

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09297

研究課題名(和文) 機能性消化管疾患における生体粘膜上皮バリア機能評価法の開発とその応用

研究課題名(英文) The development and application of in vivo evaluation of mucosal barrier function in functional gastrointestinal disorders

研究代表者

大島 忠之 (OSHIMA, Tadayuki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00381814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：機能性消化管障害の患者および対照者において消化管粘膜バリア機能を評価するために内視鏡下にカテーテルを挿入し、粘膜に直接プローブを接触させてアドミタンスを測定した。食道のアドミタンスは、胃や十二指腸に比べて低値であり、バリア機能が高いことが明らかとなった。食道では、CLDN1とCLDN4が重要であるが、それらの蛋白発現量のみではバリア機能を示すことが出来ないことが明らかとなり、顆粒層にみられる点状、ひげ状に染色されるCLDNの発現がバリア機能に重要であると考えられた。また機能性ディスぺプシア(FD)では、十二指腸下行脚の粘膜内に肥満細胞と好酸球の浸潤が多いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管は粘膜上皮によって体内と体外を分け、体内への異物侵入を制御する重要な機能を担っているが、種々の疾患でこのバリア機能が障害される病態が指摘されている。しかし、このバリア機能異常を客観的に評価する方法は限られ、簡便な検査法の開発が望まれている。本研究では、その簡便な検査法として内視鏡下にプローブを挿入することで消化管粘膜のバリア機能を評価する手法の確立を目指した。消化管の各臓器で生理的な粘膜バリア機能が異なることが明らかとなり、種々の病態でこのバリア機能の障害があることが明らかとなった。今後この測定法が、多くの病態における消化管機能検査として有用な新たな検査法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To assess gastrointestinal barrier function in functional gastrointestinal disorders and controls, the probe that can measure admittance was inserted through the working channel of upper gastroduodenal endoscopy. The probe was attached to the mucosa and admittance was measured. Esophageal admittance was lower than gastric or duodenal admittance, indicating the mucosal barrier function is higher in esophagus compared to stomach or duodenum. Claudin 1 and claudin 4 were important for the mucosal barrier function of esophageal, but the amount of the expression did not mean the barrier function, and claudins stained as dots and whisker like lines in the granular layers were important for the barrier function. Infiltration of duodenal mucosal mast cells and eosinophils were more at the second portion of duodenum in FD patients compared to controls.

研究分野：消化器内科

キーワード：機能性消化管疾患 細胞間接着装置 タイト結合 クローディン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肉眼的に粘膜傷害のない非びらん性胃食道逆流症あるいは機能性消化管疾患である機能性胸やけ、機能性ディスペプシア、過敏性腸症候群などの病態は依然として明らかでなく、通常の検査では、粘膜に異常を指摘できず、器質的疾患を指摘できない。そのため診断や治療法が確立しておらず、多大な時間と医療費が費やされている。これら疾患の病態を明らかにするとともに、簡便な検査法で新たな診断体系や治療評価系を確立することが出来れば大変有用である。

近年の研究により、これら食道疾患や機能性消化管疾患において粘膜上皮バリア機能あるいは透過性が、変化していることが明らかとなってきた。これまで非びらん性胃食道逆流症や機能性胸やけの診断や鑑別は、24時間インピーダンス・pHモニタリングによりなされているが、本法は経鼻的にチューブを24時間留置する必要があるため、検査日に症状がない場合には偽陰性の診断を得てしまう侵襲的な検査法である。近年、この24時間インピーダンス・pHモニタリングを施行したときに計測できる基線インピーダンスが粘膜傷害のある群では低下していることが明らかとなっている。これは、肉眼的には指摘できない粘膜透過性の変化があることが示されており、胃食道逆流の存在を示す指標となる可能性がある。

