

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590925

研究課題名(和文) 消化器疾患関連睡眠障害におけるサロゲートマーカーの探索

研究課題名(英文) Surrogate marker for sleep disturbances in gastrointestinal diseases

## 研究代表者

藤原 靖弘 (FUJIWARA, YASUHIRO)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40285292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット慢性酸逆流性食道炎モデルを用いて検討を行った。脳波解析による睡眠への影響では逆流性食道炎ラットにおいて、コントロール群と比較して、明期における覚醒時間の増加、NREM睡眠時間の減少、短時間NREM睡眠回数の増加・長時間NREM睡眠回数の減少、デルタパワー低下を認め、睡眠断片化や質の低下を伴う睡眠障害が惹起されていることが判明した。このような睡眠障害はプロトンポンプ阻害薬の投与により改善した。これらのラット血清よりエキソソーム由来のmiRNAを抽出し網羅的解析を行ったところ、主として6つのmiRNA発現増加、5つのmiRNA発現低下が確認された。

研究成果の概要(英文)：Sleep condition in rats was assessed by electroencephalography using a chronic acid reflux esophagitis model. Wake periods significantly increased in rats with reflux esophagitis compared with control while NREM periods significantly decreased. An increase in short NREM bouts and a decrease in long NREM bouts as well as a decrease in delta power density in rats with reflux esophagitis suggested the presence of sleep fragmentation and poor sleep quality in rats with reflux esophagitis. Such sleep disturbances were improved by the treatment with proton pump inhibitors. Microarray analysis using miRNA in serum exosome showed increased expression of six miRNAs and decreased expression of five miRNAs in rats with reflux esophagitis compared with control.

研究分野：医歯薬学

キーワード：睡眠障害 逆流性食道炎 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

逆流性食道炎、機能性ディスペプシア、過敏性腸症候群、クローン病など様々な消化器疾患と睡眠障害との関連が指摘されている。特に逆流性食道炎を含む胃食道逆流症 (GERD, gastroesophageal reflux disease) は食生活の欧米化やヘリコバクター感染率の減少により本邦でもその罹患率は著増している。日本消化器病学会ガイドラインでは「GERD は睡眠障害と密接な関連がある」とのステートメントが記載され、その重要性が指摘されている。われわれの報告では GERD 患者の約 50% に睡眠障害が合併しており、これは一般成人における睡眠障害罹患率よりも高い。このような睡眠障害を合併した GERD 患者では生活の質 (QOL) 低下、日中の眠気、労働生産性の低下が報告されているとともに、逆に消化器症状を認めない Silent GERD が睡眠障害のみを訴えている可能性も示唆される。

GERD 患者では重症になると日中のみならず夜間の逆流が認められる。このような夜間の逆流は夜間胸やけ症状として自覚され、特に睡眠中の胸やけ症状は中途覚醒をきたし睡眠 QOL を低下させる。しかしながら最近の国外での研究では夜間の逆流が入眠前仰臥位で最も多いこと (= 入眠障害)、症状を認めない無意識の短時間覚醒による睡眠断片化、起床時の逆流増加 (= 早朝覚醒) など様々な睡眠障害との関連が判明してきた。一方、不眠により体性痛のみならず内臓痛に対しても痛覚閾値が低下し、知覚過敏を惹起させ胸やけ症状を増悪することが報告されている。実際われわれの検討においても睡眠障害合併は非びらん性逆流症において頻度が

高く、知覚過敏の存在を示唆するものである。

したがって GERD を含めた消化器疾患と睡眠障害は双方関連を認めることが示唆されている。治療戦略の観点からは、GERD 関連睡眠障害であれば GERD 治療により両疾患は改善する。しかし、睡眠障害の治療のみを行えば夜間の逆流はマスクされた状態になり、かえって GERD は悪化するので適切な治療ではない。一方、両疾患が独立したものであれば両方を治療する必要がある。したがって GERD 関連睡眠障害か GERD 非関連睡眠障害かを鑑別することは治療上、極めて重要である。同様のことは過敏性腸症候群を含めた様々な消化器疾患に当てはまると言える。しかしながら、実際の臨床では両者の鑑別は極めて困難であり、新たな簡便なマーカーが必要である。

