

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09323

研究課題名(和文) 小腸を対象としたヒスタミンH2受容体の傷害制御

研究課題名(英文) Regulation of the injury via the histamine H2 receptor pathway in the small intestine

研究代表者

川島 麗 (KAWASHIMA, Rei)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：70392389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、小腸細胞傷害においてH2ブロッカーによる傷害緩和の効果を検討するものであった。放射線全身照射による小腸粘膜傷害モデルマウスにH2ブロッカーを投与すると、ムチンをはじめとする生体防御機構の改善と小腸組織内への赤血球浸潤を抑制することが明らかとなった。これより、ヒスタミン経路は、ムチン産生を亢進させることで消化管バリア機能を上昇させ、局所的な組織損傷を抑制することが示唆された。加えて、この結果は、H2ブロッカーには胃だけでなく小腸においても傷害治癒効果があることを証明したと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目指すところは、下部消化管傷害に対するH2拮抗薬の実用化である。通常の新薬開発では、使用許可が下りるまでの開発期間が十年以上を要する場合も少なくない。一方、既存薬は既に安全性が確認されており、目的の作用を追加確認すれば、他の疾患治療薬としての実用化(ドラッグリポジショニング)が可能であり、開発コストの削減にもつながる。そもそもH2ブロッカーは胃薬としての既存薬であるが、本研究により新たな薬効が明らかとなり、その体内動態が解明されれば、安全で早急な治療薬の提供が実現できると期待する。

研究成果の概要(英文)：This study was to examine the effect of H2 blocker on the damage of small intestinal cell damage. It was clarified that administration of H2 blocker to mouse model of small intestinal mucosa injury by whole body irradiation improved the body defense mechanism including mucin and suppressed infiltration of erythrocytes into small intestine tissue. These results suggest that the histamine pathway enhances gastrointestinal barrier function by enhancing mucin production and suppresses local tissue damage. In addition, this result can be said to prove that the H2 blocker has a wound healing effect not only in the stomach but also in the small intestine.

研究分野：消化器内科学

キーワード：小腸 ヒスタミン 粘膜傷害 消化管 H2ブロッカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒスタミン H2 受容体の学術論文としては圧倒的に胃酸分泌に関するもので占められ、小腸などの下部消化管での役割を示した報告は無いに等しい。もちろん胃での発現が最も強いことから作用ポテンシャルが高いことは言うまでもないが、消化管全層で発現が確認されている点や (Sander LE et al. *Gut*. 2006)、腸管粘膜免疫の観点からも、小腸のヒスタミン H2 受容体に着目する意義は高いと考えた。

2. 研究の目的

ヒスタミンは、マスト細胞から分泌され、花粉症などのアレルギー反応や血管拡張作用を持つ一方で、胃に対しては胃酸分泌作用を示すことから、ヒスタミン H2 受容体シグナルは、胃酸分泌がその主な作用として知られていた。我々研究グループは最近、H2 遮断薬が小腸組織傷害を緩和することを見出したことから、「小腸」におけるヒスタミン H2 受容体の役割を解明することを本課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 消化管粘膜傷害モデル動物の作製

8 週齢 BALB/c マウス (日本クレア) を対象とし、放射線照射装置は小動物用エクソ線照射装置 (日立メディコ MBR-1505R) を用いて、図 1 のようなスケジュールのもとに実験を行った。当初は照射線量を 3Gy に設定して実験を行ったが、傷害回復期の上皮バリア機能をより詳細に捉える為、より高線量の 5Gy および 7Gy を追加して検討を行った。

