

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590799

研究課題名（和文） 腹部症状発現の分子メカニズムの解明
-神経炎症と粘膜透過症の食道症状への関わり-

研究課題名（英文） Mechanisms of abdominal symptom development -involvement of neural inflammation and mucosal permeability on esophageal symptoms-

研究代表者

三輪 洋人 (MIWA HIROTO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80190833

研究成果の概要（和文）：

腹部症状の発現に関わる因子はこれまで明らかでなかったが、我々は逆流性食道炎ラットモデルで腹部症状の指標としての自発運動量が減少し、痛みに関連する受容体や神経ペプチドが食道や神経節で増加していることを明らかにした。またその機能を阻害することで腹部症状が回復することを明らかにした。さらに食道上皮様扁平上皮細胞層を作成し、上皮細胞層のバリア機能には表層細胞層が重要であり、細胞接着に関わるクラウジン4が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Although the factors which were involved in the development of abdominal symptoms had not been clear, we found that neuropeptides and those receptors were involved in the development of abdominal symptoms using rat esophagitis model. Furthermore, we established esophageal like stratified epithelial cell layer model and found that superficial layers were important for the epithelial barrier function and that claudin-4 was involved in the barrier function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：上部消化管学（食道，胃，十二指腸）

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国では欧米諸国に比して胃潰瘍や胃癌が多く、形態学を中心に消化管研究が進んできたが、近年研究の対象は確実に機能的領域へと広がりつつある。また国民自身の生活の質（quality of life; QOL）への興味が高まり、「腹部症状」に対する関心は急速に高まりつつある。日常診療では腹部愁訴を訴

える患者は極めて多く、その多くは機能性の症状であることが知られている。腹部症状発現機序を理解することが、上腹部症状患者を、正しく、そして科学的に治療できる第一歩であると考えられるが、残念ながら腹部症状発現のメカニズムはほとんど解明されていない。

(2) 1997年のTRPV1受容体が発見以来、痛

みの分子科学が急速に進んできたが、その研究対象のほとんどは体性痛で、持続する漠然とした感覚である内臓痛発生メカニズムに関する研究はほとんどない。

(3) われわれは最近このモデルで、ラット逆流症状が自発運動の減少として定量的に評価できることを見いだした (Neurogastroenterol Motil. 2009)。このモデルでは胸やけなどの逆流症状を食道表層組織のみならず食道粘膜深層、さらには知覚神経や筋層でのダイナミックな変化として捕らえることが出来る。これまでの研究手法から脱却した新たな観点からの症状発現メカニズムの研究である。また、われわれはこれまでラット胃の伸展誘発内臓痛モデルで、脊髄後根神経節および消化管粘膜での知覚神経での疼痛関連メディエーター、侵害受容体の発現を研究してきた (Gastroenterology. 2008, Gut. 2009)。

2. 研究の目的

腹部症状発現メカニズムを逆流性食道炎の動物モデルと *in vitro* 扁平上皮細胞層モデルを用いて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラット慢性酸型逆流性食道炎モデルは、Omura らの方法 (Scand J Gastroenterol, 1999) を参考に作製する。

(2) ラット慢性酸型逆流性食道炎モデルを用いて食道から投射される後根神経節レベルを同定する。次にこのレベルで神経炎症の指標として substance P と CGRP あるいはレセプターである NK-1 レセプター、CGRP レセプターの発現変化を蛍光免疫染色、Western blotting、real-time PCR で検討する。

(3) Air liquid Interface (ALI) の系の確立
ヒト気管上皮細胞 (NHBE) を BEGM (CAMBREX、USA) と DMEM が 1 対 1 で混合された培養液を用いて Air liquid Interface 法で培養する。インサートをラットテールコラーゲン、ファイブロンectin、BSA でコートし、BEGM 培養液で NHBE を 1 日培養後、インサート上部の培養液を抜き取り Air liquid interface 法にて細胞を培養する。電気抵抗値と FSA (蛍光色素) の透過性を測定することで培養細胞間の透過性を測定し、細胞間結合の発達を確認する。電子顕微鏡で細胞間接着構造を確認する。またこの細胞系とヒト食道扁平上皮細胞層との類似性を DNA array あるいは、サイトケラチン、タイト結合蛋白など種々蛋白の発現パターンを検討することで確認する。食道症状発現に関わりうる刺激 (酸や胆汁酸など) を上皮層の管腔側から投与することにより上皮間透過性の変化を検討する。また細胞間透過性を制御する可能性のある薬剤を探索する。

