

## 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25年 5月24日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22600004

研究課題名（和文）機能性胃腸症における胃の痛覚過敏に関わるメディエーターの解析

研究課題名（英文）Research on basic mechanisms of gastric hyperalgesia in animal model of functional dyspepsia

研究代表者 尾崎 紀之 (OZAKI NORIYUKI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40244371

研究成果の概要（和文）：機能性胃腸症のメカニズムを解析するために、動物モデルを開発し、胃の痛覚に関与する因子を調べた。ラットに反復水回避ストレスを加えると、胃に病変は見られないものの、胃の痛覚が亢進した。痛覚の亢進には副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)が関与し、CRF受容体のうちCRF1ではなくCRF2受容体が関与していた。反復水回避ストレスは機能性胃腸症モデルとして有用であり、機能性胃腸症の痛みにはCRF2が重要と思われた。

研究成果の概要（英文）：Repetitive WA-S developed gastric hyperalgesia even in the absence of detectable gastric pathology, suggesting its suitability for a potential animal model of FD. CRF2 receptor play an important role in gastric hyperalgesia observed after the stress. CRF2 receptor signaling may be useful therapeutic targets for FD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1800000	540000	2340000
2011年度	800000	240000	1040000
2012年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：内臓痛

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：機能性胃腸症、ストレス、CRF、CRF2、内臓痛

## 1. 研究開始当初の背景

## (1)機能性消化管障害、機能性胃腸症

痛みや不快感など消化管に起因する症状を呈するものの器質的病変、生化学的所見が明らかでないものは機能性消化管障害とよび、主に上部消化管症状を呈する機能性胃腸症(functional dyspepsia)や下部消化管症状を呈する過敏性腸症候群(IBS)がある。機能性胃腸症に見られる上部消化管症状は頻度が高く、潰瘍や悪性腫瘍など器質性の疾患との鑑別が必要であることから、機能性胃腸症のメカニズムを明らかにすることは重要であ

る。機能性胃腸症における上部消化管症状の発現には消化管の運動と知覚の異常が関係していると考えられるが、その病態生理は十分には解明されていない。機能性胃腸症の患者はバロスタットによる胃の伸展刺激に対して不快に感じる閾値が低く、正常とは異なった関連痛を訴えることが報告されている(Mertz et al, 1998)。そしてこの機械的刺激に対する閾値の低下が、機能性胃腸症における上部消化管症状の重要なメカニズムではないかと考えられている。

(2)胃の痛みの動物モデルの開発と胃潰瘍、胃

炎の痛覚過敏に関与するメディエーターの解析

我々はこれまで、胃の痛みの動物モデルを開発し、胃の急性の痛みには大内臓神経が関与していることを明らかにした(Ozaki et al., 1999, 2001)。また胃炎や胃潰瘍を作成した動物では胃の痛覚過敏が見られ(Ozaki et al., 2002)、末梢の知覚神経の電圧感受性ナトリウムチャンネルが興奮性を増していることを明らかにした(Bielefeldt, Ozaki, Gebhart 2002ab)。また、神経成長因子が胃潰瘍の組織に発現し(Ozaki et al., 2002)、電圧感受性ナトリウムチャンネルの興奮性を亢進させ(Bielefeldt, Ozaki, Gebhart., 2003)、潰瘍で見られる胃の痛覚の亢進に関与していることを明らかにした。さらに胃潰瘍の組織では神経線維の増生が起きている所見も得た(Ozakiet al., 2005)

### (3)機能性胃腸症モデル動物開発の試み

一方、機能性胃腸症の研究は、臨床的研究は見られるものの(Anand et al., 2007)適切な動物モデルがないこともあり、基礎的研究は我々の知り得る限り見当たらない。我々は、腸の痛覚過敏を示す動物モデル(Bradesi et al., 2005, 2007)を参考にし、ストレスに暴露すると、ラットの胃に痛覚過敏が引き起こされることを明らかにし、機能性胃腸症の動物モデルとしての可能性を報告した(尾崎, 杉浦, 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が開発しているストレスによる胃の痛覚過敏のモデルの解析を進め、機能性胃腸症の動物モデルとしての妥当性を検証し、さらに胃の痛覚過敏に関与するメディエーターを分析することで機能性胃腸症のメカニズムを明らかにし、効果的な治療法を開発することを目的としている。