更に最近、欧米では内視鏡下に局所粘膜のインピーダンスを測定できるカテーテルが開発され、食道粘膜のバリア機能及び粘膜透過性を簡便に評価することができる可能性が指摘されている。このような評価法は、内視鏡下に短時間でこなすことが可能であり有用な検査法となりうるが実用化はされていない。またこのインピーダンスの測定は、細胞表面層のみの変化を検出しているとの指摘もあり、問題点もある。本邦ではこの問題点を改善すべく上皮細胞層の低周波電流のサセプタンスおよび高周波電流のアドミタンスを測定する機器の開発がすすめられている。サセプタンスとアドミタンスの測定は、電流の流れやすさを数値で示すことが可能で、理論的にはインピーダンスの逆数で表される数値である。このアドミタンスは内視鏡下にカテーテルを挿入することで簡便に測定することが可能である。

2. 研究の目的

肉眼的には粘膜傷害を認めない非びらん性胃食道逆流症や機能性消化管疾患の症状発現にかかわる消化管粘膜上皮のバリア機能変化を簡便に客観的に内視鏡検査時に生体で評価する方法を開発することを目的とする。特に食道、小腸、大腸の粘膜上皮バリア機能と透過性に注目し、胃食道逆流症状発現が器質的疾患によるものであるか、逆流が関与しないものであるか、あるいは腹部症状のある患者において十二指腸粘膜上皮のバリア機能に異常があるのかを生体粘膜上皮のアドミタンスを測定することで簡便に評価する方法を考案する。各病態指標との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1)プローブ法によるアドミタンスの測定値と粘膜電気抵抗の相関を独自に開発した *in vitro* ヒト正常食道粘膜上皮層培養系 (Am J Physiol Cell Physiol. 2011, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011, Lab Invest. 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012) を用いて *in vitro* で検討する。

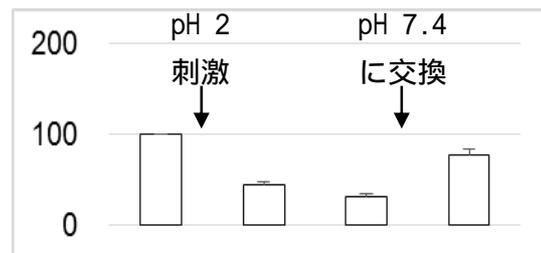
(2)機能性消化管障害の患者および対照者において消化管粘膜バリア機能の評価するために内視鏡下にカテーテルを挿入し、粘膜に直接プローブを接触させてアドミタンスを測定する。食道では、粘膜傷害程度に周在性があることから、4方向での測定を行いその違いの有無を検討する。

(3)胃食道逆流の評価にはスレウス Zephr (コンフォートック MI pH シングルカテーテル, Sandhill Scientific, Inc. USA) を用いて24時間インピーダンス・pHモニタリングを行い、各物理的性状・酸度ごとの下部食道括約部 (LES) 上縁から5cmに達する逆流数と酸逆流時間 (%time pH < 4) を測定する。

(4)食道及び十二指腸上皮生検組織を用いて粘膜バリア機能にかかわるタイト結合蛋白、特にクローディン (CLDN) などの mRNA 発現量を real-time PCR で定量的に検討する。共焦点レーザー顕微鏡でそれぞれの蛋白の細胞膜での局在の違いを検討する。

4. 研究成果

(A) pH 2 刺激による電気抵抗 (% Control) の変化と上皮機能回復能



(B) pH 2 刺激によるアドミタンスの変化と上皮機能回復能

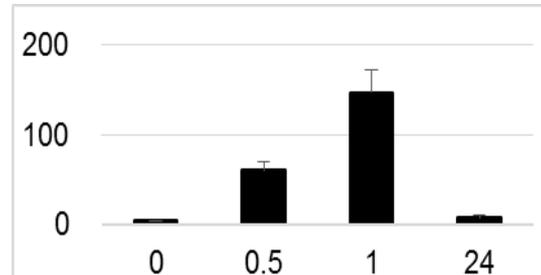


図. 電気抵抗とアドミタンスが逆相関。酸刺激により上昇したアドミタンスは中性液 (pH 7.4) に戻すことで元値に復した。

食道上皮細胞層を酸で刺激し，粘膜電気抵抗の変化を観察すると共にプローブ法によるアドミタンスの測定値を測定し，アドミタンス値と電気抵抗値が逆相関を示し，アドミタンスの測定が粘膜のバリア機能を反映していることが明らかとなった（図）。

