Akita University

Akita J Med 43 : 1-6, 2016

食道・胃接合部疾患と一酸化窒素（NO）*

飯 島 克 則

秋田大学大学院医学系研究科消化管内科学講座

（平成 28 年 4 月 20 日掲載決定）

Nitric oxide and Gastro-Esophageal Junctional Diseases

Katsunori Iijima

Department of Gastroenterology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita010-8543, Japan

Key words : Gastro-esophageal reflux diseases, nitric oxide, reflux esophagitis, Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma

はじめに

世界的なヘリコバクター・ピロリ菌感染率の低下によって，その感染症が引き起こす胃癌，消化性潰瘍の発生率は低下している．代わりに近年，欧米を中心に噴門部癌やバレット食道腺癌といった食道・胃接合部領域に発生する癌が急速に増加しており，本邦においてもその増加が危惧されている．この部位に発生する癌の発生には，逆流性食道炎，バレット食道といった胃・食道逆流症（GERD : gastro-esophageal reflux diseases）関連疾患が深くかかわっており，発癌に関連する因子として，食道内に逆流する胃酸，ペプシン，胆汁酸逆流の関連での検討が広く進められているが，いまだ不明である．2002 年のグラスゴー大学の研究チームから，ヒトにおいて硝酸塩摂取後，食道・胃接合部の内腔で限局性に 50 μM という高濃度の一酸化窒素（NO : nitric oxide）が発生し，同部の発癌因子となりうるという仮説が提唱された[1,2]．本稿では，硝酸塩摂取後，ヒトの食道・胃接合部内腔における NO 発生のメカニズム，及び，その周囲組織に対する影響について概説する[3]．

Corresponding author : Katsunori Iijima
Department of Gastroenterology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
TEL : 81-18-884-6573
FAX : 81-18-801-7501
E-mail : kiijima@med.akita-u.ac.jp
*平成 28 年 2 月 29 日秋田医学会教授就任特別講演

一酸化窒素（NO）

NO は生体内において多岐にわたる生理活性を有するラジカルである．生体内で NO を合成する酵素（NOS : nitric oxide synthase）の中で構成型 NO 合成酵素（cNOS : constitutive nitric oxide synthase）と呼ばれるものは細胞内に常に存在し，これによって生成される低濃度の NO は神経・筋や血管機能を調整している．一方，誘導型 NO 合成酵素（iNOS : inducible nitric oxide synthase）によって生成される NO は高濃度であり免疫機能や炎症反応の素因として働いている．この iNOS による高濃度の NO は，継続的に生成されることで慢性炎症や DNA 傷害による細胞の突然変異を誘発し，更に発癌に関係するといわれている．

食道・胃接合部内腔における一酸化窒素の発生

生体内で発生する最も高濃度の NO はこれらの合成酵素由来によるものではなく，胃内腔で化学的に生成されるものである[4,5]．これは消化管から吸収された硝酸塩が唾液中に再分泌され，唾液・腸管内循環（entro-salivary re-circulation of dietary nitrate）する結果，生成される（図 1）．食物に含まれる硝酸塩は小腸で吸収され，その約 25% は唾液腺より口腔内へ再分泌される．この唾液中硝酸塩（NO_3^-）の 30% が口腔内細菌によって亜硝酸塩（NO_2^-）に還元される[2]．空腹時では唾液中の亜硝酸塩濃度は約 50 μM である