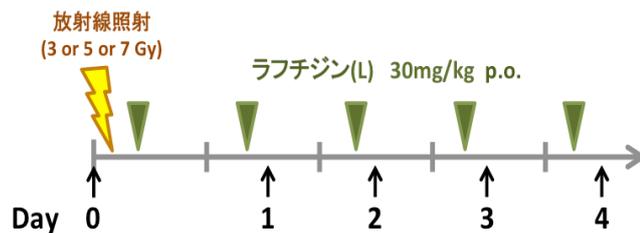


図 1 消化管粘膜傷害モデルとラフチジンの投与スケジュール

(2) 薬剤投与

放射線照射後、1 日 1 回、ラフチジン (30 mg/kg/day) を経口投与した (図 1)。

放射線照射群 (3Gy 群, 5Gy 群, 7Gy 群) および照射後に H2 ブロッカー (ラフチジン) を投与した群 (3Gy+L 群, 5Gy+L 群, 7Gy+L 群) を対照群 (C 群) と比較した。薬剤は 0.5% CMC (Sodium carboxymethylcellulose) に溶解し、経口ゾンデを用いて投与した。各群において放射線照射後一定期間経過後に犠牲死させた。実験期間中の体重をそれぞれ測定した。摘出した小腸は、肉眼所見を観察したのち、上部 (空腸) と下部 (回腸)、(一部大腸も採取) に分け、液体窒素により凍結して実験に使用するまで -80°C で保存、または、4%PFA/PBS により固定後、パラフィン包埋組織切片を作成した。

(3) 評価法

放射線照射およびラフチジン投与後の体重変動、血球算定および組織内赤血球浸潤、組織重量および総ムチン量の測定を行った。

4. 研究成果

1. 体重変化

図 2 は、各実験群における体重変化を比較したものである。コントロール群 (C 群) の体重変動率は、実験開始 4 日目には約 3% 程度増加したが、放射線照射群 (3Gy 群) はほぼ横ばいであった。ラフチジン投与群 (3Gy+L 群) は、3Gy 群と比べて 1% 程度増加した。これは、前年度に施行した実験と同様の結果となった。また、放射線照射群 (5Gy 群) および放射線照射群 (7Gy 群) は、C 群と比べて、それぞれ 94% および 89% となり、線量依存的に体重減少が見られた。一方、ラフチジン投与により、双方の線量群 (5Gy+L 群および 7Gy+L 群) においてそれぞれ放射線照射群の 3% および 5% の体重増加が認められ、放射線照射による体重減少が緩和された。これより、体重を指標としたラフチジンの傷害緩和効果が、5Gy、7Gy といった中等度の放射線照射においても観察された。

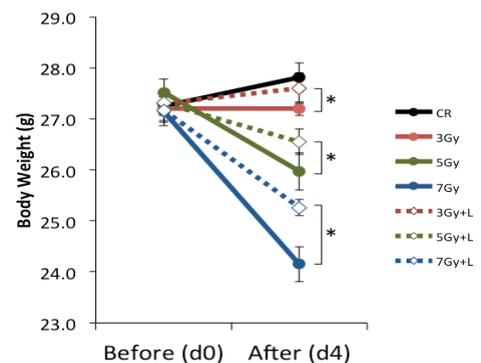


図 2 体重変化 放射線照射

2. 放射線照射における血球系細胞に対するラフチジンの効果

造血幹細胞は放射線に非常に感受性が高く、全身に放射線を浴びた場合造血器官からの血球の供給が無くなり白血球や血小板が減少する。リンパ球は放射線の影響を最も鋭敏に受け、1~2Gy で 48 時間以内に正常値の約 50% までに減少する。減少の速度とその程度は線量に依存する。各血球数の最低値を指標にした線量効果関係は、血小板が最も放射線に感受性があり、その次がリンパ球である。そこで、本研究においても、放射線照射とラフチジン投与による血球系細胞への影響を調べることにした。

