

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460931

研究課題名(和文)食道上皮に存在する酸感受性機械受容体イオンチャネルの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of acid-sensitive mechanical ion channels in mouse esophageal epithelial cells.

研究代表者

神谷 武(KAMIYA, Takeshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10254301

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)：酸感受性イオンチャネル5(ASIC5)は、近年新規胆汁酸センサーとして報告されたが、上部消化管での発現については不明である。我々は、食道における新規酸感受性機械受容チャネル候補としてASIC5の発現について検討した。RT-PCR法ではASIC5遺伝子断片はマウス食道中、下部に発現が多く、全長クローニングにより新規のスプライシングバリエーションを認め、他の候補としてTGR5についてもHET-1Aヒト正常食道上皮細胞株を用いて精査したが、その発現は認められなかった。特異的な抗体がないためタンパクレベルでの発現が未解析であるが、ASIC5が食道で重要な役割を担っている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although acid-sensing ion channel 5 (ASIC5) is a novel bile acid-sensitive ion channel, which is expressed in the bile duct epithelial cells, the expression in the esophagus is unknown. The aim of this study was to investigate the expression of ASIC5 in the mouse esophagus. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis found that the short fragments of ASIC5 transcripts were abundantly detected in the middle and lower regions. Full length PCR cloning analysis identified a novel splicing variant from the mouse esophagus along with the registered ASIC5 transcripts. We also examine the expression of acid-sensitive G protein-coupled receptor TGR5 known as another candidate in a human normal esophageal epithelial cell line HET-1A, but apparent expression was not detected. ASIC5 may participate in physiological and pathophysiological functions of the esophagus, although the expression of ASIC5 protein was not confirmed because of lack of antibodies specific to ASIC5.

研究分野：医歯薬学

キーワード：酸感受性イオンチャネル 食道 機械受容体 胆汁酸 RT-PCR ASIC5 TGR5

1. 研究開始当初の背景

胃食道逆流症 (Gastroesophageal Reflux Disease: GERD) の患者数は本邦でも増加しており、その病態への関心が高まっている。GERD の病態の一つとして食道知覚過敏が指摘されているが、酸に曝される食道上皮細胞と食道知覚との関連などその詳細には不明な点が多い。我々は、これまで食道上皮細胞に酸感受性イオンチャンネルの一つである Transient receptor potential of vanilloid 4 (TRPV4) が発現していることを報告した。そしてこの細胞にはさらに多くの機械受容チャンネルの存在が示唆されている。酸感受性イオンチャンネル (acid-sensing ion channel: ASIC) はストレスで生じる局所水素イオンの上昇に応答するセンサーの一つである。ASIC 6つのサブタイプから構成されているが、これらの食道での発現や機能については全く分かっていない。我々は、食道上皮に存在する酸感受性機械受容チャンネルを網羅的に解析し、その中で近年胆汁酸受容体と報告されている ASIC5 と TGR5 という G タンパク質共役型受容体に着目し、解析する実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規酸感受性機械受容体 ASIC5 と TGR5 の食道上皮における発現と機能を解析し、GERD との関連を検討し GERD の病態解明につなげることである。

そこで我々は、他の組織で報告された ASIC5 及び TGR5 が食道の酸、胆汁酸に対する即時応答に重要や役割を果たしているのではないかという仮説を立て、これらの遺伝子について、食道における発現、局在、生理機能について調べることにした。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いた解析：遺伝子発現と形態学的解析