Akita University

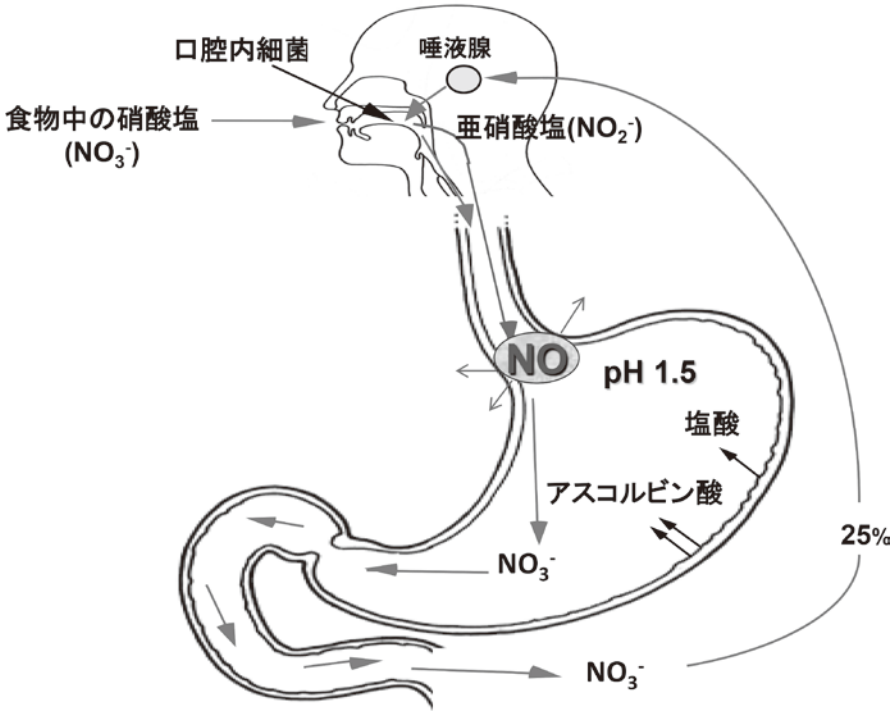


図 1.　食物中硝酸塩の唾液-腸管再循環（entro-salivary re-circulation of dietary nitrate）
ヒトが硝酸塩を含む食物を摂取すると，硝酸塩の唾液-腸管再循環により，食道・胃接合部内腔で限局性に高濃度の NO が発生する．小腸で吸収された硝酸塩の約 25% は唾液中に再分泌され，その 30% は口腔内細菌により亜硝酸塩に還元される．硝酸塩を多く含む食物の摂取後には唾液中の亜硝酸塩濃度は 2 mM にまで達し数時間持続する．これが唾液とともに胃に達し，酸性アスコルビン酸と速やかに反応することにより NO が発生することになる．（文献 2 より）

が，レタスなど硝酸塩を多く含む食物を摂取すると 2 mM にまで達する［1］．唾液と共に亜硝酸塩が嚥下され胃内に達すると強酸性の胃液により化学反応し，胃内に NO が生成される[4,5]．

$NO_2^- + H^+ \rightleftarrows HNO_2$ (pKa = 3.2－3.4)

$2HNO_2 \rightleftarrows H_2O + N_2O_3$

$N_2O_3 \rightleftarrows NO + NO_2$

（NO_2^-：亜硝酸塩，NO：一酸化窒素）

ここで，亜硝酸塩から酸性条件下で NO が生成される反応は，アスコルビン酸（還元型ビタミン C）などの還元剤の存在下で大きく促進され，その条件下では，亜硝酸塩は瞬時に NO に変換される[6]（注：健康な胃では胃酸分泌に伴って，アスコルビン酸は能動的に胃液中に分泌されている）．よって，唾液と共に亜硝酸塩が嚥下され胃に達した場合，管腔内 pH が食道内の中性から胃内の強酸性に急激に変化する地点，すなわち，ヒトの食道・胃接合部でアスコルビン酸を含む強酸性の胃液と瞬時に反応し，そこで高濃度の NO が発生する．実際に健常ボランティアでの検討で 2 mmol（サラダ一食分）の硝酸塩を摂取後，食道・胃接合部の内腔に限局して最大 50 μM を超える高濃度の NO が測定された（図 2）[1]．硝酸塩の唾液・腸管循環は食後数時間にわたり持続し，この間に食道・胃接合部周囲組織はその内腔で生成された高濃度の NO に暴露されることになる[7]．

NO は高い脂質親和性を持つガスであるため，主要成分が脂質である組織の細胞膜を自由に通過することができる．それゆえ食道・胃接合部内腔で発生した NO は周囲組織へ拡散・蓄積する．実際に消化管内腔で NO を発生させる動物実験を用いて，食道・胃接合部の粘膜層において，iNOS 由来に匹敵する高濃度の NO 濃度が検出された[8]．さらに，周囲組織に拡散し