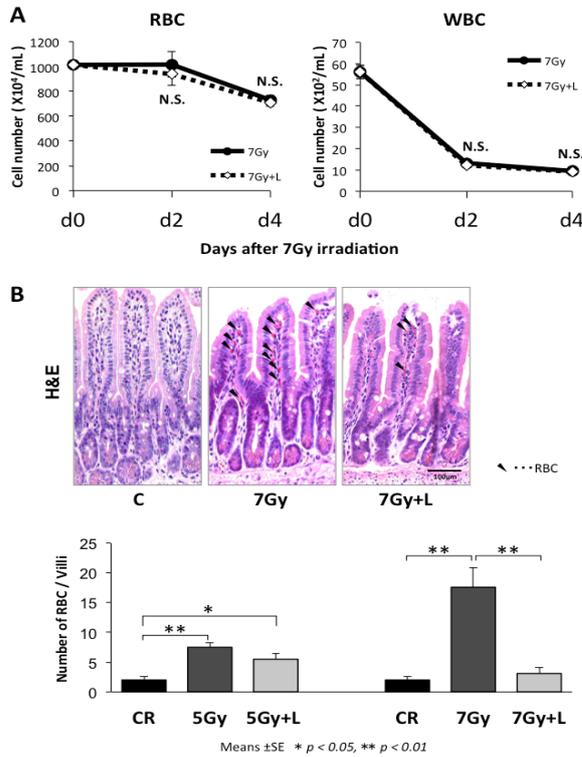


図3 血清中の血球数算定 (A) と小腸絨毛への赤血球浸潤 (B)

(7Gy+L 群)では、その出血傾向が抑えられる傾向にあることが分かった (図3B 上段)。一絨毛あたりの赤血球数をカウントし数値化したものが図3B 下段の図であるが、5Gy 群および7Gy 群において共に放射線照射による有意な赤血球浸潤増加が見られ、ラフチジン投与による有意な赤血球浸潤低下が観察された。

3. 放射線照射における消化管組織重量に対するラフチジンの影響

10Gy 以上の高線量被ばくでは、クリプト幹細胞の分裂停止により数時間で細胞増殖が停止する。絨毛の機能細胞は毎日失われるのみで補給が絶たれ、粘膜の萎縮、潰瘍発生、線維化が生じ、絨毛の短小化から粘膜細胞は減少の一途をたどりやがて消滅する。一方、中等度の被ばく (5-8Gy) では、絨毛の短小化が起こるが、数日でクリプト幹細胞が急激に回復し、消失した細胞が供給されて絨毛はもとに戻る。

そこで、消化管全長の総重量を指標として、粘膜構造維持に対してラフチジンが影響するかを検討した。放射線照射後4日目の小腸の乾燥重量を比較したところ、C群に比べ、3Gy放射線照射群において増加傾向にあることが分かった (図4上段)。これは、治癒回復期である照射後4日目において、細胞増殖促進および分泌物増加が組織総重量増加に反映したと考えられる。さらに、ラフチジン投与群 (3Gy+L 群)において、3Gy 群よりもさらに有意に増加した。これより、ラフチジンが回復期の組織修復を強化したと考えることができる。5Gy 群、7Gy 群においても同様の結果が得られ、中等度放射線においても十分な効果があることが示された (図4上段)。

一方、大腸においては、小腸のような変動は見られなかった (図4下段)。これは、大腸は食道と並んで分化した機能細胞が多い胃や小腸と比べて高線量の放射線であっても耐性を示すからであると説明できる。

放射線照射後の血中の白血球(WBC)数を計測したところ、7Gy放射線照射後2日目には20%程度まで減少した。しかしながら、ラフチジン投与群(7Gy+L 群)においても同様に減少が見られ、4日目においても放射線投与群との有意な差は見られなかった (図3A)。また、血中の赤血球(RBC)数においては、放射線照射により緩やかな減少を認めたが、大きな変化は認められなかった。これは、赤血球は寿命が比較的に長いこと、さらに、放射線照射後の赤血球数減少は貧血等による出血が大量にある場合に生じるため、数日という短期間においては計測値に反映されなかったと考えられる。ラフチジン投与による影響は白血球同様有意な差は認められなかった。これより、7Gyの高線量放射線照射に対する全身性所見においては、赤血球数および白血球数において、ラフチジン投与の影響はないものと考えられる。