マウス食道における ASIC5 の発現を RT-PCR、免疫組織化学染色、*in situ* hybridization (ISH)、ウェスタンブロットにより精査した。具体的には、C57BL6J マウスから上部消化管を摘出後、total RNA を抽出して RT-PCR 法にて遺伝子産物の発現を検索した。まずは遺伝子断片の有無を確認した後、遺伝子の全長についても PCR で確認した。次に、タンパクレベルでの局在を決定するため、摘出した臓器を OCT コンパウンドに包埋、クリオスタットにて新鮮凍結切片を作製し、風乾固定後市販の特異抗体を用いて間接蛍光免疫染色を行った。抗体の特異性はペプチド抗原による吸収試験で確認した。mRNA レベでの発現と局在については、クローニングした ASIC5 サンプルから独自のリボプローブを作製し、³⁵S で標識した後、*in situ* hybridization 法を実施した。タンパクレベルでの解析や抗体の評価についてはウェスタンブロットでもチェックを行なった。

(2) HET-1A 細胞を用いた解析

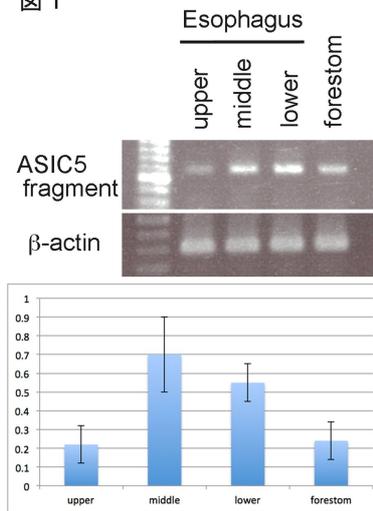
ヒト食道上皮細胞における TGR5 遺伝子の発現の有無について、ヒト正常食道上皮細胞の性質を保持する細胞株 HET-1A 細胞を用い、RT-PCR 法により解析した。使用した HET-1A 細胞については、この細胞で発現が確認されている一過性受容体電位パニロイド 1 (TRPV1) 及び TRPV4 の PCR の結果により評価した。

4. 研究成果

(1) ASIC5 mRNA の発現解析

マウス上部消化管 (食道) における ASIC5 mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。まず食道を上部、中部、下部に 3 等分して、部位ごとで ASIC5 の遺伝子断片を調べると、食道の中部と下部で特に発現が強いことが明らかとなった (図 1)。

図 1



さらに食道組織において ASIC5 mRNA の全長も PCR してその分子同定を行ったところ、図 2 に見られるように登録型の ASIC5-001 とともに ASIC5-002 もクローニングされ、マウス食道には 001 タイプに加え、002 タイプも mRNA として発現していることが示唆された (図 2)。

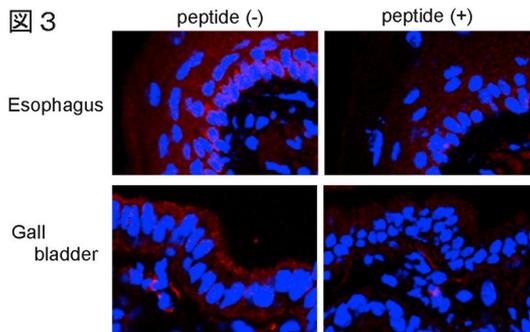
図 2

```

001.seq 1 ATGGAACATACTGAGAAATCACAAGTGACCGGGAGAAGGACTCTTAGGAAAGATAAAA
002.seq 1 -----
001.seq 61 CGTTACCTCTCAAGAGACCACCTGCCATCTCCAACCTGACCGGAAGAAGTTCGATCAAGAC
002.seq 1 -----
001.seq 121 TTTGCCATGTCCACTTCCTTTTCATGGGATACATAAATATGCCAGAACCGAACAAGTT
002.seq 1 -----ATGTCCACTTCCTTTTCATGGGATACATAAATATGCCAGAACCGAACAAGTT
001.seq 181 CGAAAGGTGATCTGGCTGGCTGGTGTGGCTGGCTGTCTCGCTCTTGGTGGCAATC
002.seq 55 CGAAAGGTGATCTGGCTGGCTGGTGTGGCTGGCTGTCTCGCTCTTGGTGGCAATC
001.seq 241 FACAGTCGTTGGTCAATTACTTACATGGCCCAAGCAACATCTATAGAAGTTCAAT
002.seq 115 FACAGTCGTTGGTCAATTACTTACATGGCCCAAGCAACATCTATAGAAGTTCAAT
001.seq 301 GTGGAAAAATCGAGTTCACAGCTGTGACACTCTGTAACCTTGAACAGATTCCAACAGAA
002.seq 175 GTGGAAAAATCGAGTTCACAGCTGTGACACTCTGTAACCTTGAACAGATTCCAACAGAA
    
```

