

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460940

研究課題名(和文) 下部食道括約筋における筋原性緊張調節機序の解明と新規食道アカラシア治療薬の開発

研究課題名(英文) Investigation of myogenic tone regulation in lower esophageal sphincter to develop novel treatments for achalasia

研究代表者

伊原 栄吉 (Ihara, Eikichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80612390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アカラシアの新規治療の開発を目指し、下部食道括約筋(lower esophageal sphincter; LES)の安静時張力を維持する筋原性筋緊張調節の機序の解明を行った。LES安静時張力の維持にNa⁺/Ca²⁺交換機転(NCX)を介した細胞質Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、このNCXを制御する因子として、gasotransmitterの1つである硫化水素(H₂S)が重要な役割を果たすことを解明し、H₂S/NCXの経路は、アカラシアの新規治療のターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to investigate the mechanisms of myogenic tone regulation of lower esophageal sphincter to develop novel treatments for achalasia. The cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) is a key role in maintenance of basal tone of LES. Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) contributed to controlling the [Ca²⁺]_i more than L type Ca²⁺ channels. Furthermore, we have found that gasotransmitter hydrogen sulfate (H₂S) plays an important role in regulation of NCX. Two H₂S-generating enzymes, cystathione-g-synthase (CBS) and 3-mercaptopyruvate (3-MST), were responsible for endogenous H₂S production in LES. A H₂S/NCX pathway could be a novel therapeutic target for achalasia.

研究分野：消化管運動

キーワード：アカラシア 下部食道括約筋 筋原性筋緊張調節 硫化水素 食道運動異常症

1. 研究開始当初の背景

絶妙に協調した消化管運動はヒトの生命維持に必要不可欠である。消化管運動を担うのは、大きく、脳から繋がる外来神経(交感神経、副交感神経)、消化管壁内に存在する内在神経(アウエルバッハ神経叢)、消化管ペースメーカー細胞(カハールの介在細胞:ICC)、そして実際に消化管運動を担う消化管平滑筋の4つである。これらが絶妙に連携し合うことで協調した消化管運動が可能となるが、このいずれかが障害されると消化管運動障害が引き起こされる。

食道運動異常症の代表的な疾患であるアカラシアは、「LESの弛緩不全と食道体部の蠕動障害」を特徴とする疾患である。一般的にその病態はLESを制御する、神経伝達物質をNO(Nitric oxide)及びVIP(vasoactive intestinal peptide)とする抑制系のnon-cholinergic non-adrenergic 作動性神経の障害により発症すると考えられている。すなわち、アカラシア患者では、LES領域のアウエルバッハ神経叢において、NO合成酵素含有細胞が消失または減少していること(*Eur J Clin Invest* 1993;23:724-728 *Am J Gastroenterol* 1999;94:2357-2362)、及びVIP含有神経線維が減少し、VIP濃度が減少していることが示されている(*Gastroenterology* 1983;84:924-927)。また、アカラシア患者のLESにおいて、NO合成酵素の低下に相関して、ICCの減少及びICCネットワークの消失が食道アカラシアの重要な病態の1つと報告された(*Am J Gastroenterol* 2008;103:856-864)。

このような中、アカラシアでは、なぜ抑制系の神経だけが障害され、LES弛緩不全が引き起こされるのかという大きな疑問が生じる。この疑問の答えの1つとしてLESが独特な収縮調節機序を有していることが考えられる。括約筋機能をもつLESは、食道体部平滑筋では認めるとはしない筋原性緊張調節機能(myogenic tone regulation)を有し、収縮系のcholinergic 作動性神経の関与が体部平滑筋と比較して少ないという性質を持っている(*Neurogastroenterol Motil* 2011;23:819-830)。この性質はLES機能を考慮した場合、非常に利にかなっている。すなわち、通常はLESの筋原性緊張調節により一定のbasal toneを維持し、胃から食道への逆流を防止する。嚥下時や胃内に溜まったガスの減圧時には、抑制系のnon-cholinergic non-adrenergic 作動性神経が働いて、嚥下時の一過性LES弛緩反応及び胃内圧減圧時のtransient LES relaxation (TLESR)を引き起こされると考えられる。したがって、アカラシアではLESを制御する神経系が障害され、LESが本来もっている筋原性緊張調節による

basal toneのみが顕在化することが、LES弛緩不全を引き起こす1つの原因と考えられる。また、アカラシアでは、LESの筋原性緊張調節そのものに障害を来している可能性があるが、詳細は不明である。