Akita University

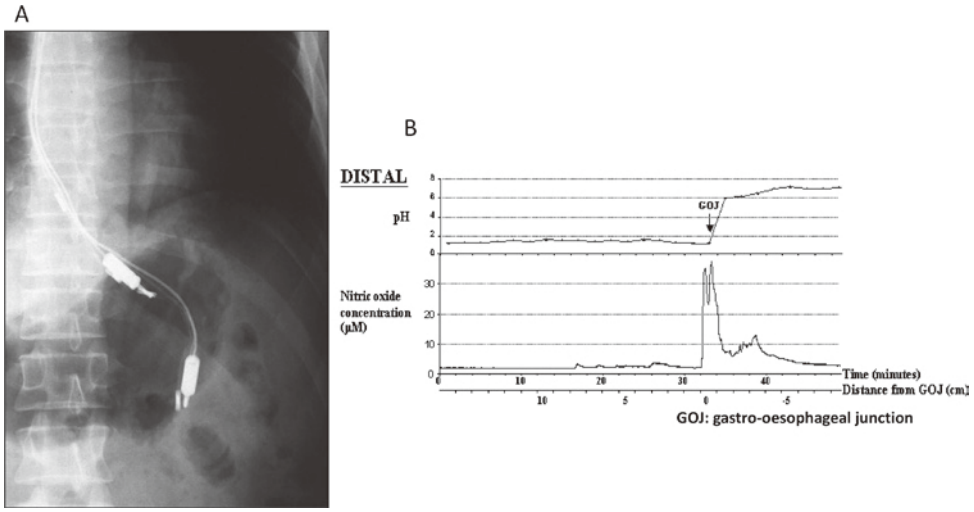


図 2. 硝酸塩摂取後のヒト食道・胃接合部内腔における一酸化窒素（NO）濃度の測定例
A：ヒトの胃内に小型の NO 測定電極，pH 測定電極を経口的に挿入し，それをゆっくり（2 分間に 1 cm）引き抜いてくることで，食道，胃各所の NO 濃度を測定した．B：pH の値が胃内の酸性から食道内の中性に急激に変わる地点，すなわち，食道・胃接合部（GOJ）に限局して，高濃度の NO が検出されている．（文献 1 より）

た NO は，組織中のグルタチオンを消費し[8]，アコニターゼ活性を低下させるなどニトロ化ストレスを引き起こし[9]，また，粘膜上皮の tight junction を傷害し，それによって粘膜防御機構を低下させることが示された[10]．

逆流性食道炎と NO

唾液中の亜硝酸塩から化学的に NO が生成される部は，初めて強酸性の胃液と出会う地点であることから，胃酸が食道内に逆流する症例（GERD 症例）では NO の発生部位は下部食道に移動する[11,12]．逆流性食道炎における内腔で発生する NO の影響に関して，ラットの慢性酸逆流食道炎モデルにおいて，亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸の同時投与により食道内腔で発生した NO によって，逆流性食道炎の組織障害の増悪を認めた[13]．これは，内腔で発生した NO が，スーパーオキサイド（O_2^-）が豊富に存在する食道の炎症組織に拡散することにより，細胞毒性の強いパーオキシナイトライト（$ONOO^-$）の生成を介して食道障害の増悪を引き起す機序が考えられた[13]（図 3）．その他，食道管腔側で発生した NO が，食道粘膜上皮の細胞間隙拡大（Dilation of intercellular spaces：DIS）を増大させ，食道のバリア機能を減弱させる機序も考えられる[14]．

さらに，NO 暴露による逆流性食道炎に対する組織傷害には，雌雄差があることが動物実験により明らかとなり，雄ラットでみられた NO による組織傷害増悪作用は，雌では見られないことが示された[15]．この機序として，雌では，エストロゲンによって，食道の tight junction 蛋白である occludin の発現を調整し，食道粘膜バリア機能を増強させている可能性が示された[16]．ヒトにおいて，逆流性食道炎，バレット食道，食道腺癌の GERD 関連疾患では，常に男性優位であることが知られている[17]．エストロゲンの食道粘膜傷害抑制作用は，ヒトでみられる GERD の男性優位性を説明し得るかもしれない．

バレット食道と NO

バレット食道は食道粘膜が扁平上皮から円柱上皮に置換された状態であり，繰り返される胃・食道逆流により発生し，食道腺癌の前癌病変と考えられている．バレット食道と NO との関連に関して，動物モデルを用いた慢性の NO 暴露によって，バレット食道の発生は促進されることが示された[18]．NO がバレット食道発生を促進する機序の一端として，炎症の増悪を介す