マイクロ RNA (miRNA) は 19-23 塩基の小さな non-coding RNA であり、様々な遺伝子の発現を翻訳後あるいは転写レベルで制御している。最近、細胞外に分泌されるタイプの miRNA (分泌型 miRNA) が存在し、特に血清中 miRNA は癌研究の分野のトピックの一つとなっている。血清中の miRNA は細胞から分泌されるエクソソームに包まれており、酸・熱などに安定しているためその解析は各種疾患や疲労・ストレスなどのサロゲートマーカーとして期待されている。

## 2. 研究の目的

ラットモデルにおける逆流性食道炎と睡眠障害の相互関連についての検討と miRNA をターゲットとした血清サロゲートマーカー探索 (網羅的 miRNA 解析) を行うことである

### 3. 研究の方法

#### (1) 逆流性食道炎が睡眠に与える影響

小村らの方法に従い、ラットの前胃を結紮し、幽門部近傍の十二指腸を 18Fr ネラトンカテーテルで被覆することによりラット慢性酸逆流性食道炎モデルを作成した。術後 1 週間後に、脳波測定用の電極を頭蓋骨に固定した。同時にコントロール群として腹部正中切開のみ施行したラットを用いた。電極固定 10 日後にラットを外部の騒音の影響のない脳波測定用のケージへ移動させ、脳波測定をおこなった。脳波の解析は SLEEPSIGN software (Kissei Comtec, Nagano, Japan) を用い、wake、non-REM (NREM) 睡眠、REM 睡眠時間をそれぞれ測定し、睡眠障害の有無を調べた。睡眠障害に対する PPI の効果を検討するために、逆流性食道炎作成後 20 日目より 24 時間脳波を計測し、Pre-PPI 群とした。その翌日より 2 日間、オメプラゾール 20 mg/日を皮下投与し、最終投与日翌日より 24 時間脳波を計測したものを On-PPI 群、PPI 最終投与日の 3 日後より 24 時間、脳波を計測したものを Post-PPI 群とした。PPI の胃酸分泌に及ぼす影響について幽門結紮法により検討した。

#### (2) マイクロ RNA チップを用いたサロゲートマーカー探索

ラットより血液を採取し、血清より miRNA を抽出し、アジレント DNA チップを用いて網羅的に miRNA の発現量の変化を解析した。

得られたデータより有意な発現量の変化を認めた miRNA については特異的プローブを用いた定量 PCR を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 逆流性食道炎が睡眠に与える影響

逆流性食道炎群のラットでは、いずれも肉眼的に食道中下部に白色調粘膜肥厚、潰瘍の形成を認め、組織学的に基底細胞過形成、乳頭延長、炎症細胞浸潤を伴う粘膜肥厚を認めた。明期における wake 時間は逆流性食道炎群において  $232.2 \pm 11.4$  分、コントロール群

において  $173.3 \pm 7.4$  分と、逆流性食道炎群で 34% の有意な増加を認めた。同時に NREM 睡眠時間は逆流性食道炎群において有意な減少を認めた (図 1)。暗期では、wake 時間や NREM 睡眠時間に影響を与えなかったが、REM 睡眠時間は逆流性食道炎群において有意な増加を認めた。1 時間ごとの wake 時間・REM 睡眠時間・NREM 睡眠時間を計測したところ、点灯初期にあたる午前 10 時~12 時、消灯前である午後 6 時~7 時に、逆流性食道炎群において NREM 睡眠時間の低下および Wake 時間の増加が有意に観察された (図 1)。逆流性食道炎群においては、コントロール群と比較し、短い NREM 睡眠の回数が有意に増加し、長い NREM 睡眠の回数は減少していた。逆流性食道炎群では頻回な stage 変化 (NREM → wake、NREM → REM) を認めた。以上より逆流性食道炎群では、正常の睡眠パターンが崩壊され、睡眠断片化が起きていることが判明した。