現在、LES basal toneの制御を標的とした薬物治療として、Ca²⁺拮抗剤、NOドナー及びある種の漢方薬が用いられることがあるが効果が十分でなく、もっぱらLESの筋層を破壊する侵襲的な治療が行われているのが現状である。この原因として、LES basal toneの制御機序が一般の平滑筋収縮機序と大きく異なっていることが考えられ(*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;283:G407-G416)、このユニークな制御機序をもつLES basal toneを標的としたアカラシアの新規薬物治療の開発が期待されていた。すなわち、このようなアカラシアの新規治療薬の開発するためには、標的となるLES basal toneの新規機序を解明することが必要であった。その様な状況下、最近、臨床検査として高解像度食道内圧検査が登場し、アカラシアに認めるLES機能障害の病態を実臨床にて詳細に評価できるようになったことで、新規アカラシアの治療薬を開発する環境が整ったと言える。

2. 研究の目的

- (1) LES basal toneを維持する筋原性筋緊張調節する新規機序の解明
- (2) アカラシアの前段階とされる食道胃接合部通過障害(EGJ00)に認めるLES弛緩不全の機序解明

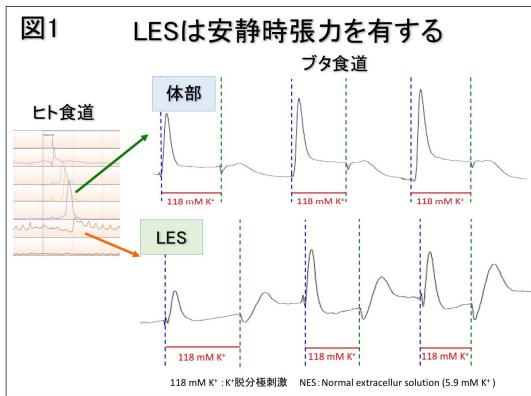
3. 研究の方法

- (1) ブタ食道はラットやマウスと比較して、解剖学的にヒト食道に類似することが示されている。屠殺場からブタ食道胃接合部を採取し、LES輪走平滑筋条片を作成する。LES輪走平滑筋条片が有する安静時張力に対する各種薬理的阻害剤の効果を、等尺性張力を測定し検討する。必要に応じて、Ca²⁺蛍光指示薬であるFura-2を負荷し、筋原性緊張調節に対する細胞内Ca²⁺の役割について検討する。
- (2) アカラシア前段階とされるEGJ00患者に対して高解像度食道内圧検査(Manoscan ZTM)を施行する。Manoscan ZTMにて得られたデータは、ManoViewにて解析し、EGJ00の病態解析を行った。

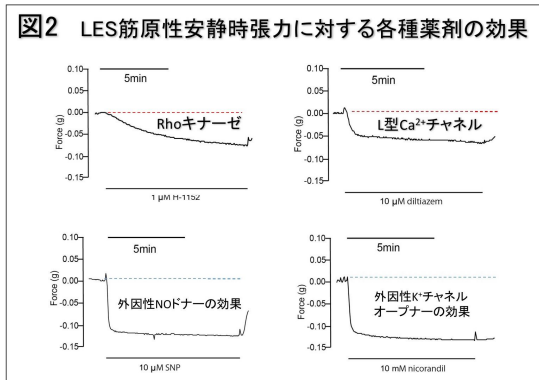
4. 研究成果

- (1) ブタLES安静時張力に対する各種薬剤の効果の検討：
ヒト食道平滑筋部は、安静時張力を有しないフェージックな性質をもつ食道体部と安静

時圧を有するトーニックな性質をもつLES部に分類されるが、高解像度食道内圧検査では、その2つの平滑筋の特徴が明らかである(図1)。ブタ食道平滑筋の特徴を調べたところ、ヒト食道と同様の性質を示した。すなわち、ブタLESは安静時張力を有したが(図1)、この安静時張力に、神経毒 tetrodotoxin 及び ICC と平滑筋の gap junction を阻害する carbenoxolone は何ら影響を与えず、ブタLESが有する安静時張力は、筋原性筋緊張調節作用によるものと考えられた。



