

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460939

研究課題名(和文) 消化管ホルモン受容体相互関連および機能発現の解析

研究課題名(英文) Study of molecular basis of motilin and growth hormone secretagogue receptor

研究代表者

松浦 文三 (Matsuura, Bunzo)

愛媛大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：80284420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：モチリンおよびエリスロマイシンはモチリン受容体に結合し、グレリンはgrowth hormone secretagogue (GHS)受容体に結合し、消化管運動機能調節に重要な役割を果たす。モチリン受容体およびGHS受容体発現細胞やモチリン受容体トランスジェニック(TG)マウスを用いて、受容体活性化機構の解析と両者の相互関連を解析した。エリスロマイシンなどのマクロライド系薬剤はモチリンに比して脱感作を生じにくい。その機序にモチリン受容体の膜へのrecycling時間が関与していることを明らかにした。またTGマウスはWTマウスに比して胃排泄時間、小腸通過時間の短縮がみられることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Motilin, erythromycin and ghrelin are important endogenous regulators of gastrointestinal motor function, mediated by the class A G protein-coupled motilin receptor (MLNR) and growth hormone secretagogue receptor (GHSR). We have clarified MLNR is induced desensitization by motilin, resulting from slow recycling to cell surface, compared to macrolides such as erythromycin. We also clarified in the MLNR-TG mice gastric empty time and small intestine transit time by MLNR agonists are shorter than WT mice.

研究分野：消化器病学

キーワード：モチリン受容体 グレリン受容体 受容体活性化機構 受容体脱感作機構 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

モチリンおよびエリスロマイシンはモチリン受容体(MLNR)に結合し、またグレリンは growth hormone secretagogue 受容体(GHSR)に結合し、消化管運動機能調節に重要な役割を果たす。生活習慣病や化学療法などに伴う消化管運動機能異常は重要な臨床課題の一つであり、MLNR や GHSR 作動性薬剤の開発およびその臨床応用が期待されている。

申請者は、ペプチドリガンドのモチリンは MLNR の perimembranous なアミノ酸残基に結合すること、非ペプチドリガンドのエリスロマイシンは transmembrane のアミノ酸残基に結合すること、モチリンとエリスロマイシン刺激後の細胞内シグナル伝達系は共通であること、ヒト消化管における MLNR と GHSR の発現様式に関して MLNR は消化管の筋層間神経叢と筋細胞に発現し GHSR は粘膜細胞および筋層間神経叢、筋細胞に発現していること、を明らかにしてきた。

しかしながら、MLNR、GHSR の活性化機構における二量体形成や細胞内移動、アゴニストによる脱感作機構、さらには in vivo における MLNR と GHSR のクロストーク機構に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 蛍光蛋白導入 MLNR を用いて、リガンド刺激下での受容体の細胞内動態を明らかにするとともに、連続リガンド刺激による脱感作機構を明らかにする。

(2) 蛍光蛋白導入 MLNR を用いて、リガンド刺激下での BRET 効率、ドナー - アクセプター距離から、二量体形成機構を明らかにする。

(3) ヒト MLNR トランスジェニックマウス(マウス GHSR は natural に発現)を用いて、MLNR、GHSR アゴニストの胃排泄時間、小腸通過時間に及ぼす影響を解析し、消化管運動改善に有用な薬剤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MLNR の脱感作機構の解析

Halo-tagged MLNR を作成し、Halo-tagged MLNR 持続発現 CHO 細胞株を樹立した。

Halo-tagged MLNR 発現 CHO 細胞を用い、 $0-10^{-6}$ M モチリンあるいは $0-10^{-4}$ M エリスロマイシン刺激下の細胞内カルシウム濃度変化を Fluo-8/AM 系で測定し、野生型 MLNR と生物学的機能に差がないことを確認した。

Halo-tagged MLNR 発現 CHO 細胞を用い、 $0-10^{-6}$ M モチリンあるいは $0-10^{-4}$ M エリスロマイシン刺激下の受容体の細胞内移動を共焦点レーザー顕微鏡で時間経過とともに観察するとともに、最初の刺激から 60 分後に二度目の刺激を行い、受容体の細胞内動態を観

察した。

Halo-tagged MLNR 発現 CHO 細胞を用い、リガンド連続刺激時の細胞内カルシウム濃度変化を測定し、脱感作を解析した。

(2) MLNR の二量体形成の解析

Nano-Luc MLNR を作成した。

Halo-tagged MLNR と Nano-Luc MLNR を共発現させた CHO 細胞を用い、モチリンあるいはエリスロマイシン刺激下での BRET 効率、ドナー - アクセプター距離から二量体形成を解析した。