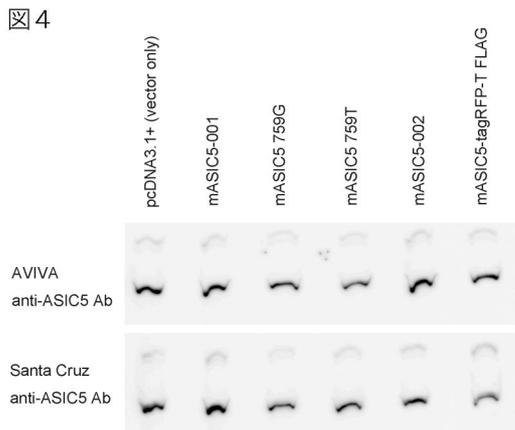
次に ASIC5 タンパクの局在を確かめるために間接蛍光免疫染色を行った。市販の特異抗体 (AVIVA SYSTEM BIOLOGY, APR37696) を用い

て行った免疫染色では、食道及び陽性コントロールとして用いた胆嚢において、いずれもその粘膜上皮が染色され、添付のペプチドによる吸収試験でその上皮の染色性は低下していた(図3)。



一方、ASIC5 mRNA の局在を検索するため ³⁵S 標識プローブによる *in situ* hybridization も実施したが、食道に明確なシグナルを認めなかった。

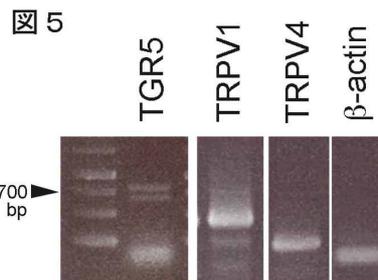
そこで、ASIC5-蛍光色素融合タンパク、タグ付き ASIC5 など、様々な ASIC5 コンストラクトを作製し、これを培養細胞に発現させた後、その細胞から total RNA 及びタンパクを回収、RT-PCR と Western blot を行なった。RT-PCR では ASIC5 が検出されないベクターコントロールでも Western blot では予想される分子量付近にバンドが認められ(図4 レーン1)、さらに ASIC5-tagRFP-T 融合タンパクでもバンドのシフトがないことから(図4 レーン6)、この抗体の非特異性が明らかとなった。



並行して別の市販抗体 [Accn5(Y-16), Santa Cruz Biotechnology, sc-101880] (図4 下段) さらに外注にてオリジナル抗体を作製してこの問題の解決にあたったが、現在までのところ、食道組織における ASIC5 タンパクの発現は確認できていない。ASIC5 と遺伝子配列が類似した別のセンサー分子が発現している可能性がありさらに解析を進める予定である。

(2) TGR5 G タンパク質共役型胆汁酸受容体の解析

TGR5 胆汁酸受容体は、ヒトの胃や小腸での発現については報告があるものの、食道粘膜では調べられていない。そこでヒトの正常食道上皮細胞の性質を保持していることが知られている細胞株である HET-1A 細胞を用い、健常時における TGR5 の発現について調べた。HET-1A 細胞には TRPV1 や TRPV4 遺伝子が発現していることが報告されているが、これらが十分に増幅されている条件においても TGR5 遺伝子断片(690 bp)はほとんど増幅されなかった(図5)。