そこで、局所的な血球変化に対してラフチジンが影響するかを検討するため、小腸組織における血球を観察した。小腸組織にH&E染色を施したところ、7Gy群の粘膜固有層内において、赤血球浸潤が見られ、放射線照射により内出血が認められた (図3B 上段)。一方、ラフチジン投与群

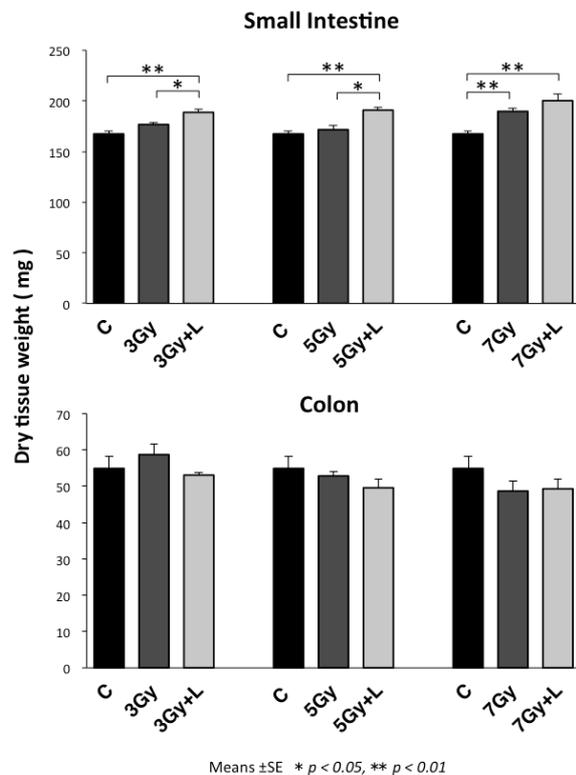
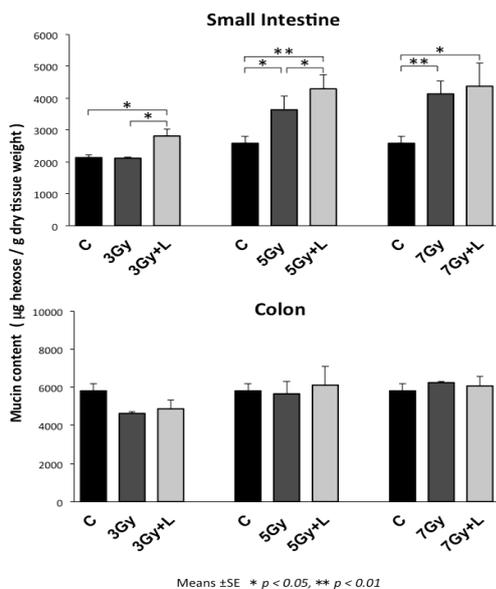


図4 消化管組織乾燥重量

図4 消化管組織乾燥重量 かつた 能細胞

4. 放射線照射におけるムチンに対するラフチジンの影響



放射線照射後4日目の小腸の総ムチン量を比較したところ、C群に比べ、5Gy放射線照射群において増加傾向にあることが分かった(図5上段)。7Gy放射線照射群でも同様に有意に増加した(図5上段)。さらに、ラフチジン投与群(3Gy+L群, 5Gy+L群, 7Gy+L群)において、放射線照射群よりも更なる増加を示した(図5上段)。これより、ラフチジンによる回復期の組織修復はムチン量の増加が関与する可能性が示唆された。大腸においては、組織重量の結果と同様、大きな変動は見られなかった(図5下段)。

消化管内には、摂取した食物や腸内細菌が雑多に存在するため、消化管の表面は粘液で保護されている。この粘液の主成分はムチンと呼ばれる物質である。ムチンは非常に多くの糖が結合したタンパク質(糖タンパク質)であり、これが不足すると、種々の腸疾患の発症につながる。つまり、ムチンの役割は物理的損傷や細菌感染などから消化管を保護することであり、その質や量の低下は潰瘍性大腸炎や癌を誘発するなど、ムチンは消化管機能に対して重要な物質である。