食道粘膜上皮層では，CLDN1 および CLDN4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった．一方，これら CLDN の発現パターンが食道粘膜上皮層内で異なり，粘膜層の基底層側にはバリア機能がないことが明らかとなった．このことから，CLDN1 および CLDN4 の蛋白発現そのもののみでは，バリア機能が存在するかどうかを示すことが出来ないことが明らかとなり，顆粒層側にみられる点状，ひげ状に染色される CLDN がバリア機能に重要である可能性が考えられた．

十二指腸粘膜では，CLDN3 およびオクルディンの発現が頂端部細胞膜上にみられる一方で CLDN4 の発現は細胞間側面に主に発現がみられることが明らかとなった．

機能性ディスぺプシア患者では，十二指腸下行脚の粘膜において肥満細胞および好酸球の浸潤が多いことが明らかとなった．一方，CLDN の十二指腸での発現は，機能性ディスぺプシアで CLDN3 mRNA の発現増加がみられたが，蛋白レベルでの違いを明らかにすることはできなかった．

食道のアドミタンスは，胃や十二指腸に比べて低値であり，食道粘膜バリア機能が消化管の中では相対的に高いことが明らかとなった．各種病態と 24 時間インピーダンス・pH モニタリングの関連は，ばらつきがあり，さらなる検討が必要である．

<引用文献>

- Oshima T, Gedda K, Koseki J, Chen X, Husmark J, Watari J, Miwa H, Pierrou S. Establishment of esophageal like non-keratinized stratified epithelium using normal human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(6):C1422-9. DOI: 10.1152/ajpcell.00376.2010.
- Chen X, Oshima T, Tomita T, Fukui H, Watari J, Matsumoto T, Miwa H. Acidic bile salts modulate the squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(2):G203-9. DOI: 10.1152/ajpgi.00454.2011.
- Oshima T, Koseki J, Chen X, Matsumoto T, Miwa H. Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. *Lab Invest*. 2012;92(1):22-31. DOI: 10.1038/labinvest.2011.139.
- Chen X, Oshima T, Shan J, Fukui H, Watari J, Miwa H. Bile salts disrupt human esophageal squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(2):G199-208. DOI: 10.1152/ajpgi.00454.2011.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

- Miwa H, Oshima T, Tomita T, Fukui H, Kondo T, Yamasaki T, Watari J. Recent understanding of the pathophysiology of functional dyspepsia: role of the duodenum as the pathogenic center. *J Gastroenterol*. 査読有, 2019;54(4):305-311. Review. DOI: 10.1007/s00535-019-01550-4.
- Taki M, Oshima T, Li M, Sei H, Tozawa K, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Duodenal low-grade inflammation and expression of tight junction proteins in functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil*. 査読有, 2019, e13576. DOI: 10.1111/nmo.13576.
- Horikawa T, Oshima T, Li M, Kitayama Y, Eda H, Nakamura K, Tamura A, Ogawa T, Yamasaki T, Okugawa T, Kondo T, Kono T, Tozawa K, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Chenodeoxycholic Acid Releases Proinflammatory Cytokines from Small Intestinal Epithelial Cells Through the Farnesoid X Receptor. *Digestion*. 査読有, 2019:1-9. DOI: 10.1159/000496687.
- Tomita T, Oshima T, Miwa H. New Approaches to Diagnosis and Treatment of Functional Dyspepsia. *Curr Gastroenterol Rep*. 査読有, 2018;20(12):55. DOI: 10.1007/s11894-018-0663-4.
- Oshima T, Miwa H. Functional Dyspepsia - A Revolution in Management. *Am J Gastroenterol*. 査読有, 2018;113(10):1420-1422. DOI: 10.1038/s41395-018-0264-8.
- Wu L, Oshima T, Li M, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Filaggrin and tight junction proteins are crucial for IL-13-mediated esophageal barrier dysfunction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 査読有, 2018;315(3):G341-G350. DOI: 10.1152/ajpgi.00404.2017.
- 大島忠之, 滝正登, 堀川知紀, 富田寿彦, 應田義雄, 福井広一, 渡二郎, 三輪洋人. 【腸管感染症-最新的话题を含めて】過敏性腸症候群と腸管感染症(解説/特集). *胃と腸*. 査