最初に、ブタLESが有する筋原性安静時張力の機序を解明するために各種薬剤の効果を検討した。Rho キナーゼ阻害剤である H-1152 (1 μ M) は、LES 安静時張力を 0.08g 程度弛緩させた。また、L 型 Ca^{2+} チャンネルブロッカーである Diltiazem (10 μ M) は、LES 安静時張力を 0.05g 程度弛緩させた。これらの結果は、安静時に Rho キナーゼや L 型 Ca^{2+} チャンネルが活性されており、LES 筋原性筋緊張調節に関与していることを示す。一方、ブタLESが有する筋原性安静時張力に対する外因性一酸化窒素及(NO)ドナーである SNP (10 μ M) の弛緩効果を検討したところ、最大で、0.1g 程度の弛緩反応を認めた。一方、外因性 K^+ チャンネルオープナーである nicorandil (10 μ M) は、SNP とほぼ同様の弛緩反応を認めた(図2)。これらの4つの薬剤は、LES 安静時張力を低下させるもののその効果は限定的で、アカラシアの治療薬としては満足でない。既に、実

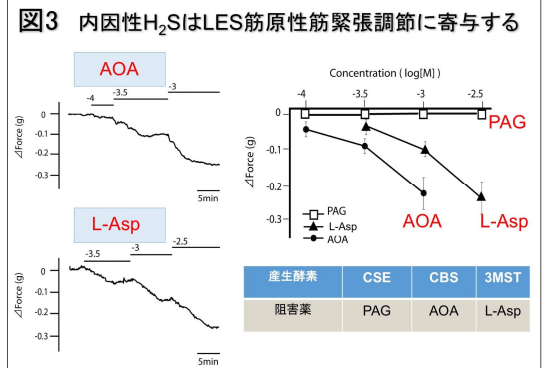


臨床において、アカラシアの治療目的に Diltiazem や Nicorandil は用いられているが、この効果は限定的である。すなわち、アカラシア治療薬開発を目差すには、治療薬開発の標的となる LES 筋原性筋緊張調節を司る新たな機序を解明する必要があると考えられた。

そのような中、Gasotransmitter の1つである H_2S がブタLES筋原性安静時張力の維持に重要な役割を果たすことを見出した。

(1) - ブタLES筋原性安静時張力における内因性 H_2S の役割と機序の解明:

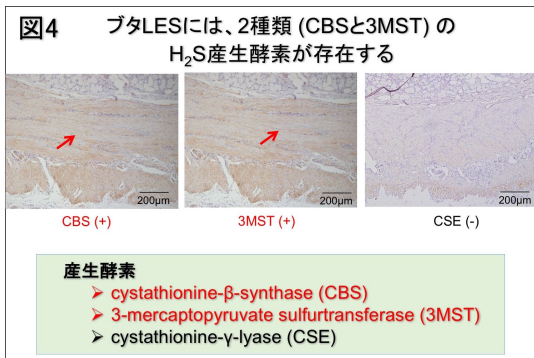
H_2S は、一酸化窒素及 (NO) 及び一酸化炭素と並び、生理機能に重要な役割を果たす gasotransmitter の一つである。細胞内に存在する3つの産生酵素 (cystathionine-synthase (CBS)、cystathionine-lyase (CSE)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST)) により産生される。これら H_2S 産生酵素の発現量と活性は、動物種、組織によって異なる。LES の収縮調節において、NO が重要な役割を果たすことは広く知られているが、 H_2S の役割については未だ解明されていなかった。ブタLES筋原性安静時張力に対する各種 H_2S 産生酵素阻害剤の効果を、等尺性張力を測定し検討した。必要に応じて、細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力の同時測定を行った。



LES 筋原性安静時張力は、CBS 阻害薬 aminooxyacetic acid (AOA) 及び 3MST 阻害薬 aspartate (Asp) により濃度依存性に抑制されたが、CSE 阻害酵素 DL-propargylglycine (PAG) では抑制されなかった(図3)。AOA または L-Asp 単独が引き起こす弛緩反応はそれぞれ 0.2g 程度であったが、AOA 及び Asp の同時投与 (AOA+Asp) により得られた弛緩反応には 0.3g に達した。AOA+Asp が引き起こす弛緩反応 (0.3g) は、前述の Rho キナーゼ阻害剤や L 型 Ca^{2+} チャンネルブロッカー投与にて得られた弛緩反応 (0.1g) の程度と比較して、有意に大きな反応であり、Rho キナーゼや L 型 Ca^{2+} チャンネルのそれと比較して、 H_2S が LES 筋原性安静時張力の維持により重要な役割