上記の組織重量の検討により、放射線粘膜傷害からの回復期において、ラフチジン投与による組織修復増強が想定された。この組織修復作用がムチンによるものであるかを検討するため、消化管粘膜におけるムチン量を比較検討した。

消化管のホモジェネートからムチン画分を分離し、フェノール硫酸法により総ムチン量を測定した。放射線照射後4日目の小腸の総ムチン量を比較したところ、C群に比べ、5Gy放射線照射群において増加傾向にあることが分かった(図5上段)。7Gy

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawashima-Takeda Noriko, Ito Yoshiya, Nishizawa Nobuyuki, Kawashima Rei, Tanaka Kiyoshi, Tsujikawa Kazutake, Watanabe Masahiko, Majima Masataka	4. 巻 32
2. 論文標題 RAMP1 suppresses mucosal injury from dextran sodium sulfate-induced colitis in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 809 ~ 818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.13505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maekawa Tatsunori, Shimayama Hitomi, Tsushima Hiromichi, Kawakami Fumitaka, Kawashima Rei, Kubo Makoto, Ichikawa Takafumi	4. 巻 62
2. 論文標題 LRRK2: An Emerging New Molecule in the Enteric Neuronal System That Quantitatively Regulates Neuronal Peptides and IgA in the Gut	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 903 ~ 912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-017-4476-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima R., Fujimaki K., Ichikawa T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Influence of an elemental diet on 5-fluorouracil-induced morphological changes in the mouse salivary gland and colon.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Support Care Cancer.	6. 最初と最後の頁 1609-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00520-015-2947-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maekawa Tatsunori, Tsushima Hiromichi, Kawakami Fumitaka, Kawashima Rei, Kodo Masaru, Imai Motoki, Ichikawa Takafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Is Associated With Activation of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Stress-Related Gastrointestinal Dysmotility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 article905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.00905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kodo Masaru, Kawashima Rei, Tamaki Shun, Kawakami Fumitaka, Maekawa Tatsunori, Imai Motoki, Koizumi Wasaburo, Ichikawa Takafumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Altered expression of amino acid transporter LATs of intestinal cells in 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Kitasato Medical Journal	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Maekawa T., Tsushima H., Kawakami F., Kawashima R., Ichikawa T.
2. 発表標題 LRRK2 is associated with gastrointestinal dysmotility induced by restraint stress.
3. 学会等名 Australasian Neurogastroenterology and Motility Association Inc-2017 Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前川達則、川上文貴、川島 麗、Jaime Foong、Joel Bornstein、市川尊文
2. 発表標題 腸管神経におけるLeucine-Rich Repeat Kinase 2の機能解析
3. 学会等名 第37回Cytoprotection研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島麗、香渡優、玉木竣、川上文貴、前川達則、栗原誠、市川尊文
2. 発表標題 放射線誘導性消化管傷害におけるH2ブロッカーの粘膜防御に対する効果