Akita University

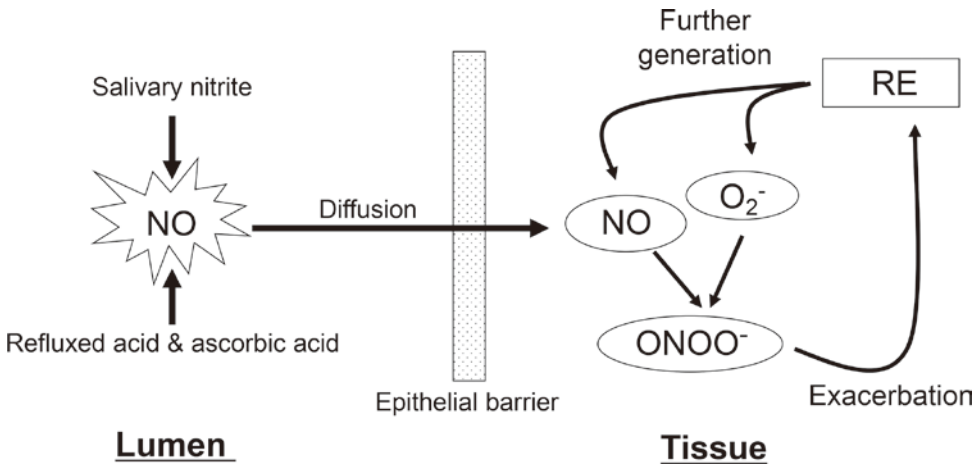


図 3. 外因性 NO 暴露による食道傷害の反応機序
胃酸逆流のある状態でアスコルビン酸の存在下，唾液中の亜硝酸は化学反応を起こし，下部食道内腔で NO を発生させる．内腔で発生した NO はスーパーオキサイド（O_2^-）が豊富に存在する食道の炎症組織に拡散し，細胞毒性の強いパーオキシナイトライト（$ONOO^-$）を生成する，その結果，食道傷害の増悪が起こる．続いて，炎症細胞浸潤より生じたスーパーオキサイド，内因性 NO がパーオキシナイトライトをまた発生させるという連鎖的傷害を引き起こす．（文献 13 より）RE：reflux esophagitis

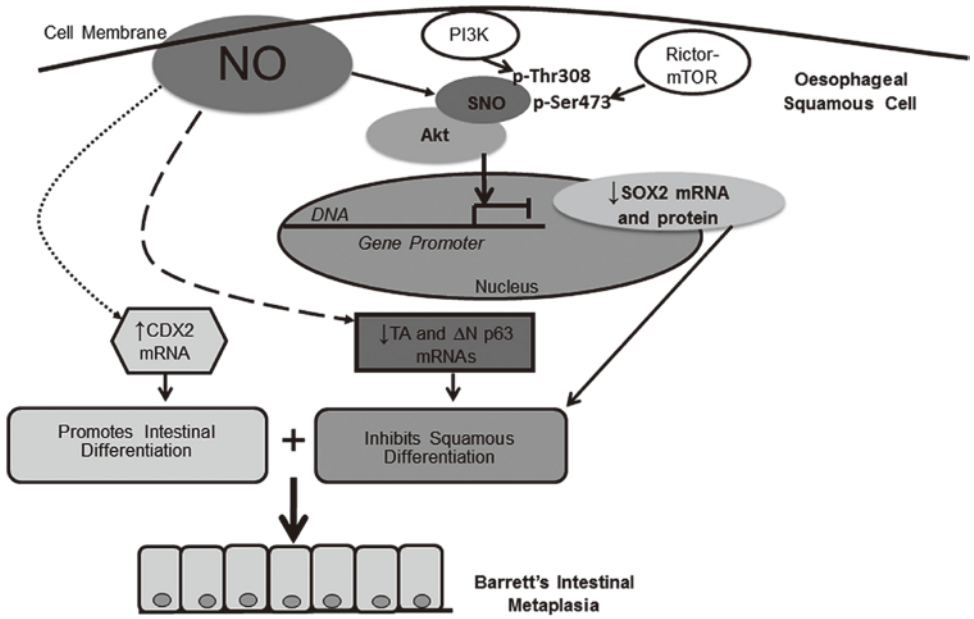


図 4. 一酸化窒素（NO）暴露によりバレット食道発生が促進される分子シグナル機構
NO は，AKT をニトロ化することによりその活性を抑制し，それが SOX2 の発現低下を来し p63 の発現を抑制することによって食道の扁平上皮分化を抑制する．また，同時に，NO は，CDX2 誘導により食道上皮から腸上皮化への形質転換（すなわち，バレット食道）を促進する．（文献 20 より）