4. 研究成果

(1) 疼痛関連受容体と神経ペプチドに関する検討

これまでこの症状メカニズムに関与する因子の検討はまったくなされていないことから、われわれはこのモデルを用いて疼痛関連受容体 (ニューロキニン-1) と神経ペプチド (タキキニン-1) の関与を検討した。慢性酸型逆流性食道炎ラットで、術後 10 日に有意にびらんを認めた。術後 10 日の食道粘膜でびらん部と非びらん部に関わらずニューロキニン-1 受容体の発現は有意に増加していた。タキキニン-1 の mRNA 発現は非びらん部で有意に上昇していた。慢性酸型逆流性食道炎ラットで、自発運動量は有意に減少した。ニューロキニン-1 受容体拮抗剤 : L732, 138 の投与により自発運動量の減少は有意に抑制された。以上から逆流性食道炎の腹部症状発現には NK-1 受容体とその関連神経ペプチドの関与が考えられた (Neurogastroenterol Motil, 2010)。

(2) 脊髄後根神経節および迷走下神経節における神経炎症

ラット慢性酸型逆流性食道炎モデルを用いて食道から投射される後根神経節レベルは Th 8、Th 9、Th 10 であることをまず同定した。慢性酸型逆流性食道炎モデルにおいて、このレベルでのサブスタンス P あるいは CGRP の発現変化を検討し、これらの発現レベルが有意に増加することを明らかにした。

(3) ALI の系の確立

ヒト気管上皮細胞 (NHBE) を ALI 法で培養すると、細胞が扁平上皮化し、食道粘膜様扁平上皮細胞層を構築することが出来、DNA array でその遺伝子発現パターンは、他の食道癌上皮細胞株に比べてヒト食道粘膜上皮と非常に類似していることを明らかにした。Real time PCR と Western blotting でタイト結合蛋白の発現パターン (CLDN4) やサイトケラチン (CK4、CK13) 発現パターンを確認すると食道扁平上皮と同様であり、食道様扁平上皮細胞層の *in vitro* モデルを作成することが可能となった。この細胞系で PPAR-delta 作動薬を用いると TEER 上昇を認め、食道粘膜上皮のバリア機能強化に有用である可能性が考えられた。レチノイン酸 (ATRA) の投与は、扁平上皮への分化を抑制し、バリア機能強化を抑制した (Am J Physiol Cell Physiol. 2011)。

(4) ALI 培養扁平上皮細胞層を用いた上皮バリア機能評価

酸や胆汁酸による食道上皮細胞層のバリア機能変化を検討し、pH 2 の酸あるいは酸性 (pH 3) 下の胆汁酸 (タウロコール酸あるいはグリココール酸) がバリア機能障害を起こすことを明らかとした。また胆汁酸あるいは弱酸 (pH 3) のみではバリア機能障害が発生しな

いことを明らかにした。

これまで食道上皮細胞間隙拡大が GERD 症状発現と関係するとの報告から細胞間隙拡大によるバリア機能低下が想定されていたが、今回の検討で細胞間隙の拡大は、食道上皮基底層や有棘層で発生し、この部位はバリア機能がないことを明らかとし、顆粒層がバリア機能に重要であり、顆粒層には細胞間隙拡大がみられないことが明らかとなった。すなわち食道扁平上皮層の細胞間隙拡大とバリア機能低下は別の現象であることが明らかとなった。またこのバリア機能の制御には、タイト結合蛋白のクローディン (CLDN) 4 が重要であることが *in vitro* の検討で明らかとなり、ヒトにおいても逆流性食道炎患者の食道扁平上皮細胞層の顆粒層で CLDN4 の局在変化を認めた (*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, *Lab Invest*, 2012)。

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 6 件)

