

令和元年6月25日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08947

研究課題名(和文) NSAIDs小腸潰瘍の初期病変に関連する標的分子TRPイオンチャネル

研究課題名(英文) TRP ion channel related to the pathogenic mechanism of small intestinal ulceration induced by NSAIDs use

研究代表者

杉山 敏郎 (Sugiyama, Toshiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・特任教授

研究者番号：00196768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： NSAIDs使用の増加により、小腸潰瘍が増加している。小腸潰瘍は抗生剤投与によって抑制でき、腸内細菌あるいは代謝産物による局所炎症が重要であるが、炎症惹起因子の組織内透過に關与する分子機序は不明である。

小腸上皮細胞株を用いた研究から、NSAIDs添加後にアラキドン酸カスケード代謝産物である8,9 EETが細胞内に蓄積、TRPV4の活性化を介して細胞膜透過性亢進を惹起することが判明した。NSAIDs小腸潰瘍予防にTRPV4活性化阻害効果を有する薬剤が有望であり、TRPV4活性化阻害効果を有する薬剤が選出され、ある種の既存薬がTRPV4活性化阻害効果を有することが判明、臨床試験が計画にある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NSAIDs小腸潰瘍の効果的な予防法はなく、その形成機序の研究から小腸的な予防法の確立が期待されている。NSAIDs小腸潰瘍形成には腸内細菌あるいは腸内細菌関連炎症惹起因子の小腸組織内侵入が重要であり、それに関わる上皮細胞膜透過性亢進の詳細な分子機序の解明が新たな予防戦略の道を切り開く。

本研究から小腸上皮細胞膜透過性亢進にはイオンチャネルであるTRPV4活性化が引き金であり、ある既存薬(米国で発売、他疾患治療に使用されている)がNSAIDsによるTRPV4活性化、細胞膜透過性亢進を阻害することが明らかとなり、新規のNSAIDs起因性小腸潰瘍予防薬として有望であり、臨床試験が計画である。

研究成果の概要(英文)： NSAIDs-induced small intestinal ulcerations are rapidly increasing, however the effective prevention has not been established. As the ulcerations are prevented by the use of broad spectrum antibiotics, the intestinal inflammation by intestinal flora or the metabolites should be attributed. However, the molecular mechanism related to increased permeability of small intestinal epithelial cells by NSAIDs use is not elucidated.

By the permeability experiment with small intestinal epithelial cells, NSAIDs accelerated the permeability via the accumulation of 8,9 EET, which is the metabolites of membrane arachidonic acids and activated TRPV4. The activated TRPV4 is attributed to the increase of permeability. By this assay system, one candidate drug was selected, which showed the inhibition of TRPV4 activation and inhibited the increased permeability of intestinal epithelial cells induced by NSAIDs. Clinical trials are planning to confirm the preventing effect of the candidate.

研究分野：消化器病学

キーワード：非ステロイド系抗炎症剤 小腸潰瘍 透過性亢進 TRPV4

1. 研究開始当初の背景

小腸内視鏡の進歩および高齢化社会による非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）使用の増加に伴って、NSAIDsによる小腸潰瘍の発生頻度が急増している。しかし、NSAIDs小腸潰瘍発症機序の詳細は不明である。実験動物による検討から、潰瘍形成は抗生剤投与によって抑制でき、腸内細菌あるいは代謝産物による局所炎症が重要であることが判明しているが、炎症惹起因子の組織内透過にNSAIDsがどのように関与しているかは全く不明である。本研究ではNSAIDs使用が小腸上皮細胞膜透過性を亢進させ、これに続く細菌代謝産物による炎症惹起の最初のトリガーとなる分子基盤を明らかにして、新規の小腸潰瘍予防創薬への道を拓くことを目的とする

2. 研究の目的

細胞 transient receptor potential (TRP) イオンチャネルが血管内皮細胞透過性亢進を惹起することが報告されており、本研究では小腸上皮細胞のTRPチャネルの同定、NSAIDsが小腸上皮細胞TRPチャネルの活性化を介して細胞透過性を亢進させ、これに続く細菌代謝産物による炎症惹起の最初のトリガーとなる可能性を検討し、小腸潰瘍予防創薬への道を拓くことを目的とする

3. 研究の方法

- (1) 野生型およびTRPV4ノックアウトマウス非選択的NSAIDs、COX1、COX2選択的NSAIDs投与小腸潰瘍モデルによる検討
- (2) 小腸上皮細胞のTRPチャネルの同定、RT-PCR法および免疫染色によるmRNAおよび蛋白発現と局在、小腸組織内炎症性サイトカインmRNAおよび蛋白発現
- (3) NSAIDsによる小腸上皮細胞膜透過性亢進機序に関わるTRPV4の役割
- (4) TRPV4活性化阻害薬、のスクリーニング