(3) ヒト MLNR トランスジェニックマウスの解析

モチリン、エリスロマイシン、グレリン単回腹腔内投与時の胃排泄時間、小腸通過時間を解析した。

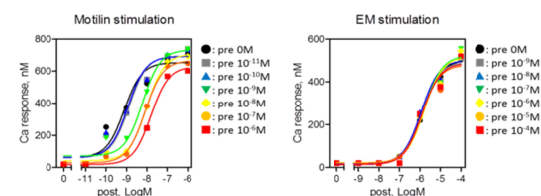
モチリン、エリスロマイシン長期投与による消化管運動への脱感作を解析した。

4. 研究成果

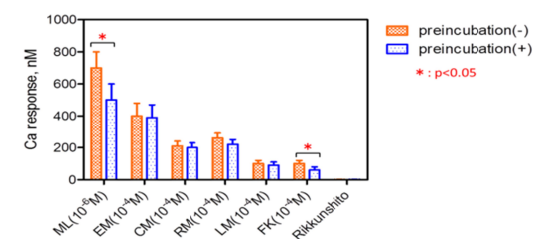
(1) MLNR の脱感作機構の解析

モチリンでは脱感作が起こるが、エリスロマイシンを含めたマクロライド系薬剤では脱感作が起こらなかった(図 1, 2)。その機序に、リガンド刺激後の MLNR の膜への recycling 時間が関与していた。

(図 1) リガンド連続刺激時の細胞内カルシウム反応曲線



(図 2) リガンド連続刺激時の細胞内カルシウム反応量



(2) MLNR の二量体形成

MLNR のリガンド刺激時の BRET 効率から、MLNR は homodimer を形成し活性化され、MLNR 間の距離は 1-10 であった。

(3) ヒト MLNR トランスジェニックマウスの解析

MLNR トランスジェニックマウスへのモ

チリン, エリスロマイシン, グレリンの単回腹腔内投与では, WT マウスに比して胃排泄時間, 小腸通過時間が短縮した。

MLNR トランスジェニックマウスへのモチリン, エリスロマイシン 2 週間投与では, 脱感作が生じた。

以上の結果から, MLNR アゴニストのうちエリスロマイシンは短期間の使用であれば, モチリンペプチドや他のマクロライド系薬剤に比し脱感作を生じにくいことが明らかとなった。

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 16 件)

Miyake T, Hirooka M, Yoshida O, Furukawa S, Kumagi T, Koizumi M, Yamamoto S, Kuroda T, Arimitsu E, Takeshita E, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y: Differences in the risk of fatty liver for onset of impaired fasting glucose according to baseline plasma glucose levels. *J Gastroenterol 査読有*, 52: 237-244, 2017.

Utsunomiya H, Yamamoto Y, Takeshita E, Tokumoto Y, Tada F, Miyake T, Hirooka M, Abe M, Kumagi T, Matsuura B, Ikeda Y, Hiasa Y: Upregulated absorption of dietary palmitic acids with changes in intestinal transporters in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Gastroenterol 査読有*, 2017. doi: 10.1007/s00535-016-1298-6

Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Furukawa S, Yoshida O, Koizumi M, Yamamoto S, Watanabe T, Yamamoto Y, Tokumoto Y, Takeshita E, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y: Low alcohol consumption increases the risk of impaired glucose tolerance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol 査読有*, 51: 1090-1100, 2016.

Yao L, Abe M, Kawasaki K, Akbar SM, Matsuura B, Onji M, Hiasa Y: Characterization of liver monocytic myeloid-derived suppressor cells and their role in a murine model of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One 査読有*, 11: e0149948, 2016.

Koh JC, Loo WM, Goh KL, Sugano K, Chan WK, Chiu WYP, Choi MG, Gonlanchanvit S, Lee WJ, Lee WJJ, Lee YY, Lesmana LA, Li YM, Liu CJ, Matsuura B, Nakajima A, Ng EKW,

Sollano JD, Wong SKH, Wong VWS, Yang Y, Ho KY, Dan YY; GOASIA Workgroup: Asian consensus on the relationship between obesity and gastrointestinal and liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol 査読有*, 31: 1405-1413, 2016.

Hiraoka A, Michitaka K, Ueki H, Kaneto M, Aibiki T, Okudaira T, Kawakami T, Yamago H, Suga Y, Tomida H, Miyamoto Y, Azemoto N, Mori K, Miyata H, Tsubouchi E, Ninomiya T, Hirooka M, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y: Sarcopenia and two types of presarcopenia in Japanese patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol 査読有*, 28: 940-947, 2016.

Matsuura B, Miyake T, Yamamoto S, Furukawa S, Hiasa Y: Usefulness of beta-cryptoxanthin for nonalcoholic fatty liver diseases. *J Food Nutr Disor 査読有*, 5: 100196, 2016.

Ikeda Y, Furukawa S, Sakai T, Niiya T, Miyaoka H, Miyake T, Yamamoto S, Senba H, Yamamoto Y, Arimitsu E, Yagi S, Utsunomiya H, Tanaka K, Takeshita E, Matsuura B, Miyake Y, Hiasa Y: Age and prevalence of esophageal reflux disease in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: The Dogo Study. *Dig Dis Sci 査読有*, 61: 3530-3536, 2016.

