

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461165

研究課題名(和文) 胃食道逆流症による咳嗽機序：食道粘膜のTRPV1発現と神経原性炎症の関与

研究課題名(英文) Gastroesophageal reflux (GER)-associated cough: Effect of treatment on cellular and neurogenic inflammation

研究代表者

竹村 昌也 (takemura, masaya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30378707

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)：胃食道逆流症(GERD)による咳嗽患者37人およびGERD咳なし患者5人において食道粘膜生検を施行し、GERD咳患者においてはラベプラゾール20mgおよびイトプリド150mgを4週間投与した。治療前GERD咳患者の食道粘膜のTRPV1mRNAは、GERD咳なし患者と比べ有意に高発現していた。GERD治療後、咳VAS、咳関連QOL質問票(JLCQ)、GERD問診票(FSSG)は有意に改善し、咳VAS改善率とFSSG改善率との間に有意な正の相関を認めた。治療反応非良好群に比し反応良好群において血漿サブスタンスP濃度低下率と喀痰好中球%低下率は有意に大きく、両変化率との間に有意な相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：We prospectively recruited GER-associated chronic cough patients (n=37) and GER without cough (n=5). A PPI rabeprazole 20 mg qd and a prokinetic itopride 50 mg tid were given for 4 wks. We performed esophageal mucosal biopsy before the treatment in all participants. Before and after this, we examined cough and reflux symptoms by scores of cough VAS, Japanese version of Leicester Cough Questionnaire (LCQ) and modified frequency scale for the symptoms of GERD (FSSG) sputum (s-) cells(%), and s- and plasma (p-) SP levels. Before the treatment, the expression of TRPV1 mRNA levels were significantly greater in GER-associated cough patients compared to GER without cough patients. Anti-reflux treatment significantly improved VAS, LCQ and FSSG scores for the 37 patients. The VAS and FSSG showed significant correlations. p-SP levels and s-neutrophils were significantly greater in the good responders than in the intractable, and these changes were intercorrelated (r=0.46, p<0.05).

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性咳嗽 胃食道逆流症 神経原性炎症 TRPV1 サブスタンスP

1. 研究開始当初の背景

持続する咳は QOL 低下や体力消耗など患者に多くの苦痛を与える。咳嗽は、迷走神経終末の咳受容体 transient receptor potential vanilloid1 (TRPV1)が、酸や熱、化学物質等により活性化され、刺激が咳中枢に伝わり誘発される。同時に神経終末からサブスタンス P など神経ペプチドが放出され、神経原性炎症が惹起される。胃食道逆流症(GERD)に伴う慢性咳嗽は欧米だけでなく本邦でも明らかに増加しており、治療に難渋する症例も多い。近年、GERD 患者の食道粘膜でも TRPV1 の発現増強が報告されている。食道への酸暴露が TRPV1 を活性化し、GERD 症状を惹起する機序が想定されるが、GERD による慢性咳嗽患者の食道粘膜における神経原性炎症の存在や、TRPV1 発現と咳嗽との関係については不明である。本病態における TRPV1 および神経原性炎症の関与を検討し、治療標的分子としての可能性を探る。

2. 研究の目的

本研究では、GERD による慢性咳嗽患者の食道粘膜における TRPV1 の発現をタンパクおよび遺伝子レベルで検討し、SP などの神経原性炎症のマーカーや咳嗽との関連を検討する。

3. 研究の方法

対象：

- a) 胸部X線写真が正常で8週以上咳が持続する慢性咳嗽を主訴に呼吸器内科を受診し、病歴GERDによる慢性咳嗽が疑われる患者
- b) 対照群：GERD症状を有するが慢性咳嗽を認めない患者。

評価項目：

初診時検査：血液検査(血漿 SP 濃度、血清 NGF 濃度含む)、肺機能検査(スパイロメトリー、インパルスオシレーションシステム)、誘発喀痰検査(喀痰細胞分画、喀痰 SP 濃度)、胸部X線

検査を施行する。

問診票：咳 VAS および GERD に関する問診票は FSSG を使用。咳は、新実らが翻訳しすでにバリデーションされたレスター咳質問票(LCQ)日本語版を用いる

定量的 RT-PCR：食道粘膜における TRPV1 の発現について mRNA レベルで調べる。標本より RNA の採取を行う。RNA 抽出は市販のキットを用いて採取する。現有のリアルタイム PCR システム(StepOne-plus)を用いて定量的に mRNA 発現量を調べる。使用するプライマーは既報(Guarino M, et al. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:746-52) に准じる。

生化学的検査：食道粘膜の TRPV1 蛋白の定性解析のためウエスタンブロッティング(WB)を行う

免疫組織化学的検査：得られた食道粘膜組織は OCT-液体窒素で包埋し-80 で保存する。現有のクリオスタットで 6µm 厚切片標本を作製する。食道粘膜組織における TRPV1, SP, CGRP の発現を蛍光免疫染色し、現有の共焦点顕微鏡で観察し評価する。TRPV1, SP, CGRP は既報(Dinh et al. *Resp Physiol Neurobiol* 2004, Groneberg et al. *Biol Chem* 2005) にある市販の抗体が利用可能である。