### (1)機能性胃腸症モデル動物の検証

我々が開発したストレスによる胃の痛覚過敏を示す動物モデルが機能性胃腸症のモデルとして有用かどうか多角的に検証するため、本モデルにおける胃の痛覚、排出能、および胃壁の組織学的変化を経時的に解析する。

### (2)機能性胃腸症モデル動物で見られた痛覚過敏に関わるメディエーターの解析

このモデルで痛覚過敏が発現するメカニズムを明らかにするために、胃の知覚神経線維の分布、痛覚に関連するメディエーターの胃の組織での発現、知覚神経における痛覚関連のレセプターの発現の変化を調べる。次に前述の実験でストレスによる胃の痛覚過敏に伴って変化したメディエーターを薬理的に抑制したとき、行動実験における痛覚過敏が抑えられるか調べ、機能性胃腸症の新しい治療法の開発をめざす。

## 3. 研究の方法

### (1)ストレスによる胃の痛覚過敏の動物モデルの検証(担当:尾崎紀之)

これまでの実験で、ラットにストレスを加えるとストレス後に胃の痛覚が亢進することを我々は報告している(尾崎, 杉浦, 2007)。このモデルが機能性胃腸症のモデルとして有用かどうか検証した。

#### ①動物

実験にはSD系雄性ラット(8週齢、体重250±10g)を用いた。動物は、室温約22°C、湿度約60%、照明時間12時間(午前9時~午後9時)の環境で飼育し、給水と給餌は自由摂取とした。後述するバルーン及び電極の留置手術の前日より24時間の絶食を行った。

#### ②胃の痛みの評価

胃の痛みの評価方法は、我々が以前から報告しているバルーン伸展による方法に従って行った(Ozaki et al., 2002)。ペントバルビタール深麻酔下(50 mg/kg、腹腔内投与)において、胃にバルーンを、僧帽筋に筋電図測定用の電極をそれぞれ留置した。胃の痛覚は、胃を20, 40, 60 mmHgでバルーン伸展した時の内臓運動反射(VMR)を筋電図の変化として記録した(図1A)。

#### ③水回避ストレス(water avoidance stress: WAS)

Bradesiらの報告(Bradesi et al., 2009)を少し変更して行った。深さ9センチの水を満たした水槽の中央に高さ10センチの台を置き、その上にラットを1日1時間留置するのを1回のWASとし、10日間繰り返した。対照群は水を入れない水槽に同じ時間ラットを留置した(図1B)。

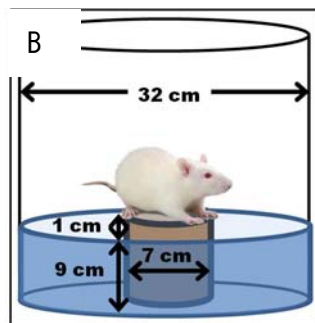
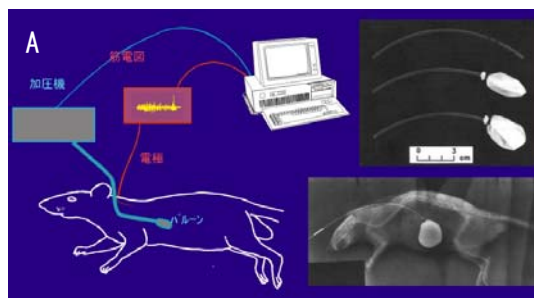


図1

#### ④WASによる胃の痛覚の変化

バルーン及び電極を留置した一週間後に胃

の痛覚を測定し pre 値とした。その後 WAS を 10 日間加え、初日の WAS の直後と 10 日目の WAS の直後に胃の痛覚を評価した。

⑤体重、摂餌量の測定

10 日間の WAS 負荷期間中の毎日、WAS 負荷の直前に体重を測定した。摂餌量は、前日のストレス負荷直後から当日のストレス負荷直前までの摂餌量を 1 日の摂餌量として測定した。

⑥胃内容物排出(Gastric emptying)の評価  
Edelsbrunner らの報告 4) に従い、胃に残っている食物の量を測定することで胃内容物排出を間接的に評価した。10 日間のストレス直後に動物を屠殺し、胃内容物を測定した。

