

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460939

研究課題名(和文) ディスぺプシア症状発現における十二指腸上皮細胞間接着装置とIL-33に関する検討

研究課題名(英文) Duodenal epithelial intercellular junction and IL-33 on the development of dyspepsia

研究代表者

大島 忠之 (OSHIMA, TADAYUKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00381814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 十二指腸粘膜上皮にはCLDN1, 2, 3, 4, 7, 8, 15, 18, JAM-A, Nectin-1, -3, ZO-1, -3の発現を認め、機能性ディスぺプシア患者では、CLDN8の発現低下が示唆された。

食道上皮細胞ではIFNgがIL-33発現を増加させ、IFNgと胆汁酸(DCA)の同時刺激でIL-33 mRNAはより増加した。IL-33の発現増加は、食道上皮基底層の核内でみられた。siRNAによるIL-33の発現抑制により、IFNgによるIL-8やIL-6の食道上皮からの放出増加が抑制された。すなわちIL-33が核内でIL-8やIL-6の産生あるいは放出に促進的に働いていた。

研究成果の概要(英文)： Duodenal epithelial cells expressed claudin (CLDN) 1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLDN8, CLDN15, CLDN18, JAM-A, Nectin-1, Nectin-3, ZO-1, and ZO-3. The expression of each protein was different in FD patients and CLDN8 seemed to decrease in FD patients.

In vitro, IFNg, but not TNF α or IL-1 β , significantly increased IL-33 mRNA compared with untreated cells. The combination of deoxycholic acid (DCA) and IFNg significantly up-regulated IL-33 mRNA compared with IFNg alone, and significantly induced more IL-8 and IL-6 compared with DCA or IFNg alone. DCA and IFNg-induced IL-33 precedes the up-regulation of IL-8 and IL-6. In order to investigate the function of nuclear up-regulated IL-33, the expression was suppressed with siRNA. IL-33 knockdown dampened IFNg-induced IL-8 and IL-6 production. These data suggest that nuclear IL-33 exaggerates the production of inflammatory cytokines.

研究分野：消化器内科

キーワード：機能性ディスぺプシア タイト結合 クロ-デイン 非びらん性胃食道逆流症 IL-33

1. 研究開始当初の背景

(1) ディスペプシア症状発現のメカニズムは、未だに明らかとなっておらず、生活の質が大きく低下することから患者の社会生産性は大きく低下する。さらに病態が明らかでないことからこの患者群の診療のために多大な医療費が費やされている。従って、機能性消化管障害の病態を明らかにし、新たな治療ストラテジーを確立することは急務である。

(2) これまでの検討でディスペプシア症状発現に胃酸、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)感染、食事、胃適応性弛緩不全、胃排出能障害および知覚過敏の関与が指摘されている。また一部のディスペプシア症状発現に先行感染が関与していることが報告されており、感染後機能性ディスペプシア(FD)として注目されている。感染後FDでは、十二指腸粘膜に好酸球を主体とする炎症細胞浸潤が認められ、CD68陽性細胞の増加が指摘されている(Am J Gastroenterol 2010)。しかし、この炎症細胞性浸潤と症状発現との関係や十二指腸粘膜のバリア機能との関係は全く明らかとなっていない。症状は常にあるわけではなく消化管の管腔側からの刺激によって症状は発現することから常に消化管粘膜のバリア機能を維持し、生体を防御しておくことは重要であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、未だ不明な点の多いディスペプシア症状発現に対して、食道および十二指腸粘膜上皮のバリア機能変化と免疫応答のかかわりを検討することを目的とする。特に食道と十二指腸上皮バリア機能に着目し、症状発現とタイトジャンクション蛋白発現の関係を検討する。

(2) 免疫応答に関わる上皮のIL-33のディスペプシア症状発現にかかわる役割について検討し、バリア機能制御による治療応用の可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 内視鏡下生検組織を用いて食道および十二指腸上皮細胞間接着装置蛋白(カドヘリン、クローディン、コネキシン)の発現と局在を蛋白レベル、遺伝子レベルで検討する。およびsiRNAによるノックダウンをすることでそれぞれのクローディンの機能解析を行う。