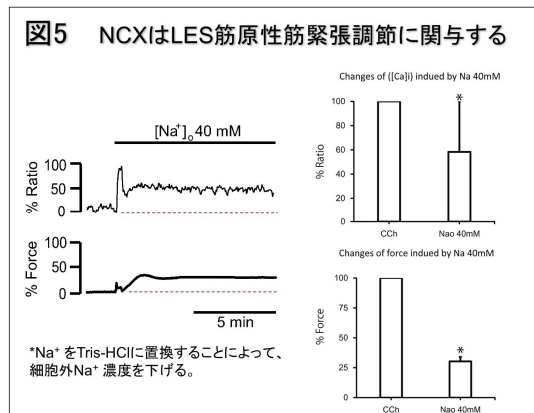
を果たしていることが示唆された。なお、AOAあるいはAspの単独投与により得られたLES弛緩反応の程度は、H₂S産生酵素基質であるL-cysteine (L-Cys)の投与することで減弱したため、各種阻害剤の非特異的またはtoxicな反応ではないと考えられた。

また免疫組織化学染色を行って、ブタLESにおけるH₂S産生酵素の発現を検討したところ、上記の結果と一致して、CBSとAOAの発現を認められたが、CSEの発現は認められなかった(図4)。



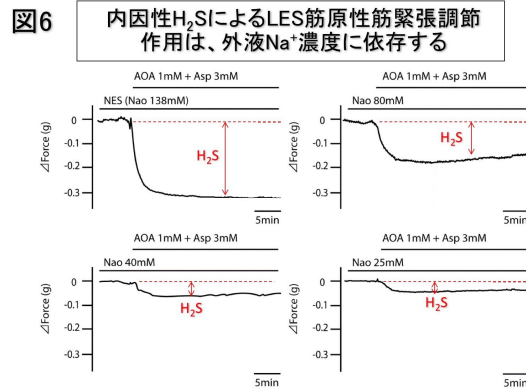
次に、内因性H₂SがLES筋原性安静時張力を維持する機序の解明を行った。High K⁺ (K 118mM, Na 25mM)刺激による収縮の最中に、AOA+Aspを投与したところ、何ら反応を示さなかった。High K⁺による収縮反応は、L型Ca²⁺チャンネルブロッカーにて、抑制されることから、AOA+Aspが引き起こす弛緩反応に、L型Ca²⁺チャンネルは関与していないと考えられた。そこで、前収縮を高張High K⁺ (K⁺ 118mM, Na⁺ 137mM)に変更したところ、再びAOA+Aspが引き起こす弛緩反応が認められ、H₂Sが有するLES収縮作用が細胞外Na⁺濃度依存性である可能性が考えられた。また、細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)と張力の同時測定にて更なる解析を行ったところ、AOA+Aspにより得られるLES弛緩反応は[Ca²⁺]_i低下を伴う弛緩反応であった。以上の結果から、H₂Sのによる収縮作用には、Na⁺/Ca²⁺交換機転(NCX)が関与する可能性が示唆されたため、次の実験を行った。

ブタLESにおいて、Na⁺をTris-HClに置換



することによって、細胞外Na⁺ ([Na⁺]_o)を40mMまで低下させたところ、持続性の[Ca²⁺]_i上昇を伴う持続性収縮反応を認め(図5)、LES筋原性安静時張力にNCXが関与していることが示唆された。

興味深いことに、AOA+Aspによる弛緩反応は、Tris-HCl置換による[Na⁺]_oを低下させると、[Na⁺]_oに反比例して抑制された(図6)。

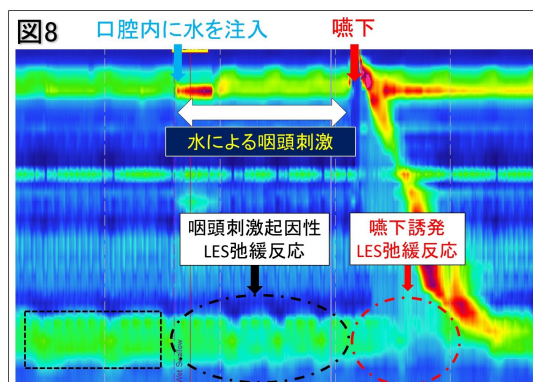


以上の結果から、H₂Sは、NCXを介しLESの筋原性安静時張力の維持に貢献していることが明らかとなった。LESの筋原性安静時張力維持におけるH₂Sの効果は、RhoキナーゼやL型Ca²⁺チャンネルよりも大きいため、アカラシアの新規治療薬開発の標的となる。