⑦胃壁の病変の有無の肉眼的・組織学的検索

胃壁の潰瘍、出血、炎症の有無を肉眼的、組織学的に調べた。

⑧体性痛の変化

Von Frey 式 Dynamic Plantar Aesthesiometer(Ugo Basile, Comerio VA - Italy) を用い、直径 2 mm のフィラメントで足底に機械刺激を加え、逃避行動を示した時の刺激強度を、機械刺激による痛みの閾値として測定した。また、Plantar test (Ugo basile) を用い、熱刺激を測定に加え、逃避行動を示すまでの潜時を熱刺激による痛覚として測定した。WAS 前の閾値を pre 値とし、その後 1 回目の WAS 直後と 10 回目の WAS 直後に測定した。

(2) 胃の痛覚過敏のメカニズムの解析 (担当: 尾崎紀之、易勤、山口豪)

①胃の組織および知覚神経での神経成長因子とその受容体の発現の検索  
ストレスによって痛覚が亢進した胃の組織で神経成長因子の発現を検索した。また迷走神経節及び後根神経節内の胃の知覚神経をトレーサーによって選択的に標識しておいて、胃の知覚神経における神経成長因子の受容体 TrkA の発現を調べた。

②胃の組織での CRF の発現の解析  
過敏性腸症候群のモデルにおいて、CRF およびその関連ペプチドである urocortin 1 が、その受容体である CRF1 を介して腸の痛覚過敏に関与していることが報告されている (Martinez and Tache, 2006)。胃の組織における CRF の発現を免疫組織学的に調べた。

③行動薬理学実験 CRF の阻害  
CRF の拮抗薬である alpha-helical CRF や CRF1 選択的拮抗薬である antalarmin、CRF2 選択的拮抗薬である Astressin2B を投与して、胃の痛覚が抑制されるか調べた。

④行動薬理学実験 酸感受性イオンチャンネル ASICs、TRPV1 の阻害  
ASICs の拮抗薬である amiloride、TRPV1 の拮抗薬である capsazepine を投与し、胃の痛覚が抑制されるかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) WAS が胃の痛覚に及ぼす影響

一回の WAS は有意な痛覚過敏を起ささないが、10 日間反復 WAS を加えると、プレ値と比べて、有意に大きな筋電図の変化が見られ、胃の痛覚過敏を引き起こした (図 2A)。対照群では胃の痛覚に有意な変化は見られなかった。また、10 日間の WAS 後の胃の粘膜に明らかな病変は見られなかった (図 2B)。

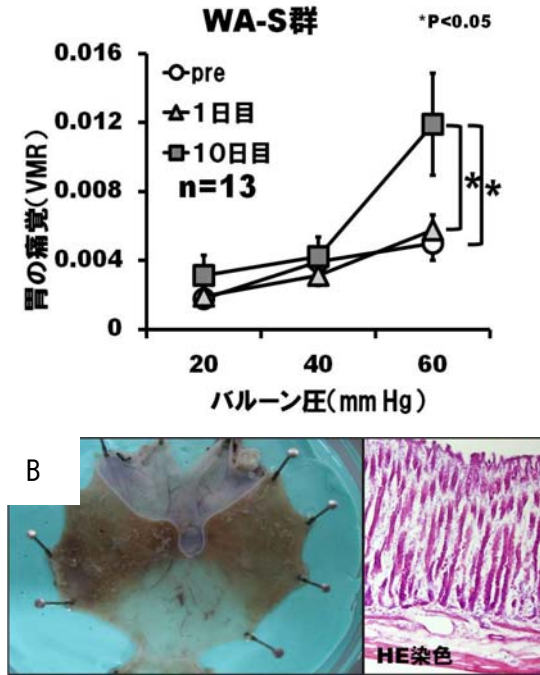


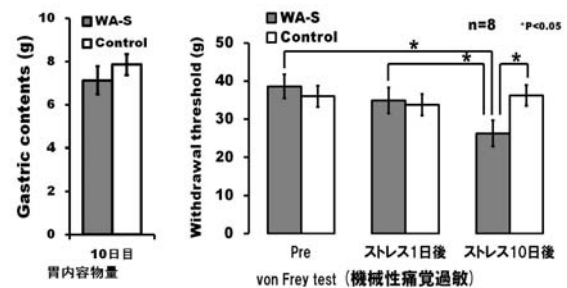
図 2

(2) 体重、摂餌量、胃内容の排出

10 日間の WAS の負荷期間中、ストレス群と対照群で、体重、摂餌量ともに有意な差は見られず、また、胃内容物の排出でも、有意な差は見られなかった (図 3A)。