読無, 53 卷 4 号 Page474-476(2018.04)
大島忠之, 三輪洋人. 【GERD(胃食道逆流症)-病態と治療】 胃食道逆流症状の発現メカニズム(解説/特集). *BIO Clinica*. 査読無, 33 卷 4 号 Page310-314(2018.04)
大島忠之, 三輪洋人. 【機能性消化管障害の Up to date】 生活習慣と機能性消化管障害(解説/特集). *成人病と生活習慣病*. 査読無, 48 卷 2 号 Page149-154(2018.02)
大島忠之, 富田寿彦, 應田義雄, 福井広一, 渡二郎, 三輪洋人. 【GERD 診療 2018-現状と課題】 GERD の治療 内科治療(解説/特集). *臨床消化器内科*. 査読無, 33 卷 3 号 Page295-301(2018.02)
Isihimoto H, Oshima T, Sei H, Yamasaki T, Kondo T, Tozawa K, Tomita T, Ohda Y, Fukui H, Watari J, Miwa H. Claudin-2 expression is upregulated in the ileum of diarrhea predominant irritable bowel syndrome patients. *J Clin Biochem Nutr*. 査読有, 2017;60(2):146-150.
DOI: 10.3164/jcbrn.16-92
大島忠之, 三輪洋人. 【消化管機能障害と内視鏡】 [胃・十二指腸] FD の診断と治療(解説/特集). *消化器内視鏡*. 査読無, 29 卷 10 号 Page1832-1837(2017.10)
大島忠之, 三輪洋人. 食道疾患と粘膜バリア機能異常(解説). *兵庫医科大学医学雑誌*. 査読無, 42 卷 1 号 Page57-63(2017.09)
大島忠之, 三輪洋人. 【これ一冊でわかる 消化器 診断基準と分類法】 機能性疾患 機能性ディスぺプシア(解説/特集). *診断と治療*. 査読無, 105 卷 Suppl. Page253-258(2017.03)
大島忠之, 三輪洋人. 消化器疾患に対する心身医学的アプローチ 機能性胸やけとその治療(解説). *日本医事新報*. 査読無, 4846 号 Page50-55(2017.03)
Li J, Chen XL, Shaker A, Oshima T, Shan J, Miwa H, Feng C, Zhang J. Contribution of immunomodulators to gastroesophageal reflux disease and its complications: stromal cells, interleukin 4, and adiponectin. *Ann N Y Acad Sci*. 査読有, 2016;1380(1):183-194.
DOI: 10.1111/nyas.13157.
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;51(11):1040-1049.
DOI: 10.1007/s00535-016-1195-z
Oshima T, Miwa H. Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases. *J Gastroenterol*. 査読有, 2016;51(8):768-78. Review.
DOI: 10.1007/s00535-016-1207-z
Miwa H, Kondo T, Oshima T. Gastroesophageal reflux disease-related and functional heartburn: pathophysiology and treatment. *Curr Opin Gastroenterol*. 査読有, 2016;32(4):344-52.
DOI: 10.1097/MOG.0000000000000282.
大島忠之, 三輪洋人. 【臨床データからみた機能性消化管障害へのアプローチ】 機能性消化管障害と酸分泌(解説/特集). *日本消化器病学会雑誌*. 査読無, 113 卷 10 号 Page1682-1691(2016.10)

[学会発表](計 14 件)