(3) その他の候補分子の解析

近年、同じ酸感受性イオンチャンネルに属する ASIC1a が胆汁酸により応答増強することが報告された(Ilyaskin *et al.*, 2017)。ASIC5 や ASIC1a 以外の ASIC サブタイプも胆汁酸感受性を有する可能性があることから、これまでの研究で不明な点が多い ASIC4 にも着目して ASIC5 と並行して解析を進めている。米国カリフォルニア大学デイヴィス校が主催する KnockOut Mouse Project (KOMP) から購入した ES 細胞から ASIC4-lacZ レポーターマウスを作製し、これを用いてその発現を解析したところ、上部消化管では胃の筋間神経叢の一部のニューロンに発現していた。現在、野生型と ASIC4 ノックアウトマウスを用いて消化管輸送能試験や代謝ケージを使い糞便検査をして消化管運動能に有意差がないか解析している。

< 参考文献 >

Wiemuth D, Sahin H, Falkenburger BH, Lefevre CM, Wasmuth HE, Gründer S. BASIC--a bile acid-sensitive ion channel highly expressed in bile ducts. *FASEB J.* 26(10):4122-30 (2012)
DOI:10.1096/fj.12-207043.

Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Yugo Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *J Biol Chem.* 278(11):9435-40 (2003)
DOI:10.1074/jbc.M209706200

Ilyaskin AV, Diakov A, Korbmayer C, Haerteis S. Bile acids potentiate

proton-activated currents in *Xenopus laevis* oocytes expressing human acid-sensing ion channel(ASIC1a). *Physiol Rep.* 5(3): pii:e13132 (2017) DOI:10.14814/phy2.13132.

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 4 件)

Kamiya T, Shikano M, Kubota E, Mizoshita T, Wada T, Tanida S, Kataoka H, Adachi H, Hirako M, Okuda N, Joh T. A multicenter randomized trial comparing rabeprazole and itopride in patients with functional dyspepsia in Japan: the NAGOYA study. *J Clin Biochem Nutr.* 査読あり 60(2) (2017) 130-135. DOI:10.3164/jcfn.16-106.

Kimura Y, Kamiya T, Senoo K, Tsuchida K, Hirano A, Kojima H, Yamashita H, Yamakawa Y, Nishigaki N, Ozeki T, Endo M, Nakanishi K, Sando M, Inagaki Y, Shikano M, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Katsumi K, Joh T. Persistent reflux symptoms cause anxiety, depression, and mental health and sleep disorders in gastroesophageal reflux disease patients. *J Clin Biochem Nutr.* 査読あり 59 (1) (2016) 71-77. DOI:10.3164/jcfn.16-9.

Ueda T, Hoshikawa M, Shibata Y, Kumamoto N, Ugawa S. Basal cells express functional TRPV4 channels in the mouse nasal epithelium. *Biochem Biophys Rep* 査読あり 4 (2015) 169-174. DOI:10.1016/j.bbrep.2015.09.008

Kamiya T, Shikano M, Tanaka M, Ozeki K, Ebi M, Katano T, Hamano S, Nishiwaki H, Tsukamoto H, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Okuda N, Joh T. Therapeutic effects of biobran, modified arabinoxylan rice bran, in improving symptoms of diarrhea predominant or mixed type irritable bowel syndrome: a pilot, randomized controlled study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 査読あり (2014)828137. DOI:10.1155/2014/828137.

〔学会発表〕(計 1 件)

Kamiya T, Toki Y, Osaga S, Haruma K, Joh T, et al. Reflux esophagitis patients showed a more rapid worsening of clinical parameters. *Digestive Disease Week 2016.* 2016.5.21-25, San Diego, (USA)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 <http://ncu-shotai.ac>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 武 (KAMIYA, Takeshi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10254301

(2) 研究分担者

鵜川 眞也 (UGAWA, Shinya)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20326135

鹿野 美千子 (SHIKANO, Michiko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員
研究者番号：70405190

(3) 連携研究者

植田 高史 (UEDA, Takashi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
准教授
研究者番号：90244540