(2) 食道および十二指腸バリア機能変化と十二指腸粘膜上皮に発現するIL-33の発現と放出機構を検討する。

(3) *in vitro* では、ヒト正常食道上皮細胞(HEECs)を用いて、三次元食道上皮培養層モデルを構築し、種々のサイトカイン(IFN γ ,

TNF α , IL-1 β)および胆汁酸(デオキシコール酸(DCA))の刺激後にIL-33発現をreal time RT-PCR, western blotting, 蛍光免疫染色にて検討する。IL-33 siRNAを用いてIL-33発現を制御した後にIFN γ による食道上皮からのIL-8放出をELISAで検討する。

4. 研究成果

(1) 十二指腸粘膜上皮にはCLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLDN8, CLDN15, CLDN18, JAM-A, Nectin-1, Nectin-3, ZO-1, ZO-3の発現を認め、それぞれの発現は、FD患者での発現パターンが異なることが明らかとなった。CLDN8の発現低下が示唆された。FD患者における十二指腸粘膜は肉眼的に正常であり、内視鏡的な観察のみでは困難である微細な変化をとらえていると考えられる。

(2) FD患者では好酸球と肥満細胞浸潤が増加していたが、*H. pylori*感染との関連は明らかでなかった。

(3) ディスペプシア症状の一つである胸やけを訴える非びらん性胃食道逆流症(NERD)患者の食道粘膜において、IL-33 mRNAの発現が増加し(図1)、その蛋白は食道扁平上皮層の基底側の細胞層で核内に認めることが明らかとなった(図2)。またIL-8などの炎症性サイトカインとの相関が明らかとなった。

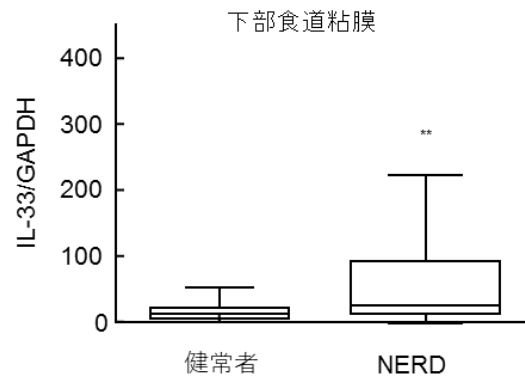


図1. 食道粘膜におけるIL-33 mRNA発現。 ** $P < 0.01$ 。

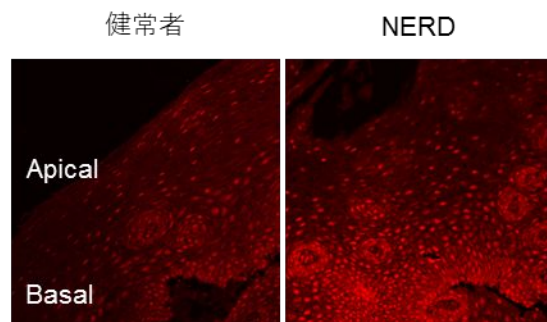


図2. 食道扁平上皮粘膜層におけるIL-33発現。

(4) FD患者の十二指腸粘膜におけるIL-33の発現は、健常者と同等であった。

(5) *in vitro*の検討では、IFN γ がIL-33のmRNA、蛋白発現を増加させたが、TNF α 、IL-1 β は変化させなかった。IFN γ と胆汁酸(DCA)の同時刺激ではIL-33 mRNAレベルはより高くなった(図3)。またこのIL-33の発現はIL-8やIL-6の増加より早期にみられた。このIL-33の発現増加は、食道上皮基底層の核内でみられ、食道上皮層からの放出は確認されなかった。IL-33の細胞内における機能を確認するためにIL-33 siRNAでその発現を抑制すると、IFN γ によるIL-8やIL-6の食道上皮からの放出増加が抑制された。すなわちIL-33が核内でIL-8やIL-6の産生あるいは放出に促進的に働いていると考えられた。

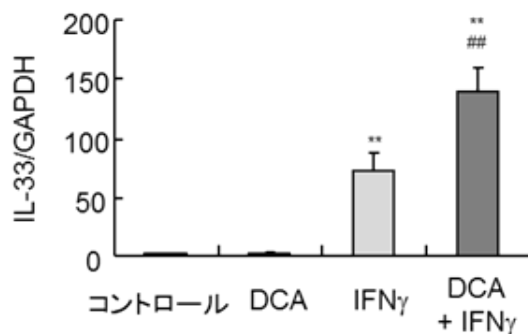


図3. 食道上皮におけるIL-33 mRNA発現。 ** $P < 0.01$ vs. Control, ## $P < 0.01$ vs. IFN γ .

