

平成 21年 6月 8日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590729

研究課題名 (和文) 胃食道逆流症における神経成長因子と侵害受容器に関する研究

研究課題名 (英文) Role of nerve growth factor and nociceptors in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease

研究代表者

吉田 憲正 (Yoshida Norimasa)

京都府立医科大学・大学院医学研究科講師

研究者番号：30166962

研究成果の概要：ラット食道への酸刺激により、脊髄後根神経節 (DRG) および食道粘膜内で、胸焼けなどの知覚に関与する受容体 (TRPV1) および神経伝達物質 (substance P、NGF) の産生が亢進することが明らかとなった。胃食道逆流症患者における知覚過敏のメカニズム解明につながる研究成果であり、酸分泌抑制剤でコントロール不良な患者では、将来、TRPV1、substance P、NGFなどを標的とした創薬が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：食道、侵害受容器、知覚過敏、サブスタンス P、TRPV1、神経成長因子(NGF)、逆流性食道炎、NERD

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 上部消化管内視鏡検査にて異常を認めないが、胸焼け、胃痛等の消化器症状を呈する機能性上部消化管障害 (nonerosive reflux disease (NERD), functional dyspepsia (FD)) は、日常臨床にて最も遭遇する機会の多い疾患であるが、発症機序、病態、治療に関しては不明な点も多い。NERD患者では軽度の食道内圧増加や酸負荷に対して容易に痛みや胸焼けを自覚する知覚過敏が存在することが指摘

されているが詳細は不明である。われわれは、これまでにヒト内視鏡下生検食道粘膜組織を用いて粘膜内の炎症マーカーを評価し、胃食道逆流症 (GERD) のみならずNERDにおいても粘膜内での微小な炎症が存在することを報告してきた。

(2) さらに、最近、胸焼けを主症状とするNERD患者の食道粘膜において、種々の神経伝達関連物質すなわち、酸を感知する侵害受容器であるパニロイド受容体 (TRPV1)、TRPV1の活性

化により放出される神経ペプチドのサブスタンスP (SP)、SPの受容体であるニューロキニン1受容体(NK1R)が増加していること、SP量と胸焼け症状の強さが相関することを報告した。従来より、胃ではTRPV1陽性神経の活性化により、神経終末よりSPやCGRPなどが放出されることが知られていたが、ヒト食道における詳細な検討はなされておらず、われわれの知見はNERD患者における知覚過敏の原因に、粘膜内での侵害受容器および神経ペプチド産生の発現亢進が関与することを示唆している。しかしながら、どのような因子が粘膜内でのTRPV1や神経ペプチドの発現制御に関与しているかの詳細は不明である。

(3)最近、種々の炎症に伴い、TRPV1などの侵害受容器が脊髄後根神経節(DRG)の神経細胞体で作られた後、軸索上を末梢まで輸送されリボゾーム上でTRPV1蛋白が合成されることが報告されている(J Neurochem, 2001)。一方、食道と同じ重層扁平上皮からなる皮膚においては、TRPV1などの侵害受容器や神経ペプチドの産生に、神経成長因子(nerve growth factor: NGF)が重要な働きをしていることが指摘されている。NGFは角質細胞、線維芽細胞、肥満細胞、マクロファージ、Tリンパ球などの多くの細胞より産生され、侵害受容線維の軸索伸長、侵害受容器(TRPV1)の産生と軸索輸送、SPやCGRPの産生を誘導する(Neuron, 2002)。すなわち、侵害受容線維の末梢自由終末のTrKA(NGFの受容体)と結合したNGFは、逆行性にDRGにある侵害受容神経細胞体に運ばれ、TRPV1, SP, CGRPの産生を促進する。その後、TRPV1 mRNAおよび蛋白が順行性軸索流に乗って末梢自由終末に運ばれ、そこの細胞膜に取り込まれて、刺激に対する感受性を高めることが明らかにされている。すなわち、TRPV1、SP、CGRPのDRGでの産生増加およびDRGから末梢神経終末への移動の最大の刺激がNGFと考えられる。しかし、これまで消化管知覚特に食道知覚異常におけるNGFの役割、消化管粘膜内の侵害受容器や神経ペプチド発現へのNGFの影響などは全く検討されていない。種々の細胞がNGFを産生することより、NERD患者でのTRPV1やSPの発現増加、知覚過敏にNGFが関与していることが想定される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラット食道炎モデルを用いて、食道知覚過敏に関連する酸感受性侵害受容器TRPV1および神経ペプチド発現制御におけるNGFの役割について解明し、将来の創薬に発展させることを目標とする。NERD患者における食道粘膜内でのTRPV1 mRNAおよび蛋白の増加、SPの増加の原因は明らかではない。こ