4. 研究成果

- (1) 野生型およびTRPV4ノックアウトマウス非選択的NSAIDs、COX1、COX2選択的NSAIDs投与小腸潰瘍モデルによる検討
C57BL/6野生型マウスの腹腔内に非選択的NSAIDs、COX1、COX2選択的NSAIDsを投与し、小腸潰瘍モデルを作成し、潰瘍面積測定により評価した。対象としてアモキシシリン前投与マウスを陽性対象とした。その結果、非選択的NSAIDs投与、COX1、COX2選択的NSAIDs投与の3群間で小腸潰瘍の頻度は差違が無く、上部消化管潰瘍と異なり、NSAIDs小腸潰瘍はCOX2選択的NSAIDs投与では予防できないことが判明した。他方、TRPV4ノックアウトマウスではNSAIDs投与小腸潰瘍形成が劇的に抑制されることが動物モデルでも確認でき、NSAIDs小腸潰瘍形成機序にはTRPV4が重要なキー分子であることが明らかとなった。

TRPV 4 野生型マウス

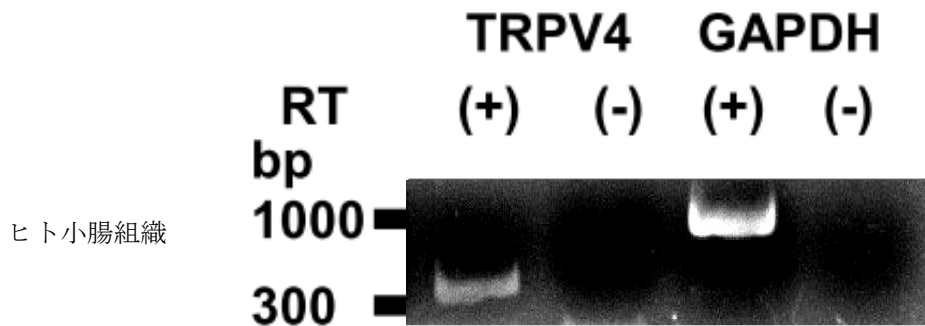


TRPV 4 ノックアウトマウス

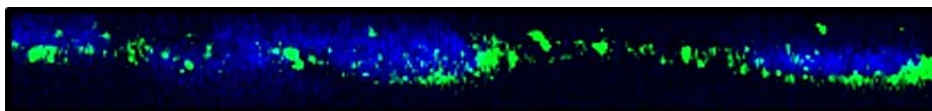


(2) 小腸上皮細胞の TRP チャンネルの同定、RT-PCR 法および免疫染色による mRNA および蛋白発現と局在、小腸組織内炎症性サイトカイン mRNA および蛋白発現

ヒト、ラット、マウス小腸上皮細胞には TRPV4 イオンチャンネル mRNA および蛋白が発現しており、TRPV4 蛋白は側基底膜に発現しており、血中の NSAIDs と接触、その作用を受けることが推測される。



ラット単層培養 IEC-6 小腸細胞の TRPV4 の局在 (緑色)

