。結腸では CRF1 の活性化が肥満細胞よりヒスタミン、PGE2、NGF を分泌し、知覚神経を感作することが報告されている。ストレスによる胃の痛覚の亢進に NGF

が関与しているか、調べるために NGF の中和抗体の効果を調べた。NGF 中和抗体は、亢進した胃の痛覚に影響しなかった。



### (3)-2. IL-6 の関与

CRF2 の活性化が大動脈平滑筋では IL-6 の発現と分泌を促すとの報告があるので、IL-6 の中和抗体の効果を調べた。IL-6 中和抗体はストレスによる胃の痛覚の亢進を抑制した。



### (4) 考察

#### (4)-1. 機能性胃腸症モデルの開発

WAS を 10 日間反復すると、胃粘膜に明らかな病変は見られないにもかかわらず、胃の痛覚を亢進させ、機能性胃腸症のモデルとして有用である。

(4)-2. 胃の痛覚過敏における CRF2 の関与  
本モデルの胃の痛覚の亢進は、CRF2 拮抗薬で抑制された。胃粘膜においては、CRF2 のリガンドである CRF、Ucn1、Ucn2 が発現し、ストレスで変化は見られなかったが、CRF2 の発現は亢進し、一部は肥満細胞に発現していた。ストレスでは、肥満細胞などで CRF2 の発現が亢進し、その活性化によって肥満細胞などから、知覚神経を感作する因子が分泌され、胃粘膜の知覚神経を感作し、胃の痛覚が亢進すると考えられた。

(4)-3. 胃の痛覚過敏における IL-6 の関与  
CRF2 の活性化によって、肥満細胞などから分泌され胃の知覚神経を感作するメディエーターとして、IL-6 を検討した。IL-6 の中和抗体はストレスによる胃の痛覚の亢進を抑制した。ストレスでは、胃粘膜で発現が亢進した CRF2 の活性化によって、肥満細胞などから分泌された IL-6 などメディエーターを介して、胃の知覚神経の感作が起こり、胃の痛覚過敏が起こると考えられた。機能性胃腸症における胃の痛覚過敏のメカニズムとして、CRF2、IL-6 の関与が示唆され、治療の標的として重要と考えられた。

### 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 8 件)

In Vivo Interaction of Morphine and Diclofenac. Kimura Y, Muryoi K, Shibata M, Ozaki N, Arai K., Pharmacology & Pharmacy 7(12):493-503, 2016, 査読有、DOI: 10.4236/pp.2016.712055

Atrophy of submandibular gland by the duct ligation and a blockade of SP receptor in rats. Hishida S, Ozaki N, Honda T, Shigetomi T, Ueda M, Hibi H, Sugiura Y Nagoya J Med Sci., 78(2):215-227, 2016、査読有、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885821/pdf/2186-3326-78-0215.pdf>

Effects of interfascial injection of bicarbonated Ringer's solution, physiological saline and local anesthetic under ultrasonography for myofascial pain syndrome. -two prospective, randomized, double-blinded trials- Kobayashi T, Kimura H, Ozaki N 金沢大学十全医学会雑誌 125(2):40-49, 2016、査読有、<http://hdl.handle.net/2297/46102>

Innervation of extrahepatic biliary tract, with special reference to the direct bidirectional neural connections of the gallbladder, sphincter of Oddi and duodenum in Suncus murinus, in whole-mount immunohistochemical study Yi S-Q, Ren K, Kinoshita M, Takano N, Itoh M, Ozaki N, Anatomia, Histologia, Embryologia, 45(3):184-188, 2016、査読有、DOI:10.1111/ahc.12186.