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)

Sei H, Oshima T, Shan J, Wu L, Yamasaki T, Okugawa T, Kondo T, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Esophageal Epithelial-Derived IL-33 Is Upregulated in Patients with Heartburn. *PLoS One*. 査読有, 2016 Apr 25;11(4):e0154234. doi: 10.1371/journal.pone.0154234. eCollection 2016.

Kitayama Y, Fukui H, Hara K, Eda H, Kodani M, Yang M, Sun C, Yamagishi H, Tomita T, Oshima T, Watari J, Takasawa S, Miwa H. Role of regenerating gene 1 in claudin expression and barrier function in the small intestine. *Transl Res*. 査読有, 2016 Mar 19. pii: S1931-5244(16)00099-2. doi: 10.1016/j.trsl.2016.03.007.

Shan J, Oshima T, Wu L, Fukui H, Watari J, Miwa H. Interferon γ -Induced Nuclear Interleukin-33 Potentiates the Release of Esophageal Epithelial

Derived Cytokines. *PLoS One*. 査読有, 2016 Mar 17;11(3):e0151701. doi: 10.1371/journal.pone.0151701.

Wu L, Oshima T, Tomita T, Ohda Y, Fukui H, Watari J, Miwa H. Serotonin disrupts esophageal mucosal integrity: an investigation using a stratified squamous epithelial model. *J Gastroenterol*. 査読有, 2016 Mar 16. [Epub ahead of print]

Wu L, Oshima T, Shan J, Sei H, Tomita T, Ohda Y, Fukui H, Watari J, Miwa H. PAR-2 activation enhances weak acid-induced ATP release through TRPV1 and ASICs sensitization in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 査読有, 2015 Oct 15;309(8):G695-702. doi: 10.1152/ajpgi.00162.2015.

Shan J, Oshima T, Muto T, Yasuda K, Fukui H, Watari J, Nakanishi K, Miwa H. Epithelial-derived nuclear IL-33 aggravates inflammation in the pathogenesis of reflux esophagitis. *J Gastroenterol*. 査読有, 2015 Apr;50(4):414-23. doi: 10.1007/s00535-014-0988-1.

大島忠之, 三輪洋人. プライマリケアでの機能性ディスぺプシアの診断(Q&A). *日本医事新報* (0385-9215)4602号 Page52-53(2012.07)

[学会発表](計12件)

大島忠之, 清裕生, 三輪洋人. 胃食道逆流症における食道上皮細胞内IL-33の役割. 第102回日本消化器病学会総会(ワークショップ4 W4-6)(2016.4.23. 京王プラザホテル, 東京)

Miwa H. Current Issues in Functional Dyspepsia. (The 6th Asian Postgraduate Course on Neurogastroenterology & Motility. 4. 1. 2016. Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea)

大島忠之, ウリピン, 清裕生, 近藤隆, 三輪洋人. 酸関連・非酸関連上腹部症状発現のメカニズム. 合同学術集会2015 第17回日本神経消化器病学会(スポンサーシンポジウム4)(2015.11.13. 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄)

大島忠之, 単晶, ウリピン, 清裕生, 原謙, 小川智広, 山崎尊久, 奥川卓也, 河野友彰, 近藤隆, 池原久朝, 上山茂充, 谷口友佳子, 富田寿彦, 應田義雄, 福井広一, 渡二郎, 三輪洋人. 食道上皮細胞内のIL-33は胃食道逆流症の増悪に関与する. 合同学術集会2015 第17回日本神経消化器病学会(OP2-1)(2015.11.12. 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄)

清裕生, 大島忠之, ウリピン, 原謙,

小川智広, 山崎尊久, 奥川卓也, 近藤 隆, 河野友彰, 戸澤勝之, 池原久朝, 谷口友佳子, 上山茂充, 富田寿彦, 應田義雄, 福井広一, 渡 二郎, 三輪洋人. 機能性ディスぺプシアにおける十二指腸粘膜の炎症細胞浸潤. 合同学術集会 2015 第 17 回日本神経消化器病学会 (OP13-1) (2015.11.12. 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄)