(2) 臨床研究として、アカラシア前段階とされるEGJ00に認めるLES弛緩不全の機序の解明。

EGJ00は前アカラシア状態を考慮されており、EGJ00の病態解明は、アカラシア発症の予防医療につながるため、大変重要である。

EGJ00の病態解明には、食道生理運動機能の詳細な評価が必要であった。最近、高解像度食道内圧検査の登場とデータ解析技術の進歩によって、病態解析が可能となった。食道の近位側1/3は横紋筋で構成され、食道遠位2/3は平滑筋から構成されるが、さらに平滑筋部はその特徴から食道体部と安静時圧を有する特殊化したLESに分類される。安静



時、食道体部に張力発生は認めずLESは一定張力を維持し、胃内容物の食道側への逆流を

防止する。一旦、食塊摂取が始まると、LESは弛緩、食道体部には蠕動運動が誘発され、食塊が食道入口部から胃へと送り込まれる。

我々は、食塊摂取時のLESの弛緩反応は、咽頭刺激起因性LES弛緩反応と嚥下刺激誘発LES弛緩反応の両方の反応が必要であることを明らかにした(図8)。

次にEGJ00の病態解明のため次のような検討を行った。2012年11月から2016年4月まで、当院で高解像度食道内圧検査にて、EGJ00と診断された13名と正常食道蠕動を認めた20名を対象とした。評価項目としてBasal LES pressure (BLESP) と integrated relaxation pressure (IRP)を計測した。さらに、咽頭水刺激によるLES弛緩反応の程度(咽頭刺激起因性LES弛緩反応)をBLESPと仰臥位で口腔内に5mlの水を含んだ嚥下直前の5秒間のLESの平均値との差により評価した。

BLESPは、正常群(34.6 ± 2.1 mmHg)とEGJ00群(32.7 ± 1.8 mmHg)とに有意差は認めなかった。一方、IRPに関しては、EGJ00群(20.3 ± 1.4 mmHg)は、正常群(10.8 ± 0.6 mmHg)と比べて有意に高値であった。正常群では1回目の嚥下直前、仰臥位での口腔咽頭

図9 EGJ00では咽頭刺激性LES弛緩反応が障害される

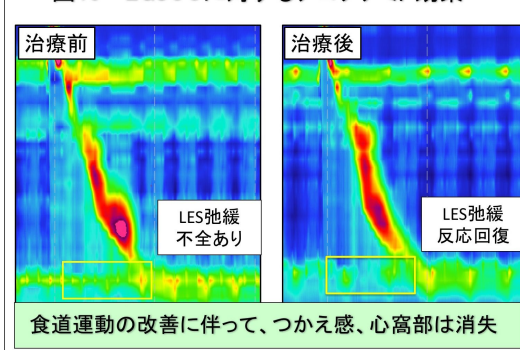
HRM parameter	normal(19)	EGJ00(20)	p-value
BLESP (mmHg)	34.6 ± 2.1	32.7 ± 1.8	n.s.
IRP (<15mmHg)	10.8 ± 0.6	20.3 ± 1.4	< 0.05
水咽頭刺激後 LES圧 (mmHg)	25.6 ± 1.4	33.0 ± 1.6	< 0.05
咽頭刺激性LES弛緩反応(mmHg)	9	0.11	< 0.05
嚥下刺激誘発LES弛緩反応 (mmHg)	0.5	0.6	n.s.

内に5mlの水を注入することで、LES値は34.6 ± 2.1 mmHgから25.6 ± 1.4 mmHgへと速やかに低下した。すなわち、正常群では9.0 mmHgの咽頭刺激性LES弛緩反応を認めた。一方、EGJ00群において、水咽頭刺激後のLES値は33.0 ± 1.6 mmHgであり、BLESP(32.7 ± 1.8 mmHg)と比較し、有意な低下は認められず、咽頭刺激性LES弛緩反応が障害されていた。一方、EGJ00群における嚥下刺激性LES弛緩反応の程度(0.6)は、正常(0.5)とほぼ同様の反応を示し、EGJ00群において嚥下性LES反応の障害は認めなかった。すなわちアカラシアは、咽頭刺激起因性LES弛緩反応と嚥下刺激誘発LES弛緩反応の両方が障害されているのに対し、前アカラシア状態であるEGJ00は、咽頭刺激起因性LES弛緩反応のみが障害されていることが明らかとなった(図9)。