Akita University

る間接作用が考えられる．そのほかに，培養細胞を用いた実験によって，NO 暴露による食道の扁平上皮から円柱上皮への形質転換にかかわる直接作用が明らかとなった．すなわち，NO を食道扁平上皮細胞に暴露することによって，円柱上皮発現を促進する CDX2 遺伝子が誘導されることが示された[19]．さらに，CDX2 誘導とともに，NO は AKT をニトロ化することによりその活性を抑制し，それが SOX2 の発現低下を来し p63 の発現を抑制することによって扁平上皮分化を抑制することが示された[20]．これら分子シグナルの組み合わせがバレット食道発生に寄与すると考えられる（図 4）．

食道腺癌と NO

食道腺癌は，逆流性食道炎，バレット食道から続く一連のシークエンスによって発生するが，硝酸塩由来の NO は，上記でみてきたように，逆流性食道炎，バレット食道の発生を促進し，その後の食道腺癌の発生も促進させると考えられる．その他にも，高濃度の NO は，一般的に N_2O_3 などの種々の発癌性の窒素酸化物の生成を介して，組織の DNA 傷害を引き起こすことが知られており，NO による直接的な発癌作用も考えられる．実際に，バレット食道由来の培養細胞においても，NO 暴露によって DNA 傷害を惹起されることが示されており[21]，また，試験管モデルにおいて，下部食道の消化管内空で発生した NO が，周囲組織に拡散し，そこで，発癌物質であるニトロソ化合物が生成されうることが示されている[22]．

さらに，バレット食道には，上皮細胞，炎症細胞に iNOS が発現していることが知られており[23]，硝酸塩由来の外因性由来の NO のほかに，iNOS 由来の内因性に発生する NO も発癌に関与していると考えられる．

おわりに

1980 年ごろより，食道腺癌は欧米を中心に急速に増加しているが，この背景には，ヘリコバクター・ピロリ感染率の低下が関係していると考えられている[24]．ピロリ菌の感染は，胃酸分泌の低下を介して GERD 関連疾患に抑制的に働くが[25]，感染率の低下により一般住民の胃酸分泌が相対的に増加し，その結果，食道腺癌を含む GERD 関連疾患の増加につながっているものと解釈される．一方，硝酸塩由来の食道・胃接合部での NO 発生には，胃から持続的に十分な胃酸，アスコルビン酸が分泌されること，すなわち，（ピロリ菌に感染していない）健康な胃が必要である[6]．よって，ピロリ菌感染率の低下は，NO の発生にも促進的に働き，その結果，食道腺癌増加につながっている可能性がある．その他，1950 年あたりから使用量が増加した硝酸塩入りの化学肥料の増加も，食物中の硝酸塩含有量の増加を介して，その後の食道腺癌の増加と関連している可能性も考えられる[2,3]．

また，バレット食道を含む GERD 患者では，健常者と異なる食道内細菌叢（microbiome）の存在が指摘されており，バレット食道の発生に何らかの影響を及ぼしている可能性がある[25]．硝酸塩の唾液・腸管循環には，硝酸塩から亜硝酸塩への変換過程が口腔内を含む消化管内の細菌によってなされるため，食道内細菌叢と NO 発生との関連についても興味深い．

謝　辞

最後に，これまで研究を指導いただきましたグラスゴー大学 McColl 教授，東北大学医学部消化器病態学 下瀬川徹　教授，山形生物ラジカル研究所　故吉村哲彦　博士，および，東北大学医学部消化器病態学で大学院生として，ともに研究を遂行してきました，浅沼清孝，荒誠之，石山文威，伊藤博敬，遠藤博之，日下玄，真坂智寛，本田純也，各博士に深く感謝申し上げます．

文　献

1） Iijima, K., Henry, E., Moriya, A., *et al*.（2002） Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology*, **122**, 1248-1257.

2） McColl, K.E.（2005） When saliva meets acid : chemical warfare at the oesophagogastric junction. *Gut,* **54**, 1-3.

3） Iijima, K. and Shimosegawa, T.（2014） Involvement of luminal nitric oxide in the pathogenesis of the gastro-esophageal reflux disease spectrum（review）. *J. Gastroenterol Hepatol.*, **29**, 898-905.

4） Benjamin, N., O'Driscoll, F, Dougall, H., *et al*.（1994） Stomach NO synthesis [letter]. *Nature*, **368**, 502.

Akita University

5) McKnight, G.M., Smith, L.M., Drummond, R.S., *et al*. (1997) Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut,* 211-214.