大島忠之, 三輪洋人. ストレスと機能性消化管障害. 第 62 回日本職業・災害医学会(シンポジウム 13 S13-1) 2014.11.17. 神戸国際会議場, 神戸)

清 裕生, 大島忠之, L. Wu, 山崎尊久, 近藤 隆, 河野友彰, 豊島史彦, 戸澤勝之, 池原久朝, 富田寿彦, 應田義雄, 福井広一, 渡 二郎, 三輪洋人. 非びらん性食道胃逆流症における IL-33 の発現と炎症性サイトカインの産生に関する検討. 第 57 回日本消化器病学会大会 (JDDW 2015)(消 P-10)(2015.10.8. グランドプリンス新高輪, 東京)

Wu L, Oshima T, Shan J, Sei H, Ogawa T, Kono T, Toyoshima F, Tozawa K, Ikehara H, Ohda Y, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. PAR-2 activation enhances acid-induced ATP release through TRPV1 and ASICs sensitization in human esophageal epithelial cells. (AGA Research Forum: GERD pathogenesis #504 154 - WCC) (Digestive Disease Week 2015. 5. 18. 2015. Washington, DC. USA)

Sei H, Oshima T, Shan J, Wu L, Kondo T, Kono T, Toyoshima F, Tozawa K, Ikehara H, Ohda Y, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Upregulation and the regulation of esophageal epithelial-derived IL-33 in non-erosive reflux disease. Mo1923 (Digestive Disease Week 2015. 5. 18. 2015. Washington, DC. USA)

Wu L, Oshima T, Shan J, Sei H, Ogawa T, Kono T, Toyoshima F, Tozawa K, Ikehara H, Ohda Y, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. TRPV1 and ASICs exacerbate acid-induced ATP release through PAR-2 activation. (IT-P-04) (The 3rd JSGE International Topic Conference. 4. 25. 2015. Sendai, Miyagi)

大島忠之, 単 晶, 三輪洋人. 機能性ディスぺプシアにおける十二指腸粘膜防御機構障害. 第 88 回日本消化器内視鏡学会総会 (JDDW 2014)(ワークショップ 4 内 W4-7)(2014.10.24. 神戸国際展示場, 神戸)

Sei H, Oshima T, Shan J, Kamiya N, Wu L, Taki M, Nando Y, Yamasaki T, Toyoshima F, Sakurai J, Ikehara H, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Esophageal epithelial-derived

intracellular IL-33 exaggerates inflammation in the pathogenesis of reflux esophagitis. (P1.05 Gastro-Esophageal Reflux Disease, P1.05.03) (14th World Congress of the International Society for Disease of the Esophagus 2014. 9. 23. 2014. The Westin Bayshore, Vancouver, Canada)

〔図書〕(計 3 件)

大島忠之, 三輪洋人. IV. FD の治療. 日本のガイドラインからみた FD の一般的な推奨治療とは? 機能性ディスぺプシア. 日本人に適した診療を求めて(荒川哲男 監修, 富永和作 編集) 107-113 (総頁 158) A5, フジメディカル出版, 大阪. 2014 年 11 月 1 日発行

大島忠之, 三輪洋人. 胃・十二指腸の知覚機構. 専門医のための消化器病学 第 2 版(小俣政男, 千葉 勉 監修, 下瀬川 徹, 渡辺 守, 木下芳一, 金子周一, 櫻田博史 編集) 77-79 (総頁 686) B5, 医学書院, 東京. 2013 年 10 月 15 日発行
大島忠之, 富田寿彦, 福井広一, 渡 二郎, 三輪洋人. 第 4 章 機能性胸やけ 管理・治療. 最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 77 機能性食道疾患 -GERD と機能性食道障害- (木下芳一 編集) 146-153 (総頁 215) B5, 最新医学社, 東京. 2013 年 2 月 25 日発行

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 忠之 (OSHIMA, TADAYUKI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00381814

(2) 研究分担者

福井 広一 (FUKUI, HIROKAZU)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60378742
三輪 洋人 (MIWA, HIROTO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80190833