Yamamoto S, Oshima Y, Saitou T, Watanabe T, Miyake T, Yoshida O, Tokumoto Y, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Imamura T: Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM). *Biochem Biophys Rep 査読有*, 8: 277-283.

Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Furukawa S, Kawasaki K, Koizumi M, Todo Y, Yamamoto S, Nunoi H, Tokumoto Y, Ikeda Y, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y: Significance of exercise in nonalcoholic fatty liver disease in men: a community-based large cross-sectional study. *J Gastroenterol 査読有*, 50: 230-237, 2015.

Chen S, Akbar SMF, Miyake T, Abe M, Al-Mahtab M, Furukawa S, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M: Diminished immune response to vaccinations in obesity: role of myeloid-derived

suppressor and other myeloid cells. Obesity Res Clin Prac 査読有, 9: 35-44, 2015.

Hiraoka A, Aibiki T, Okudaira T, Toshimori A, Kawamura T, Nakahara H, Suga Y, Azemoto N, Miyata H, Miyamoto Y, Ninomiya T, Hirooka M, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Michitaka K: Muscle atrophy as pre-sarcopenia in Japanese patients with chronic liver disease: computed tomography is useful for evaluation. J Gastroenterol 査読有, 50: 1206-1213, 2015.

Kuroda T, Hirooka M, Koizumi M, Ochi H, Hisano Y, Bando K, Matsuura B, Kumagi T, Hiasa Y: Pancreatic congestion in liver cirrhosis correlates with impaired insulin secretion. J Gastroenterol 査読有, 50: 683-693, 2015.

Hiraoka A, Imai Y, Shinbata Y, Aibiki T, Okudaira T, Shiraishi A, Tatsukawa H, Kawamura T, Yamago H, Nakahara H, Azemoto N, Tanihira T, Miyata H, Ninomiya T, Minami H, Hirooka M, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Michitaka K: Clinical features of fatty liver in nonobese Japanese without regular alcohol intake. Diabetol Intern 査読有, 6: 60-65, 2015.

Miyake T, Kumagi T, Furukawa S, Hirooka M, Kawasaki K, Koizumi M, Todo Y, Yamamoto S, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y: Hyperuricemia is a risk factor for the onset of impaired fasting glucose in men with a high plasma glucose level: a community-based study. PLoS One 査読有, 9: e107882, 2014.

松浦文三, 栗田ゆきえ, 日浅陽一: 消化管ホルモン相互連関. 愛媛医学 査読無, 33: 176-179, 2014.

(学会発表) (計 5 件)

Matsuura B, Kawamura T, Yamamoto S, Senba H, Miyake T, Furukawa S, Abe M, Hiasa Y: Desensitization of the human motilin receptor by motilin and motilides. 5th Biennial Congress of the Asian Neurogastroenterology and Motility Association, 2017, 2017.3.23-25., 大阪国際会議場, 大阪府大阪市.

有光英治, 前山一隆, 丹下和洋, 宇都宮大貴, 八木専, 山本安則, 竹下英次, 池田宜央, 松浦文三, 日浅陽一: 創薬標的となる膜蛋白質受容体の発現と機能解析. 第 13 回日本消化管学会総会学術集会,

2017.2.17-18., 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市.

Matsuura B, Yamamoto S, Miyake T, Furukawa S, Hiasa Y: Effectiveness of beta-cryptoxanthin for nonalcoholic steatohepatitis. UEGW 2016, 2016.10.15-19., Vienne, Austria.

Koh JC, Loo WM, Chan WK, Chiu WYP, Choi MG, Goh KL, Gonlachanvit S, Lee YY, Lesmana LA, Li YM, Liu CJ, Matsuura B, Nakajima A, Sollano JD, Sugano K, Wong VW, Ho KY, Dan YY: Increasing obesity and GI diseases in Asia - Gut and obesity in Asia (GOASIA) consensus statements on obesity and gastrointestinal diseases. APDW 2015, 2015.12.3-6., Taipei, Taiwan.

松浦文三: 消化管ホルモン研究を通じて. 第 101 回日本消化器病学会四国支部例会, 2014.6.14-15., 松山市総合コミュニティセンター, 愛媛県松山市.

(図書) (計 3 件)

松浦文三: 消化管ホルモン. 矢崎義雄編: 内科学第 11 版. 朝倉書店, 東京, 2017.

松浦文三, 利光久美子: がん治療における副作用とその対応. 日本病態栄養学会編: がん病態栄養専門管理栄養士のためのがん栄養療法ガイドブック. メディカルレビュー社, 東京, p75-80, 2015.

松浦文三: 肥満と消化器疾患. 日本消化器病学会編: 消化器病診療 第 2 版. 医学書院, 東京, p490-494, 2014.

(その他)

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦文三(Matsuura, Bunzo)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座・教授

研究者番号: 80284420

(4) 研究協力者

川村智恵(Kawamura, Tomoe)

愛媛大学・大学院生

高野阿希子(Takano, Akiko)

愛媛大学・職員

Miller, Lawrence J

Mayo Clinic Arizona・Professor