組織標本画像の撮影および定量的評価：画像解析は画像解析ソフト ImageJ を用いて蛍光強度を定量解析する。

臨床指標：GERD や咳に関する問診票(各々 FSSG, GERD-Q, LCQ)、血液検査(血漿 SP 濃度: Otsuka K, Niimi A, et al. *Respiration* 2011;82:431-8, 血清 NGF 濃度)、喀痰 SP 濃度、肺機能検査やカプサイシン咳感受性検査

食道粘膜の形態学的所見および分子生物学的所見(上記)と、臨床指標との関連をみる。

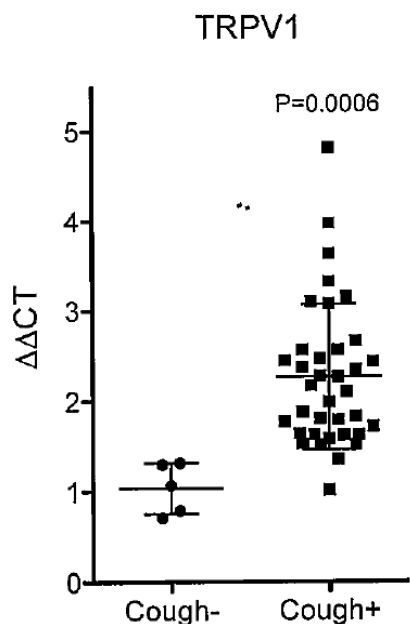
4. 研究成果

これまで GERD 咳患者 37 人(男 17 名:女 20 名 53.6 歳)および GERD 咳なし患者 5

例より食道粘膜生検を施行した。GERD 咳患者においては喀痰および血漿 SP 濃度測定を行った。

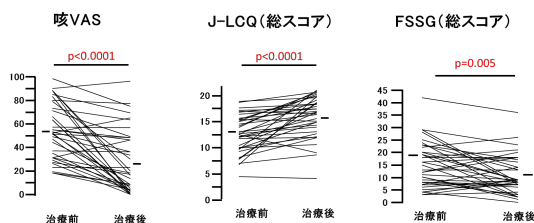
1. GERD 咳患者にける食道粘膜おける TRPV1-mRNA レベルの発現を GERD 咳なし患者と比較した。GERD 咳患者の食道粘膜の TRPV1-mRNA 発現は GERD 咳なし患者とくらべて有意に高発現していた ($p=0.0006$) (図 1)

図 1



GERD 咳なし患者の症例数が少なく、現在も集積中であるが、GERD 咳患者において、問診票および喀痰、血漿 SP 濃度との関連について検討した。

図 2



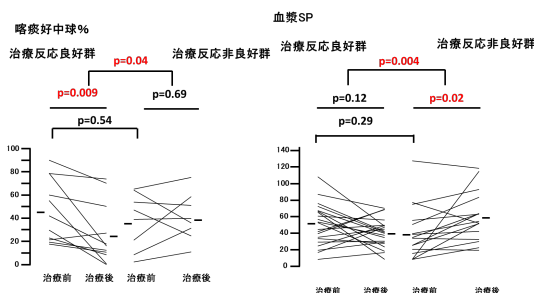
全 37 例の検討において GERD 治療後、咳 VAS, LCQ, FSSG スコアは有意に改善した (図 2)。

また、咳 VAS の改善度と FSSG の酸逆流症状スコア改善度との間に有意な正の相関

($r=0.57, p=0.0002$) を認めた。

治療反応良好群と反応非良好群において治療前の臨床指標に差はなかったが、反応非良好群に比し喀痰好中球%変化率と血漿 SP 濃度変化率は、反応良好群において有意に大きかった(図 3)。

図 3



また、治療反応良好群において喀痰好中球%の減少度と血漿 SP 濃度減少度との間に有意な正の相関 ($r=0.46, p<0.05$) を認めた。

本研究の結論

GERD 治療による鎮咳効果は好中球性炎症および神経原性炎症の改善による可能性が示唆される。TRPV1 は mRNA レベルにおいて、GERD 咳なし群に比し、GERD 咳あり群で有意な発現を認めるが、今後はさらに免疫染色やウェスタンブロットなど蛋白レベルでの発現や、喀痰や血漿 SP 濃度、症状スコアなど臨床指標との関連などの検討が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Takeda N, Takemura M, Hijikata H, Fukumitsu K, Ichikawa H, Asano T, Kanemitsu, Y Uemura T, Takakuwa O, Ohkubo H, Maeno K, Ito Y, Oguri T, Nakamura A ,

Kubota E, Niimi A. Improvement of cough symptom after treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD) related cough association with sputum substance P levels. American Thoracic Society International Conference 2017. Washington DC, USA

2. 胃食道逆流症（GERD）による慢性咳嗽における神経ペプチドの関与.

武田典久, 竹村昌也, 福光研介, 浅野貴光 市川博也, 金光禎寛, 久保田英嗣, 神谷武, 新実 彰男 第57回日本呼吸器学会学術講演会 2017 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹村昌也 (TAKEMURA MASAYA)

名古屋市立大学 大学院医学研究科 助教
研究者番号：30378707

(2)研究分担者

新実彰男 (NIIMI AKIO)

名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授
研究者番号：30252513

久保田英嗣 (KUBOTA EIJI)

名古屋市立大学 大学院医学研究科 助教
研究者番号：30405188