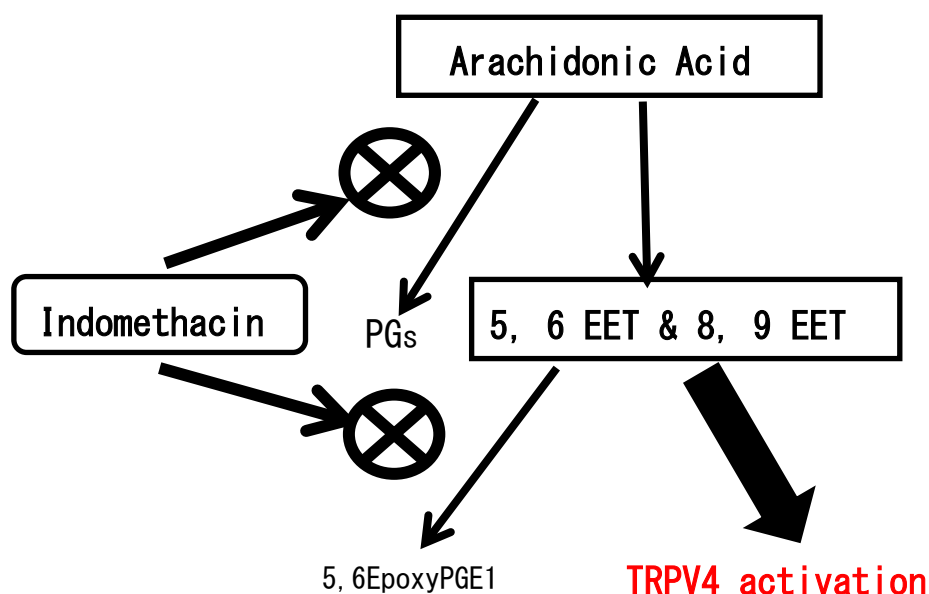


C57BL6 野生型および TRPV4 ノックアウトマウスの NSAIDs 小腸潰瘍モデルには小腸組織内局所 TNF- α および IL6 炎症性サイトカインの mRNA および蛋白発現が亢進しており、炎症惹起因子の組織内への侵入が示唆された。

(3) NSAIDs による小腸上皮細胞膜透過性亢進機序と TRPV4

ラット小腸上皮細胞株 IEC-6 をトランスウェル内で単層培養し、コンフルエント状態まで培養した後に、トランスウェルの上層および下層間の電気抵抗をモニターし、電気抵抗を測定し、細胞膜透過性を評価した。この系の上層あるいは下層に NSAIDs と共に TRPV4 活性化剤 (GSK1016790A) あるいは TRPV4 阻害剤 (RN1734) 添加し、細胞膜透過性を評価した。その結果、

NSAIDs 添加時の細胞内 5, 6 EET および 8, 9 EET が小腸上皮細胞内に蓄積し、この代謝産物が TRPV4 の活性化を介して、小腸上皮細胞の膜透過性亢進を惹起していることが判明した。この透過性亢進は TRPV4 活性化剤 (GSK1016790A)、TRPV4 阻害剤 (RN1734) 添加および TRPV4 ノックダウン IEC-6 小腸上皮細胞では阻止され、TRPV4 がキー分子であることが判明した。さらに膜透過性亢進には少量の LPS 添加によって、さらに亢進し、この結果からも NSAIDs による小腸潰瘍形成に腸内細菌叢が関連していることが理解できる。しかし、NSAIDs による小腸潰瘍予防のために腸内細菌叢を大きく変化させることは、現実的な予防戦略とはできないため、この系を用いて TRPV4 活性化阻害効果を有する薬剤のスクリーニングを行った。



(4) TRPV4 活性化阻害薬のスクリーニング

上記のラット小腸上皮細胞株 IEC-6 単層培養系を用いた研究から TRPV4 活性化を介して、小腸上皮細胞の細胞膜透過性亢進を惹起していることが判明したため、この系を用いて TRPV4 活性化阻害効果、細胞膜透過性亢進阻害効果を有する薬剤のスクリーニングを行った。この検討から、ある種の既存薬が TRPV4 活性化阻害効果、細胞膜透過性亢進阻害効果を有することが判明した。本薬剤は米国で既に市販され、臨床使用されているため、ヒトへの応用上の安全性は確保されていると推定されるため、今後、ヒトでの臨床試験が計画されている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Mihara H., Sugiyama T., et al. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) regulation of ATP release by the ATP transporter VNUT: a novel therapeutic target for gastrointestinal baro-reception and chronic inflammation. Digestion 2019 (in press)

2. Mihara H, Sugiyama T, et al. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) silencing in Helicobacter pylori-infected human gastric epithelium, Helicobacter. 2017 Apr;22(2). doi: 10.1111/hel.12361.

3. Mihara H, Sugiyama T et al. Transient receptor potential vanilloid 4-dependent calcium influx and ATP release in mouse and rat gastric epithelia. World J Gastroenterol 22::5512-9. doi: 10.3748/wjg.v22.i24.5512, 2016

4. 三原 弘, 杉山敏郎, H. pylori 感染胃粘膜の TRPV4 メチル化, Prog Med 35:431-433, 2015

5. 杉山敏郎, 腸内細菌叢と消化器疾患, 日本医事新報 4739, 54, 2015

[学会発表] (計 2 件)

1. Mihara H, Sugiyama T, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-induced ATP exocytosis from stomach and colon epithelialium in human cell lines and mouse, 米国消化器病週間 2018, 5/June, 2018, Washington DC, USA

2. 三原 弘, 杉山敏郎. 機能性ディスぺプシアにおける TRPV4 の関与. 「消化管機能性疾患の新展開」ー機能性ディスぺプシアの病態・標的分子ー. 第 14 回日本消化管学会総会学術集会コアシンポジウム 3 ; 2018 Feb 9-10 ; 東京

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 三原 弘

ローマ字氏名 : Hiroshi Mihara

所属研究機関名 : 富山大学大学院

部局名 : 医学薬学研究部 (医学)

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 00612623

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。