内臓痛覚と自律神経系 尾崎紀之 Clinical Neuroscience, 32(12):1360-1362, 2014、査読無、<http://www.chugaiigaku.jp/item/detail.php?id=1617>

Involvement of Glial Activation in Trigeminal Ganglion in a Rat Model of Lower Gingival Cancer Pain. Hironaka K, Ozaki N, Hattori H, Nagamine K, Nakashima H, Ueda M, Sugiura Y Nagoya Journal of Medical Science, 76(3/4):323-332, 2014、査読有、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4345692/pdf/2186-3326-76-323.pdf>

Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016) Ueno T, Endo K, Hori K, Ozaki N, Tsuji A, Kondo S, Wakisaka N, Murono S, Kataoka K, Kato Y, Yoshizaki T., International Journal of Nanomedicine, 9:3005-3012, 2014、査読有、DOI:10.2147/IJN.S60564

Repeated intramuscular injections of nerve growth factor induced progressive muscle hyperalgesia, facilitated temporal summation and expanded pain areas

Hayashia K, Shiozawa S, Ozaki N, Mizumura M, Graven-Nielsen T., PAIN, 154(11): 2344-52, 2013、査読有、DOI:10.1016/j.pain.2013.07.007

〔学会発表〕(計 7 件)

肥満細胞に発現する CRF2 はストレス性機能性胃腸症の胃痛覚過敏に関与する、小酒井友、尾崎紀之、他、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年 2 月 28 日-30 日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

ストレス性機能性胃腸症の胃痛覚過敏に肥満細胞に発現する CRF2 が関与する、小酒井友、尾崎紀之、他、生理学研究所研究会「痛みの理解を目指した先端的アプローチ」、2017 年 1 月 30 日、自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Involvement of type 2 CRF receptor in animal models of stress-induced Functional Dyspepsia. Kozakai Y, Ozaki N, et al., program #PT0429, 16th World Congress on Pain, 2016/09/27, Yokohama, Kanagawa

教育講演：痛みを理解するための解剖、尾崎紀之、第 67 回日本良導絡自律神経学会学術大会、平成 27 年 10 月 10 日-11 日、京都医療専門学校第二校舎

ストレス誘発性機能性胃腸症モデルにおける CRF2 受容体及び Urocortin の関与、小酒井友、尾崎紀之、他、第 37 回日本疼痛学会、平成 27 年 7 月 3 日-4 日、熊本市市民会館 崇城大学ホール(熊本県熊本市)

ストレス誘発性機能性胃腸症モデルにおける CRF 受容体及び Urocortin の関与、小酒井友、尾崎紀之、他、第 73 回日本解剖学会中部支部学術集会、平成 25 年 10 月 5 日-10 月 6 日、山梨大学甲府キャンパス、山梨県甲府市

ストレス誘発性機能性胃腸症モデルにおける CRF2 受容体の関与。小酒井友、尾崎紀之、他、第 35 回日本疼痛学会、平成 25 年 7 月 12 日-13 日、大宮ソニックシティ、埼玉県さいたま市

〔図書〕(計 4 件)

【最新の治療から導き出す】痛みのメカニズムとこれからの治療薬・治療法の開発、第 2 章痛み・しびれ治療薬開発に向けた適切な動物モデル動物の作成と薬効評価、第 5 節筋・筋膜性疼痛症候群、pp38-44、株式会社技術情報協会、2015、林功栄、尾崎紀之

痛みの Science & Practice, 第 5 巻, 痛み診療キーポイント、特集編集:川真田樹人、C 線維と A 線維 (IB4 と CGRP を含む) p33、文光堂、2014、尾崎紀之

痛みの Science & Practice, 第 5 巻, 痛み診療キーポイント、特集編集:川真田樹人、サブスタンス P、p30、文光堂、2014、尾崎紀之

痛みの Science & Practice, 第 2 巻, 痛み

の薬物治療、特集編集:山本達郎, p8-17、鎮痛薬の作用を理解するための解剖、文光堂痛みの Science & Practice シリーズ第 3 巻痛みの薬物治療、2013、尾崎紀之

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kanazawa-u.ac.jp/lab/cat7-05.html>

<http://anatomy-2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 紀之 (OZAKI, Noriyuki)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授  
研究者番号：40244371

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

堀 紀代美 (HORI, Kiyomi)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・助教  
研究者番号：40595443

(4)研究協力者

なし