(3) 体性痛の変化

10 日間の WAS 直後では、pre 値に比べ、機械刺激に対する痛みの閾値が有意に低下し、WAS は足底の皮膚の機械性痛覚過敏を引き起こした (図 3B)。一回の WAS は機械性痛覚に影響しなかった。また WAS は足底の皮膚の熱性の痛覚には有意な変化を起さなかった。



(4) 行動薬理学実験

10 日間の WAS 直後に 60 mmHg で胃を伸展した時の亢進した胃の痛覚を CRF の拮抗薬である

alpha-helical CRF、CRF2 受容体拮抗薬である Astressin 2B が抑制した (図 4A、B)。しかし、CRF1 受容体拮抗薬である Antalarmin は抑制しなかった (図 4C)。また、ASICs 拮抗薬は抑制したが、TRPV1 拮抗薬や、神経成長因子の中和抗体も抑制しなかった。

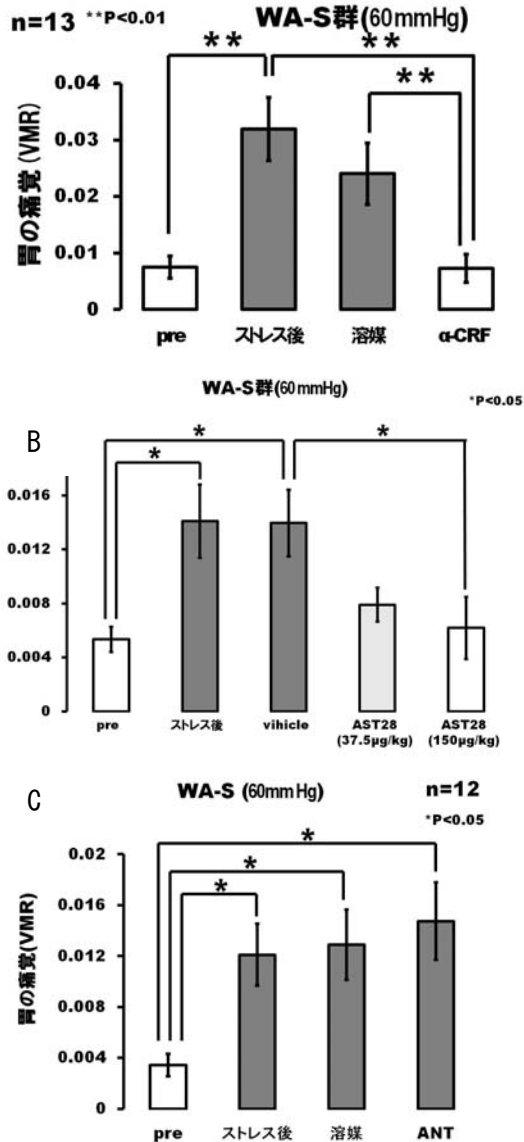


図4 亢進した胃の痛覚へのCRF拮抗薬の効果。(A) CRF拮抗薬(α-helical CRF: α-CRF. 200 µg/kg)。(B) CRF2受容体拮抗薬(Astressin2B: AST2B. 150 µg/kg)。(C) CRF1受容体拮抗薬(Antalarmin: ANT. 20 mg/kg)。

(5) 胃粘膜でのCRF、セロトニン、DRGでのTrkAの発現

胃粘膜の固有胃腺の比較的深層にCRF陽性細胞が見られた。セロトニン陽性細胞は、表層に分布し、両者は異なる細胞と思われた。一方、後根神経節では、TrkA陽性の知覚神経細胞が見られた。胃粘膜でのCRF、セロトニン、

知覚神経でのTrkAの発現はWASで変化が見られなかった。

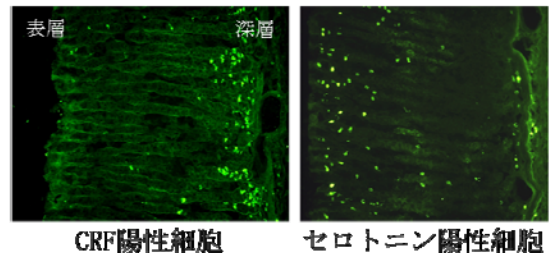


図5

(6) 考察

反復WASは結腸の痛覚を亢進させ、CRFの関与が指摘されている。ストレスによって視床下部より分泌されるCRFは、結腸に直接働きかけ、肥満細胞からNGFを含むさまざまな因子を遊離させ結腸の侵害受容器を感作し、痛覚の亢進に関わっていると考えられている(Tack and Bisschops, 2004)。またストレスは腸管粘膜の透過性を亢進させ、粘膜内に微細な炎症を起こし、それによる腸管の侵害受容器の感作や(Piche et al., 2009)、腸管細菌叢の変化を介して(Bailey et al., 2011)、結腸の運動や痛覚の変化をもたらすと考えられている。さらにCRFは交感神経系や副腎髄質を活性化し、結腸でのNGFの発現を亢進させ、知覚神経の感作を惹き起こすことも示唆されている(Winston et al., 2010)。