- ① Oshima T, Miwa H et al (5 名 5 番目), Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers, *Lab Invest*, 査読有, 92, 2012, 22-31.
DOI: 10.1038/labinvest.2011.139.
- ② Chen X, Oshima T, Miwa H et al (7 名, 7 番目), Acidic bile salts modulate the squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 査読有, 301, 2011, G203-9.
DOI: 10.1152/ajpgi.00096.2011
- ③ Miwa H, Oshima T, Sakurai J et al (8 名, 1 番目), Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia, *J Gastroenterol Hepatol*, 査読無, Suppl 3, 2011, 53-60.
DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06633.x.
- ④ Oshima T, Miwa H et al (8 名, 7 番目), Establishment of esophageal like non-keratinized stratified epithelium using normal human bronchial epithelial cells, *Am J Physiol Cell Physiol*, 査読有, 300, 2011, C1422-1429.
DOI: 10.1152/ajpcell.00376.2010
- ⑤ Miwa H, Koseki J, Oshima T, Kondo T, Tomita T, Watari J, Matsumoto T, Hattori T, Kubota K, Iizuka S, Rikkunshito, a traditional Japanese medicine, may relieve abdominal symptoms in rats with

experimental esophagitis by improving the barrier function of epithelial cells in esophageal mucosa, *J Gastroenterol*, 査読有, 45, 2010, 478-487.

DOI: 10.1007/s00535-009-0180-1

- ⑥ Oshima T, Koseki J, Sakurai J, Watari J, Matsumoto T, Miwa H, NK-1 receptor is involved in the decreased movement in a rat chronic acid reflux oesophagitis model, *Neurogastroenterol Motil*, 査読有, 22, 2010, 579-584.
DOI: 10.1111/j.1365-2982.2009.01450.x

[学会発表] (計 11 件)

- ① Oshima T, Pathophysiology and Treatment of Functional Dyspepsia, 2011 National Intestinal Disease Congress & New Technique Forum of Digestive Endoscopy in Tianjin (招待講演), 2011 年 11 月 12 日, Tianjin, China
- ② Oshima T, Miwa H et al, Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins, DDW2011, 2011 年 5 月 9 日, Chicago, USA
- ③ Oshima T, Sakurai J, Miwa H et al, Visceral symptoms and dilated intercellular spaces in a rat chronic acid reflux esophagitis model are mediated by increased neuropeptides expression in dorsal root ganglion, DDW2011, 2011 年 5 月 9 日, Chicago, USA
- ④ Chen X, Oshima T, Miwa H et al, Acidic bile salt modulates the squamous epithelial barrier function by modulating tight junction protein, DDW2011, 2011 年 5 月 9 日, Chicago, USA
- ⑤ Okugawa T, Oshima T, Miwa H et al, Establishment of a system measuring liquid meal-induced gastric accommodation in conscious guinea pigs, DDW2011, 2011 年 5 月 9 日, Chicago, USA
- ⑥ Miwa H, Current understanding of the pathogenesis of functional dyspepsia, Sino-Japan (Tianjin) Symposium of Digestive Diseases (招待講演), 2011 年 3 月 6 日, Tianjin, China
- ⑦ Chen X, Oshima T, Miwa H et al, Acidic bile salts modulates the squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins, 第 38 回日本潰瘍学会, 2010 年 11 月 20 日, 大阪
- ⑧ Oshima T, Miwa H et al, Bile acids in acidic condition modulate the squamous epithelial barrier function, The 12 World Congress of the International

Society for Diseases of the Esophagus (ISDE2010), 2010年9月5日, Kagoshima

⑨ Oshima T, Miwa H et al, Acid Modulates the Squamous Epithelial Barrier Function by Modulating the Localization of Claudins, Digestive Disease Week 2010, 2010年5月5日, New Orleans

⑩ Oshima T, Koseki J, Sakurai J, Matsumoto T, Miwa H, NK-1 receptor is involved in the development of chronic dyspeptic symptom in a rat chronic acid reflux esophagitis model, Digestive Disease Week 2009, 2009年6月1日, Chicago

⑪ Oshima T, Koseki J, Sakurai J, Tomita T, Matsumoto T, Miwa H, Involvement of NK1 receptor in the development of chronic dyspeptic symptoms in a rat chronic acid reflux esophagitis model, The 1st Biennial Congress of the Asian Neurogastroenterology and Motility Association, 2009年4月4日, Seoul

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 洋人 (MIWA HIROTO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：80190833

(2) 研究分担者

大島 忠之 (OSHIMA TADAYUKI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00381814
櫻井 淳 (SAKURAI JUN)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：30528998