Oshima T. Role of microbiota in FD. SESSION 6 Microbiota: Microbiota and Food in Relation with FGID. 6th Biennial Congress of the Asian Neurogastroenterology and Motility Association in conjunction with the 2nd KSNM Education Program and 30th Annual Conference of the Korean Society of Neurogastroenterology and Motility (招待講演) (4. 7. 2019. Seoul, Korea)
大島忠之, 滝正登, 清裕生, 堀川知紀, Li Min, 西井謙夫, 富田寿彦, 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微細炎症(Duodenal microinflammation in functional dyspepsia). 第 15 回日本消化管学会総会学術集会(シンポジウム 2) (2019.2.1. ホテルグランデはがくれ佐賀, 佐賀)
Oshima T. Epithelial barrier dysfunction and immunomodulation in eosinophilic esophagitis. The 7th Cross-strait Digestive Disease Forum (招待講演) (10. 29. 2018. Tianjin, China)
大島忠之. ストレスを考慮した機能性ディスぺプシア/胃食道逆流症合併患者の診療. 第 20 回日本神経消化器病学会(スポンサードシンポジウム 3)(2018.10.5. ウィンク愛知, 名古屋)
Oshima T, et al. Stress and impaired gastric accommodation in functional dyspepsia. Summer School on Stress (招待講演) (6. 24. 2018. Osaka, Japan)
Oshima T. Functional GI disorders and microbiota. Session III. Gastric microbial changes induced by drugs. The 2nd Seoul International Symposium on Helicobacter and Upper Gastrointestinal Diseases (2nd SI-HUG Symposium) & 26th Annual Meeting of the

Korean College of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research (招待講演) (4. 14. 2018. Seoul, Korea)

Oshima T. GI complications induced by drug. Session II. Special conditions in drug-induced GI injury. The 2nd Seoul International Symposium on Helicobacter and Upper Gastrointestinal Diseases (2nd SI-HUG Symposium) & 26th Annual Meeting of the Korean College of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research (招待講演) (4. 14. 2018. Seoul, Korea)

大島忠之, 三輪洋人. 好酸球性食道炎における食道粘膜バリア機能の破綻. 第45回日本潰瘍学会(シンポジウム1)(2017.11.20. ハイアットリージェンシー京都, 京都)

Taki M, Oshima T, Takimoto M, Nakamura K, Tamura A, Hara K, Kobayashi M, Okugawa T, Kono T, Tozawa K, Tomita T, Taniguchi Y, Ohda Y, Fukui H, Watari J, Miwa H. Duodenal low-grade inflammation and tight junction proteins in functional dyspepsia.

(Functional Dyspepsia: Bile Salts, Eosinophils and Novel Treatments, Research Forum S406a #778c) (Digestive Disease Week 2017. 5. 9. 2017. Chicago, Illinois, USA)

大島忠之, 滝正登, 三輪洋人. 機能性消化管疾患における微細炎症とタイト結合関連分子の発現. 第103回日本消化器病学会総会(シンポジウム2 S2-1)(2017.4.22. 京王プラザホテル, 東京)

Oshima T, Taki M, Wu L, Tomita T, Fukui H, Miwa H. The duodenum, a new target for research. (Sponsored Symposium 4: What 's new in functional dyspepsia: SS4-2) (5th Biennial Congress of the Asian Neurogastroenterology & Motility Association 19th Japanese Society of Neurogastroenterology. 3. 25. 2017. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan)

Oshima T, Wu L, Li M, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Investigation of esophageal epithelial function using 3D culture system. (Topic Symposium 3: Bench to animal model: TS3-2) (5th Biennial Congress of the Asian Neurogastroenterology & Motility Association 19th Japanese Society of Neurogastroenterology. 3. 24. 2017. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan)

大島忠之, 石本明香, 富田寿彦, 應田義雄, 福井広一, 渡二郎, 三輪洋人. 下痢型過敏性腸症候群における炎症細胞浸潤とタイト結合関連分子の発現. 合同学術集会2016 第18回日本神経消化器病学会(一般演題11-2 IBS(2))(2016.9.10. 北海道大学医学部学友会館フラテ, 札幌)

大島忠之, 三輪洋人. 知覚異常からみたGERDの病態と診断. 合同学術集会2016 第18回日本神経消化器病学会(スポンサードシンポジウム3)(2016.9.9. 北海道大学医学部学友会館フラテ, 札幌)

〔図書〕(計 1件)

Oshima T, Miwa H et al. Springer Nature, Functional dyspepsia, 2019, 187.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 三輪 洋人

ローマ字氏名:(MIWA, hirotō)

所属研究機関名: 兵庫医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 80190833

研究分担者氏名: 渡 二郎

ローマ字氏名:(WATARI, jiro)

所属研究機関名: 兵庫医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10311531

研究分担者氏名: 福井 広一

ローマ字氏名:(FUKUI, hirokazu)

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60378742

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。