6) Iijima, K., Fyfe, V. and McColl, K.E. (2003) Studies of nitric oxide generation from salivary nitrite in human gastric juice. *Scand. J. Gastroenterol.*, **38**, 246-252.

7) Iijima, K. and Shimosegawa, T. (2006) Gastric carditis : Is it a histological response to high concentrations of luminal nitric oxide ? *World J. Gastroenterol.*, **12**, 5767-5771.

8) Asanuma, K., Iijima, K., Sugata, H., *et al*. (2005) Diffusion of cytotoxic concentrations of nitric oxide generated luminally at the gatro-esophageal junction of rats. *Gut,* **54**, 1072-1077.

9) Asanuma, K., Iijima, K., Ara, N., *et al*. (2007) Fe-S cluster proteins are intracellular targets for nitric oxide generated luminally at the gastro-oesophageal junction. *Nitric. Oxide.*, **16**, 395-402.

10) Ara, N., Iijima, K., Asanuma, K., *et al*. (2008) Disruption of gastric barrier function by luminal nitrosative stress : a potential chemical insult to the human gastro-oesophageal junction. *Gut,* **57**, 306-313.

11) Suzuki, H., Iijima, K., Moriya, A., *et al*. (2003) Conditions for acid catalysed luminal nitrosation are maximal at the gastric cardia. *Gut,* **5**, 1095-1101.

12) Suzuki, H., Iijima, K., Scobie, G., *et al*. (2005) Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. *Gut,* **54**, 1527-1535.

13) Ishiyama, F., Iijima, K., Asanuma, K., *et al*. (2009) Exogenous luminal nitric oxide exacerbates esophagus tissue damage in reflux esophagitis model of rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, **44**, 527-537.

14) Ito, H., Iijima, K., Ara, N., *et al*. (2010) Reactive nitrogen oxide species induce dilatation of the intercellular space of rat esophagus. *Scand. J. Gastroenterol.*, **45**, 282-291.

15) Masaka, T., Iijima, K., Endo, H., *et al*. (2013) Gender differences in esophageal mucosal injury in a reflux esophagitis model of rats. *Gut,* **62**, 6-14.

16) Honda, J., Iijima, K., Asanuma, K., *et al*. (2016) Estrogen Enhances Esophageal Barrier Function by Potentiating Occludin Expression. *Dig. Dis. Sci.*, **61**, 1028-1038.

17) Asanuma, K., Iijima, K. and Shimosegawa, T. (2016) Gender difference in gastro-esophageal reflux diseases. *World J. Gastroenterol.*, **22**, 1800-1810. Review.

18) Endo, H., Iijima, K., Asanuma, K., *et al*. (2010) Exogenous luminal nitric oxide exposure accelerates columnar transformation of rat esophagus. *Int. J. Cancer*, **127**, 2009-2019.

19) Kusaka, G., Uno, K., Iijima, K., *et al*. (2012) The role of nitric oxide in the induction of caudal-type homeobox 2 through epidermal growth factor receptor in the development of Barrett's esophagus. *Scand. J. Gastroenterol.*, **47**, 1148-1158.

20) Asanuma, K., Huo, X., Agoston, A., *et al*. (2015) In oesophageal squamous cells, nitric oxide causes S-nitrosylation of Akt and blocks SOX2 (sex determining region Y-box 2) expression. *Gut*, in press.

21) Clemons, N.J., McColl, K.E. and Fitzgerald, R.C. (2007) Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms. *Gastroenterology*, **133**, 1198-1209.

22) Iijima, K., Grant, J., McElroy, K., *et al*. (2003) Novel mechanism of nitrosative stress from dietary nitrate with relevance to gastroesophageal junction cancers. *Carcinogenesis*, **24**, 1951-1960.

23) Thanan, R., Ma, N., Iijima, K., *et al*. (2012) Proton pump inhibitors suppress iNOS-dependent DNA damage in Barrett's esophagus by increasing Mn-SOD expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **421**, 280-285.

24) Iijima, K., Koike, T. and Shimosegawa, T. (2015) Reflux esophagitis triggered after Helicobacter pylori eradication : a noteworthy demerit of eradication therapy among the Japanese ? *Front. Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2015.00566.

25) Iijima, K., Koike, T., Abe, Y., *et al*. (2015) Time series analysis of gastric acid secretion over a 20-year period in normal Japanese men. *J. Gastroenterol*., **50**, 853-861.

26) Yang, L., Lu, X., Nossa, C.W., *et al*. (2009) Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. *Gastroenterology*, **137**, 588-597.