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前川達則、津島博道、川上文貴、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 LRRK2 is associated with gastrointestinal dysmotility induced by restraint stress.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川勇太、川上文貴、山下真裕佳、井阪勇輝、今井基貴、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 IBD関連分子LRRK2の消化管における生理的役割の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下真裕佳、川上文貴、石川勇太、井阪勇輝、今井基貴、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 大腸炎モデルを用いた腸管バリア機構に対する高脂肪食摂取の影響に関する解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井基貴、川上文貴、井阪勇輝、石川勇太、山下真裕佳、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 Leucine-rich repeat kinase 2によるp53のリン酸化とその生理的意義に関する解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井阪勇輝、川上文貴、今井基貴、石川勇太、山下真裕佳、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 LRRK2の糖代謝調節機構における生理的役割の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki H., Kosuge Y., Kobayashi K., Igarashi Y., Sasaoka Y., Kawakami F., Kawashima R., Imoto A., Kuroski Y., Ishii N., Aoyama N., Ishihara K., Ichikawa T.
2. 発表標題 HSP72 and anti-HSP72 antibodies control platelet aggregation induced by platelet activators in rats.
3. 学会等名 The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kodo M., Kawashima R., Koizumi W., Ichikawa T.
2. 発表標題 Expression of amino acid transporters in antitumor agent-induced gastrointestinal mucosal injuries.
3. 学会等名 UEGW 2017 (The 25th United European Gastroenterology Week) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川上文貴、井阪勇輝、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 消化管粘膜バリア機構におけるLRRK2の機能解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井阪勇輝、川上文貴、丸山弘子、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 脂肪組織におけるLRRK2の機能解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井阪勇輝、川上文貴、丸山弘子、川島麗、前川達則、市川尊文
2. 発表標題 脂肪細胞におけるLRRK2の機能解析
3. 学会等名 第30回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川島麗、市川尊文
2. 発表標題 放射線照射モデルを用いたH2受容体拮抗薬の効果
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川上文貴、川島麗、市川尊文
2. 発表標題 消化管粘膜防御機構に対する高脂肪食摂取の影響
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 津島博道、川島麗、市川尊文
2. 発表標題 ストレス性消化管運動障害に関わる新規分子の解析
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 香渡優、川島麗、市川尊文
2. 発表標題 5-Fluorouracil起因性消化管粘膜傷害に対する成分栄養剤の防御的役割
3. 学会等名 第44回日本潰瘍学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 津島博道、川島麗、市川尊文
2. 発表標題 ストレス性消化管運動障害に関わる新規分子の解析
3. 学会等名 第29回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 津島博道、川島麗、市川尊文
2. 発表標題 ストレス性消化管運動障害に関わる新規分子の解析
3. 学会等名 第40回分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 石川勇太, 川上文貴, 川島麗, 前川達則 市川尊文
2. 発表標題 消化管におけるLRRK2のIBDリスク遺伝子としての生理的役割の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉木竣, 川島麗, 二反田千里, 川上文貴, 前川達則, 栗原誠, 市川尊文
2. 発表標題 絶食下における腸管ムチンの発現変動と水分保持機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下真裕佳, 川上文貴, 石川勇太, 今井基貴, 川島麗, 前川達則, 市川尊文
2. 発表標題 大腸炎モデルマウスを用いた高脂肪食摂取の腸管粘膜バリアへの影響解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉木 竣、川島 麗、香渡 優、川上 文貴、前川 達則、栗原 誠、市川 尊文
2. 発表標題 抗癌剤起因性腸管粘膜炎症におけるアミノ酸トランスポーターLAT発現の意義
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 基貴、川上 文貴、川島 麗、前川 達則、神崎 展、市川 尊文
2. 発表標題 LRRK2-Rab経路によるGLUT4膜輸送の調節メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 勇太、川上 文貴、川島 麗、前川 達則、市川 尊文
2. 発表標題 IBDリスク分子LRRK2の消化管におけるDSS腸炎に対する影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川達則、川島麗、川上文貴、市川尊文
2. 発表標題 Leucine-Rich Repeat Kinase 2変異マウスにおける大腸運動異常と腸管神経病理像
3. 学会等名 第47回日本潰瘍学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Trudy McKee、James R. McKee、市川 厚、福岡 伸一、川島 麗	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 824
3. 書名 マッキー生化学(第6版)	

1. 著者名 Trudy McKee、James R. McKee、Michael G. Sehorn、福岡 伸一（訳者：川島 麗）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 72
3. 書名 マッキー生化学 問題の解き方 第6版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	武田 憲子 (TAKEDA Noriko) (20406929)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・外科系専門診療部・その他 (82612)	
研究 分担者	市川 尊文 (ICHIKAWA Takafumi) (30245378)	北里大学・医療衛生学部・教授 (32607)	