の重要な現象の原因がNGFによって誘導されているか否かを明らかにしたい。すなわち、1) 酸などの逆流物の直接刺激および酸逆流により惹起される微小な粘膜内の炎症に伴い重層扁平上皮や間質系細胞、炎症細胞から産生されるNGFの動態、2) 胸焼けなどの逆流症状、食道粘膜内でのTRPV1およびSP発現へのNGFの意義、3) DRG内神経細胞体でのTRPV1、SPの発現へのNGFの意義、4) DRG内神経細胞体からTRPV1、SPの末梢神経終末への移動(軸索輸送)および末梢神経終末の粘膜表層への侵入(軸索伸長)におけるNGFの役割について明らかにしたい。われわれはラット食道粘膜に直接的に酸暴露することにより、粘膜内でSPが増加することを確認しているが、本動物モデルを用いて、酸負荷による直接的なNGFの動態と粘膜内およびDRG内でのTRPV1、SP、CGRP発現を検討する。ヒトNERD患者の食道粘膜内においてTRPV1やSPが増加している原因として、種々の炎症性刺激(特にNGFの刺激)によるDRGニューロンでのTRPV1およびSP産生亢進が想定されるため、ラットのDRGを用いてこれらの侵害受容器/神経ペプチドの発現亢進を遺伝子およびタンパクレベルで評価したい。

## 3. 研究の方法

Wistar系雄性ラットに先端バルーン付きカテーテルを経口的に挿入しpH1の塩酸(塩酸暴露群)または生理食塩水(コントロール群)をカテーテルの側孔より食道内に注入し、胃噴門直下でバルーンを拡張させることにより注入液を食道内に留まらせるようにする。10分後に注入した薬剤を回収し、1-3時間後に食道粘膜およびDRG(Th7-9)を採取する。ラットDRGの採取および取り扱いは、既に論文(Kuramoto H, et al: J Auton Nerv Syst 54:126-136, 1995)として報告している。これまでの検討により食道下部の一次知覚神経終末はTh7-9のDRGニューロンと連絡していると考えられる。今回、食道下部への酸暴露後Th7-9のDRGを採取し、

1. 免疫組織学的検討(NGF, TRPV1, SP, CGRPのタンパクおよびmRNAの局在を評価)
  2. ELISAおよびウエスタンブロット法によるタンパク定量(NGF, TRPV1, SP, CGRP)
  3. Real-time PCR法によるmRNA定量(NGF, TRPV1, SP, CGRP)
- を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

塩酸負荷群および生食負荷群(コントロール群)とともに肉眼的に食道粘膜にはびらん性変

化は認めなかった。コントロール群に比し、塩酸暴露群の食道粘膜および DRG (図 1) において TRPV1 の mRNA およびタンパクは有意に増加していた。

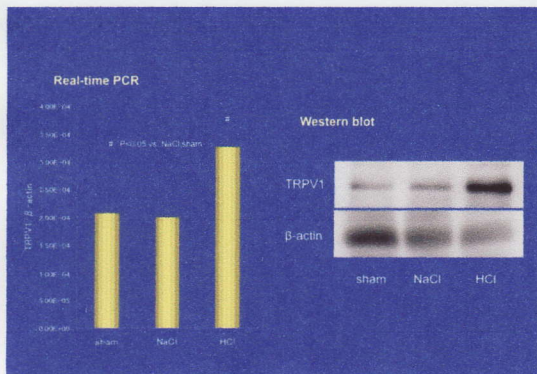


図 1 DRG における TRPV1 発現

免疫染色では、DRG 神経細胞内での TRPV1 (図 2) および substance P (図 3) の産生が確認された。

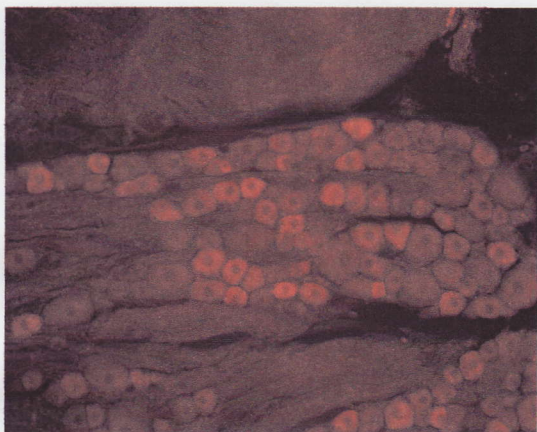


図 2 DRG における TRPV1 免疫染色

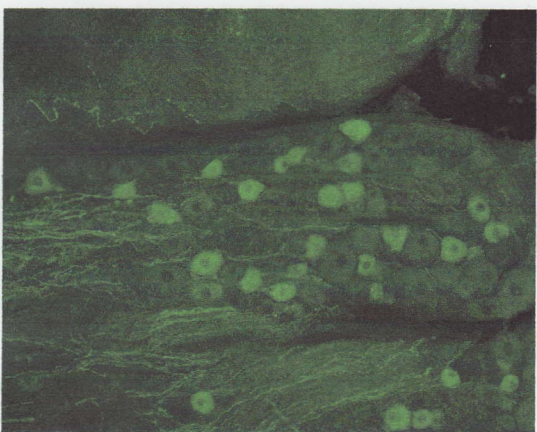


図 3 DRG における substance P 免疫染色

食道粘膜および DRG での substance P、NGF のタンパク発現は有意に増加していたが、CGRP の発現には有意差は認めなかった。TRPV1 拮抗薬 capsazepine の投与は、substance P の増加を抑制したが NGF の増加には有意な影響を及ぼさなかった。