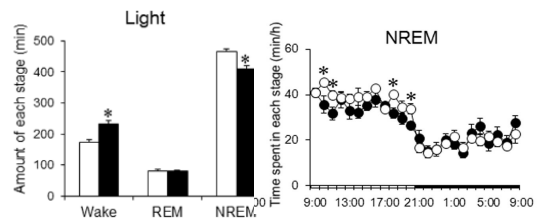


図 1. ラット逆流性食道炎における睡眠障害の検討

明期における NREM 睡眠時間は、Pre-PPI 群では  $361.7 \pm 10.4$  分、On-PPI 群では  $402.1 \pm 8.1$  分と、On-PPI 群で 9.6% 有意に増加し、一方で wake 時間は On-PPI 群で有意に減少していた。On-PPI 群と Post-PPI 群の NREM 睡眠時間の比較では、Post-PPI 群で NREM 睡眠時間は 10.1% の有意な減少が見られた (図 2)。On-PPI 群では Pre-PPI 群と比較し、長い NREM 睡眠の回数が増加したが、短い NREM 睡眠の回数は減少した。このような、有意な変化は Post-PPI 群で消失した (図 2)。1 回あたりの平均 NREM 睡眠時間は Pre-PPI 群で

72.5±2.1 秒、On-PPI 群で 91.9±6.8 秒と、On-PPI 群で有意に増加していたが、Post-PPI 群と Pre-PPI 群との間ではこのような有意差は見られなかった。今回用いた PPI の用量は On-PPI に相当する時間帯に十分な胃酸分泌抑制作用を認めることを確認した。

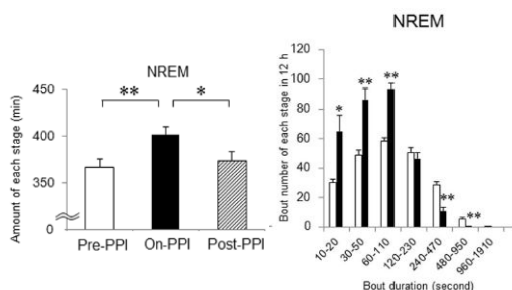


図 2 . ラット逆流性食道炎の睡眠障害に対する PPI の効果

### (2) マイクロ RNA チップを用いたサロゲートマーカー探索

網羅的な解析を行ったところ、主として6つの miRNA 発現増加、5つの miRNA 発現低下が確認された。図3はその代表例を示している。さらにこれらの miRNA について Real-time PCR 法によりその発現の変化を確認した

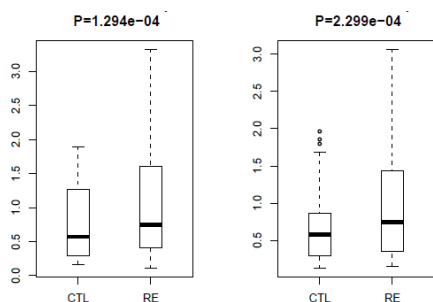


図3 網羅的解析結果(一部)

結語：ラット逆流性食道炎において、ヒトと同様に睡眠障害が起こっており、その機序として酸逆流が関与している。血清エキソソーム由来の miRNA 発現量に違いがあることが判明した。