我々の実験ではストレスは胃の痛覚を亢進し、亢進した胃の痛覚はCRF2受容体拮抗薬で抑制された。過敏性腸症候群のモデル動物では結腸の痛覚や運動の亢進にCRF1が関与し、CRF2は逆に鎮痛に働くとの報告があり(Million et al., 2006)、胃と腸とは痛覚に関与するCRF受容体が異なる可能性がある。CRF2は胃の運動を抑制し胃内容物の排出遅延に関与することが報告されている(Martinez et al., 2002)。CRF2が胃の運動を抑制し、胃壁のコンプライアンスに変化をもたらすことが、バルーンによる胃の伸展に対する胃の痛覚に影響を与えている可能性がある。

胃の組織ではCRFとそのファミリーに属するペプチドであるurocortin1、2が消化管神経叢に発現しているとの報告がある。また受容体については、CRF1、2が神経叢や粘膜上皮、後根神経節に発現しているとの報告がある(Kim et al., 2011; Porcher et al., 2006; Yuan et al., 2012)。反復WASはCRF2やCRF2のリガンドであるCRF及びurocortin1、2の発現や機能に変化を及ぼしCRF2を介した胃の痛覚の亢進に関わっている可能性がある。また、結腸と同様に、CRFを介した肥満細胞の活性化によって肥満細胞やそのほかの免疫細胞から放出されるNGFやケミカルメディエーター、粘膜に点在する

内分泌細胞からのセロトニンがストレスによる痛覚の亢進に関与している可能性もある van den Wijngaard et al., 2010)。

FD のメカニズムとして、胃内容の排出遅延が症状の発現の重要な要因と考えられてきた 3)。しかし、本モデルでは摂餌量による胃内容の排出能の評価では明らかな遅延は見られなかった。固形物と液体の排出能を別々に比べるなど、より詳細な排出能の検討が必要を思われる。

今後は、WAS による胃の適応性弛緩や排出遅延についてのより詳細な検討や CRF とその関連ペプチドや受容体の発現の変化など、胃の機能的変化を踏まえた上で、CRF2 が胃の痛覚を亢進させる分子メカニズムの解明が必要になる。

#### (7) 結論

反復 WAS は胃の痛覚を亢進させ FD のモデルとして有用と思われた。本モデルで見られた胃の痛覚過敏には CRF2 が関与しており、FD のメカニズムとして重要と思われた。

## 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 21 件)

- ① 小酒井 友、尾崎紀之、ストレスによる機能性胃腸症モデル動物の開発、自律神経、査読無し、50(1): 31-33, 2013,
- ② Yasui M, Shiraishi Y, Ozaki N, Hayashi K, Hori K, Ichiyangi M, Sugiura Y. Nerve growth factor and associated nerve sprouting contribute to local mechanical hyperalgesia in a rat model of bone injury. EUROPEAN JOURNAL OF PAIN-LONDON, 査読有り, 16(7): 953-65, 2012, doi: 10.1002/j.1532-2149.2011.00094.x. Epub 2011 Dec 23.
- ③ 尾崎紀之【腹部症状発現メカニズムと知覚過敏】腹部症状発生のメカニズムの基礎、G. I. Research, 査読無し、19(6): 523-529,
- ④ Hayashi K, Ozaki N, Kawakita K, Itoh K, Mizumura K, Furukawa K, Yasui M, Hori K, Yi SQ, Yamaguchi T, Sugiura Y., Involvement of NGF in the rat model of persistent muscle pain associated with taut band. JOURNAL OF PAIN, 査読有り, 12(10): 1059-1068, 2011, doi: 10.1016/j.jpain.2011.04.010. Epub 2011 Jun 30.
- ⑤ 尾崎紀之、【神経消化器病学の進歩】消化管神経系の構造と機能 消化管侵害知覚の伝達経路と伝達メカニズム、医

学のあゆみ、査読無し、238(10) 891-896, 2011.