## (2) 考察

ラット食道粘膜への酸刺激のみで食道粘膜および DRG での NGF/TRPV1/substance P の増加を認めた。TRPV1 拮抗剤 capsazepine の抑制効果より、substance P の増加の一部は TRPV1 活性化を介していると考えられた。一般的に、TRPV1 や substance P は DRG の神経細胞体で産生され、軸索輸送にて末梢神経に分布することが知られている。TRPV1 はタンパクだけでなく mRNA も軸索を通り、神経線維終末まで輸送される。今回の検討で、TRPV1 および substance P の発現亢進が DRG 内と食道粘膜内で連動していることより、酸の食道粘膜への暴露が、DRG 神経細胞体での TRPV1 および substance P の産生誘導の重要な刺激因子と考えられた。酸暴露と TRPV1 および substance P の発現亢進を結びつけるものとして、われわれは NGF に注目した。NGF は炎症細胞、肥満細胞、角化細胞などで産生され、神経終末の NGF 受容体 (TrkA) と結合し、軸索流にのり DRG まで運ばれ、神経細胞体での TRPV1、substance P、CGRP などの産生を刺激するとされる。今回、酸刺激後 3 時間で食道粘膜内での NGF の産生が亢進していたが、時間的経過、産生細胞などは不明である。今後、NGF の阻害が、TRPV1、substance P などの発現に及ぼす影響を検討する必要がある。

本研究の結果とこれまでわれわれが検討してきた NERD 患者の研究結果から、NERD 患者の知覚過敏における侵害受容器、神経ペプチドの意義は以下のように考察される。酸暴露により食道粘膜内に増加した NGF が軸索輸送され DRG の神経細胞を刺激し、TRPV1 および substance P が産生されること、増加した DRG 内の TRPV1 および substance P が食道粘膜内の神経末端まで軸索輸送されること、酸暴露による食道粘膜内 TRPV1 の活性化は、軸索反射により食道粘膜内に substance P を増加させ血管透過性亢進、浮腫などの神経炎症を惹起するだけでなく、DRG から脊髄後角、中枢へと伝達され、胸焼けや胸痛などの知覚に関与することなどが想定される。NERD 患者では TRPV1 の発現が亢進している結果、少量の酸刺激でもこれらの刺激伝達路が増強され知覚過敏をきたすのではないかと考えている。酸分泌抑制剤で症状コントロール不良

な NERD 患者では、将来、TRPV1, substance P, NGF などを標的とした自覚症状改善薬が有効であるかもしれない。今回の結果により、食道への酸暴露により NGF, TRPV1, substance P が DRG, 食道粘膜内で増加がすることが確認された。これらの侵害受容器、神経ペプチドの増加が NERD の知覚過敏に関与するというわれわれの仮説についてはさらに検討する必要がある。

## 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 1 件)

① 吉田憲正、鎌田和浩、藤本荘太郎、鈴木隆裕、大谷りら、戸坂真子、吉川敏一、藏本博史. 食道粘膜への酸暴露による TRPV1 依存性神経炎症、Therapeutic Research 30, 450-453, 2009, 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 吉田憲正、食道粘膜の知覚過敏、炎症と TRPV1, 日本消化管学会、2009. 2. 13, 東京
- ② Kamada K, Yoshida N, Suzuki T, Kishimoto E, Handa O, Yoshikawa T., Role of TRPV1 expression associated with nerve growth factor in the esophageal visceral sensitivity. 日本消化管学会、2009. 2. 13, 東京
- ③ 吉田憲正、鈴木隆裕、鎌田和浩、大谷りら、戸坂真子、吉川敏一、藏本博史食道粘膜への酸暴露は NGF/TRPV1/substance P を増加させる、日本神経消化器病学会、2008. 9. 30, 東京
- ④ Suzuki T, Yoshida N, Mizushima K, Kamada K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Kuramoto H, Yoshikawa T. TRPV1 expression associated with nerve growth factor mediates the esophageal visceral hypersensitivity. 109th Annual meeting of the American Gastroenterological Association, 2008. 5. 18, San Diego
- ⑤ 鈴木隆裕、吉田憲正、吉川敏一. TRPV1 を介した食道粘膜内の神経炎症. 第 26 回 Cytoprotectio 研究会、2008. 3. 14, 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 憲正 (Yoshida Norimasa)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科講師  
研究者番号：30166962

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

藏本 博史 (Kuramoto Hiroshi)  
京都工芸繊維大学・繊維学部・准教授  
研究者番号：30153373