### 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計10件)

1. Fujiwara Y, Kohata Y, Nakahara K, Tanigawa T, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Arakawa T. Characteristics of nighttime reflux assessed using multichannel intraluminal impedance pH monitoring and a portable electroencephalograph. *Dis Esophagus*. 査読有 2015. doi: 10.1111/dote.12324.
2. Iwakura N, Fujiwara Y, Tanaka F, Tanigawa T, Yamagami H, Shiba M, Tominaga K, Watanabe T, Iijima K, Koike T, Walls AF, Arakawa T. Basophil infiltration in eosinophilic oesophagitis and proton pump inhibitor-responsive oesophageal eosinophilia. *Aliment Pharmacol Ther*. 査読有 2015;41(8):776-84. doi: 10.1111/apt.13141.
3. Kohata Y, Fujiwara Y, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Arakawa T. Usefulness of baseline impedance in patients with proton pump inhibitor-refractory nonerosive reflux disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有 2015;30 Suppl 1:36-40. doi: 10.1111/jgh.12743.
4. Hiramoto K, Fujiwara Y, Ochi M, Okuyama M, Tanigawa T, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Arakawa T. Effects of esomeprazole on sleep in patients with gastroesophageal reflux disease as assessed on actigraphy. *Intern Med*. 査読有 2015;54(6):559-65. doi: 10.2169/internalmedicine.54.3718.
5. Tsukahara T, Watanabe K, Watanabe T, Yamagami H, Sogawa M, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Maeda K, Hirakawa K, Arakawa T. Tumor necrosis factor  $\alpha$  decreases glucagon-like peptide-2 expression by up-regulating G-protein-coupled receptor 120 in Crohn disease. *Am J Pathol*. 査読有 2015;185(1):185-96. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.09.010.
6. Nakahara K, Fujiwara Y, Tsukahara T, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Watanabe T, Urade Y, Arakawa T. Acid reflux directly causes sleep disturbances in rat with chronic esophagitis. *PLoS One*. 査読有 2014;9(9):e106969. doi: 10.1371/journal.pone.0106969.
7. Fujiwara Y, Arakawa T. Overlap in patients with dyspepsia/functional dyspepsia. *J Neurogastroenterol Motil*. 査読有 2014;20(4):447-57. doi: 10.5056/jnm14080.
8. Nagami Y, Tominaga K, Machida H, Nakatani M, Kameda N, Sugimori S,

Okazaki H, Tanigawa T, Yamagami H, Kubo N, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Iguchi H, Fujiwara Y, Ohira M, Hirakawa K, Arakawa T. Usefulness of non-magnifying narrow-band imaging in screening of early esophageal squamous cell carcinoma: a prospective comparative study using propensity score matching. Am J Gastroenterol. 査読有 2014;109(6):845-54. doi: 10.1038/ajg.2014.94.

9. Kohata Y, Fujiwara Y, Kato K, Tanaka F, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Tateishi C, Tsuruta D, Arakawa T. Successful treatment of betamethasone syrup on autoimmune esophagitis. Am J Gastroenterol. 査読有 2014;109(3):451-3. doi: 10.1038/ajg.2013.455.
10. Muraki M, Fujiwara Y, Machida H, Okazaki H, Sogawa M, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Arakawa T. Role of small intestinal bacterial overgrowth in severe small intestinal damage in chronic non-steroidal anti-inflammatory drug users. Scand J Gastroenterol. 査読有 2014;49(3):267-73. doi: 10.3109/00365521.2014.880182.

〔学会発表〕(計2件)

1. Fujiwara Y, Kohata Y, Nakahara K, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Arakawa T. Characteristics of nighttime reflux assessed by using multi-channel intraluminal impedance pH monitoring and a portable electroencephalograph UEGW (ウィーン、オーストリア) 2014年10月21日
2. Fujiwara Y, Watanabe T, Tominaga K, Habu D, Ashida K, Kusano M, Higuchi K, Arakawa T. Association between sleep disturbances and refractory GERD symptoms in patients receiving once-daily PPI and efficacy of twice daily rabeprazole treatment UEGW (ベルリン、ドイツ) 2013年10月15日
3. Nakahara K, Fujiwara Y, Kohata Y, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Arakawa T. Effects of Aspirin in Acid Reflux Esophagitis in a Rat Model DDW (オランダ、米国) 2013年5月21日

〔図書〕(計3件)

1. 藤原靖弘. 医学出版. 画像で見ぬく消化器疾患 vol. 1 上部消化管好酸球性食道炎 2014年総ページ数 214頁 担当部分 p.50-51
2. 藤原靖弘 南江堂. 好酸球性消化管疾患

診療ガイド 好酸球性食道炎 4.治療・予後 2014年 総ページ数 103頁 担当部分 p.42-46

3. 藤原靖弘. 西村書店. カラー版 消化器病学 基礎と臨床 食道潰瘍 2013年 総ページ数 1541ページ、P538-540

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 靖弘 (FUJIWARA, Yasuhiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40285292

(2)研究分担者

富永 和作 (TOMINAGA, Kazunari)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80336768

渡辺 俊雄 (WATANABE, Toshio)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50336773

谷川 徹也 (TANIGAWA, Tetsuya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70423879