- ⑥ 尾崎紀之、消化管の痛みの解明をめざして、金沢大学十全医学会雑誌、査読無し、120(2): 72-73, 2011
- ⑦ 尾崎紀之、【なぜ胃や腸は痛くなるのか? 機能性消化管疾患の病態と診療】機能性消化管疾患の概論 腹部症状発生のメカニズムの基礎、Modern Physician, 査読無し、31(3): 276-278, 2011
- ⑧ Hori K, Ozaki N, Suzuki S, Sugiura Y. Upregulations of P2X3 and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. Pain, 査読有り, 149: 393-405, 2010, doi: 10.1016/j.pain.2010.03.005. Epub 2010 Apr 8.
- ⑨ 尾崎紀之、杉浦康夫、消化管の痛みの基礎的メカニズム、消化器心身医学、査読無し、17(1): 21-26, 2010

[学会発表] (計 18 件) 招待講演 7

- ① Ozaki N, Topical Workshop, Pain in the Proximal Gut, Characteristics and modulation of gastric afferents in gastric hyperalgesia, 14th world congress on pain, August 27-31, 2012, Milano Convention Centre, Italy.
- ② 尾崎紀之、筋骨格系の疼痛メカニズム解明へのアプローチ、痛みのグループディナー2012年3月29日(木曜日)松本東急イン 「メイプルルーム」、長野県
- ③ 尾崎紀之、胃の痛みに関わる内臓知覚神経とその感作機構、金沢大学政策課題対応型研究推進 第2回 脳・肝インターフェースメディスン研究センターシンポジウム 「食」による生活習慣病予防医学の展開、2011年12月2日(金)、KKR 金沢、石川県
- ④ 尾崎紀之、特別講演、動物モデルを用いた痛みの基礎的メカニズムの解明、平成23年度日本薬学会北陸支部 第123回例会、2011年11月27日(日)、金沢大学自然科学研究棟 (103 講義室、104 講義室、レクチャーホール)、石川県
- ⑤ 尾崎紀之、シンポジウム(11)慢性ストレスとホメオスタシスの破綻、座長 木山博資、ストレスによる機能性胃腸症モデル動物の開発、第64回日本自律神経学会総会、2011年(平成23年)10月27日(木)・28日(金)、秋田ビューホテル、秋田県
- ⑥ 尾崎紀之、胃の痛覚過敏に関わる一次知覚神経の感作機構、第88回日本生理学会大会第116回日本解剖学会総会・全

国学会合同大会シンポジウム 27、内臓痛：生命を支える臓器のホメオスタシス維持機構の破綻としての警告信号，2011年3月29日、パシフィコ横浜，神奈川県

- ⑦ 尾崎紀之，胃の痛覚過敏に関与する一次知覚神経の求心性活動，第18回泌尿生殖器における信号物質の局在と役割に関する研究会－自律神経求心性活動について－，平成22年9月11日（土），秋田大学大学院医学系研究科 器官・統合生理学講座，秋田県
- ⑧ 尾崎紀之，胃の痛覚過敏に関わる一次知覚神経の感作機構，第16回 PharmaScience フォーラム北海道大学領域融合研究ユニット心身相関学研究室キックオフシンポジウム、心のいたみ・お腹のいたみ、平成22年5月14日（金）北海道大学薬学部臨床薬学講義室、北海道

〔図書〕（計3件）

- ① 尾崎紀之、鎮痛薬の作用を理解するための解剖，[痛みの Science&Practice] シリーズ，第3巻：痛みの薬物治療，編集、表圭一、山本達郎、井関雅子、川真田樹人，文光堂，印刷中
- ② 尾崎紀之、消化管侵害知覚の伝達経路と伝達メカニズム，【神経消化器病学の進歩】 消化管神経系の構造と機能，pp. 5-10，医歯薬出版，2012

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.kanazawa-u.ac.jp/outline/gaiyou/dep01/dep1-05.html>

<http://anatomy-2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 紀之 (OZAKI NORIYUKI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40244371

### (2) 連携研究者

易 勤 (YI TSUTOMU)

首都大学東京・健康福祉学部・教授

研究者番号：70334753

山口 豪 (YAMAGUCHI TAKESHI)

金沢大学・医学系、助教

研究者番号：60532182