さらに興味深いことに、EGJ00患者に対し、

機能性ディスペプシア治療薬であるアコチアミドを投与したところ、障害されていた咽頭刺激性LES弛緩反応が回復し、症状も改善した(図10)。コリンエステラーゼ阻害剤であるアコチアミドは、EGJ00治療薬及びアカラシア予防薬となる可能性があり、さらなる研究を進めていくことが重要である。

図10 EGJ00に対するアコチアミド効果



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5件)

Ihara E, Muta K, Fukaura K and Nakamura K. Diagnosis and treatment strategy of achalasia subtypes and esophagogastric junction outflow obstruction based on high-resolution manometry. *Digestion* 2017;95(1):29-35

Bai X, Tanaka Y, Ihara E, Hirano K, Nakano K, Hirano M, Oda Y and Nakamura K. Trypsin induces biphasic muscle contraction and relaxation via transient receptor vanilloid 1 and neurokinin receptor 1/2 in porcine esophageal body. *Eur J Pharmacol*. 2017 Jan 11;797:65-74.

Tanaka Y, Ihara E, Nakamura K, Muta K, Fukaura K, Mukai K, Bai X and Takayanagi R. Clinical characteristics associated with esophageal motility function. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jun;31:1133-1140.

Muta K, Ihara E, Fukaura K, Tsuchida O, Ochiai T, Nakamura K. Effects of acotiamide on esophageal motility function in patients with esophageal motility disorders: a pilot study. *Digestion*. 2016 Jun 22;94:9-16.

Tanaka Y, Ihara E, Hirano K, Takahashi

S, Hirano M, Nakamura K, Akiho H, Oda Y and Takayanagi R. Trypsin-induced biphasic regulation of tone in the porcine lower esophageal sphincter. *Eur J Pharmacol* 2015 Apr;752:97-105.

[学会発表](計7件)

Muta K, Ihara E, Fukaura K, Bai X, Tanaka Y, Tsuchida O, Ochiai T, Iwasa T, Aso A, Nakamura K. Mechanisms of acotiamide-sensitive impaired lower esophageal sphincter accommodation in patients with esophagogastric junction outflow obstruction. (Su1096, Digestive Disease Week, San Diego CA, USA. May 21-24, 2016).

Fukaura K, Ihara E, Muta K, Tanaka Y, Bai X, Nakamura K, Takayanagi R. The cytokine expression patterns of esophageal mucosa are associated with esophageal motility function in human. Selected DDW Poster of Distinction (Digestive Disease Week, Washington DC, USA. May 17-19, 2015)

Tanaka Y, Ihara E, Muta K, Fukaura K, Mukai K, Bai X, Nakamura K, Akiho H, Takayanagi R. Clinical characteristics associated with function of esophageal motility: A retrospective analysis of 97 patients. (Digestive Disease Week, Washington DC, USA. May 17-19, 2015)

Muta K, Ihara E, Fukaura K, Bai X, Tanaka Y, Nakamura K, Ochiai T, Tsuchida O, Akiho H, Takayanagi R. Actiamide has the potential to become a promising treatment for patients with esophagogastric junction outflow obstruction. (Digestive Disease Week, Washington DC, USA. May 17-19, 2015)

Bai X, Ihara E, Tanaka Y, Hirano K, Hirano M, Akiho H, Nakamura K, Takayanagi R. Endogenous H₂S contributes to myogenic tone generation in lower esophageal sphincter: Possible involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Selected Oral Session (Digestive Disease Week, Washington DC, USA. May 17-19, 2015)

Muta K, Ihara E, Bai X, Tanaka Y, Nakamura K, Akiho H, Takayanagi R. Acotiamide, a novel prokinetic drug reduces both esophageal body

contractility and the tone of the lower esophageal sphincter. (Digestive Disease Week, Chicago, IL, USA. May 3-6, 2014)

Tanaka Y, Ihara E, Hirano K, Hirano M, Nakamura K, Akiho H, Takayanagi R. Trypsin induced biphasic contraction and relaxation in the porcine lower esophageal sphincter. (Digestive Disease Week, Orlando, FL, USA. May 18-21, 2013)

[図書](計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊原 栄吉 (IHARA EIKICHI)
九州大学病院・肝臓膵臓胆道内科・助教
研究者番号：80612390

(2)連携研究者

中村 和彦 (NAKAMURA KAZUHIKO)
九州大学病院・肝臓膵臓胆道内科・助教
研究者番号：00274449