

令和 元年 5月 20日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08287

研究課題名(和文) 難治性消化管疾患の病態制御における温度感受性TRPV4チャネルの役割

研究課題名(英文) The role of TRPV4 in the regulation of gastrointestinal disorders

研究代表者

松本 健次郎(Matsumoto, Kenjiro)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10406770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TRPV4は27～35℃の温度だけでなく多くの物理的刺激やアラキドン酸代謝物により活性化する非選択性陽イオンチャネルである。本研究では炎症性腸疾患と生理的味覚受容におけるTRPV4の役割について検討を行った。炎症性腸疾患モデルにおいて、血管内皮に発現増大したTRPV4はJNKシグナルの活性化を介してVE-cadherin発現を有意に低下させることで血管透過性を増大し、大腸炎症の悪化に關与することが示唆された。マウス舌におけるTRPV4の発現局在と味覚感受性との關連について検討を行った。TRPV4は、III型味細胞に発現し、酸味受容細胞であるIII型味細胞への分化及び増殖に關与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患は患者のQOLを著しく下げることから、臨床的に大きな問題となっている。しかし、病態については不明な部分が多い。TRPV4は病態時において血管内皮細胞に増加し血管透過性を制御することで炎症性細胞の組織への浸潤を調整していることが示唆された。炎症性腸疾患の新たな治療薬標的となることが期待される。味覚は、甘味、旨味、塩味、酸味、苦味の5味から形成されている。TRPV4が酸味受容に關わっており、III型味細胞からIII型味細胞への分化を制御していることを示唆するデータを得た。これはTRPV4が酸味の受容において重要な因子であることを示唆するものであり、生理的に非常に意義のある発見である。

研究成果の概要(英文)：TRPV4 channel is a non-selective cation channel that responds to mechanical, thermal and chemical stimuli, in addition to various endogenous ligands such as arachidonic acid metabolites. The present study aimed to investigate the role of TRPV4 in DSS-induced colitis and taste in mice. TRPV4 are highly upregulated in vascular endothelial cells of the colon during DSS-induced colitis. TRPV4 activation induce JNK phosphorylation, and decrease VE-cadherin expression in endothelial cells. An up-regulation of TRPV4 channels in vascular endothelial cells contributes to the progression of colonic inflammation by increasing vascular permeability. We investigated the function and expression of TRPV4 in taste buds using Trpv4-deficient mice. TRPV4 contributes to sour taste sensing by regulating type III taste cell differentiation in mice.

研究分野：薬理学

キーワード：炎症性腸疾患 味覚 TRPチャネル 血管内皮細胞 透過性 分化 酸味

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管は粘膜上皮細胞をへだてて外界と接しており、様々な情報を感知するだけでなく、免疫系を複雑に発達させることで、恒常性を維持している。しかしこのシステムが破綻することにより、炎症など様々な病態を引き起こす。炎症性腸疾患(IBD)、抗がん剤の使用に伴う小腸、味覚障害、過敏性腸症候群などは、患者の QOL を著しく下げることから、臨床的に大きな問題となっている。しかし、これらの疾患の病態については不明な部分が多く、医療上の必要性に十分に応える治療薬が無いのが現状である。温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルは細胞外の環境変化を感じ取るセンサーの役割を担っている。TRP チャンネルは多くの臓器に発現しているが、外界とつながる臓器である消化管において、重要な役割を担っている。そのため TRP チャンネルは、難治性消化管疾患に対する新しい創薬標的として注目されている。

代表者は、TRP チャンネルの消化管炎症や内臓痛における役割について研究を行ってきた。その中で、カプサイシンの受容体である TRPV1 が食道や大腸の知覚神経に発現し、消化管炎症時の内臓痛覚過敏に関わっていることを明らかにした。さらに酸化的ストレスによって活性化される TRPM2 が免疫細胞や知覚神経に発現し、内臓感覚を制御していることを明らかにした。本研究で着目する TRPV4 は、低浸透圧刺激や機械刺激の受容に関わっており、外界の刺激を受けやすい粘膜上皮や知覚神経に発現している。臨床研究から、多くの TRP 内因性リガンドのなかで、特に TRPV4 リガンドが、内臓痛覚過敏の患者で顕著に増加していることが明らかとなった (Gastroenterology 2015;149:433-)。このような背景から、代表者は TRPV4 が消化管の病態時のセンサーとして、非常に重要な役割を担っていると考え、研究を開始し、以下の知見を得た。

- (1) 大腸上皮、神経における TRPV4 の局在は、消化管炎症下では血管内皮細胞に変化する。
- (2) TRPV4 は IBD、IBD 関連大腸がんの病態の進行に関与している。
- (3) 生理的条件下で TRPV4 は舌の粘膜上皮に最も多く発現し、抗がん剤投与により発現増加する。

2. 研究の目的

本研究では、多様な動物モデルにおいて、TRPV4 遺伝子欠損動物と野生型の病態評価と TRPV4 の病態時の局在・発現変化から標的疾患を絞っていく。本研究では消化管における TRPV4 の局在と病態における変化とその役割について以下の検討を行った。

IBD モデルにおいて、炎症時に顕著に増大する血管内皮の TRPV4 を介した、病態制御のメカニズムを検討する。

・味覚受容における TRPV4 の関与を明らかにする

3. 研究の方法

(1) IBD モデル動物の作製と病態評価

各種 TRP 遺伝子欠損と野生型マウスに 2%デキストラン硫酸ナトリウムを 7 日間自由飲水し大腸を摘出する。病態評価は期間中の体重変化、下痢、血便と摘出大腸の長さ、病理所見、好中球浸潤により行った。

(2) TRPV4 の活性化と血管透過性亢進メカニズムの解明

TRPV4 活性化薬 GSK1016790A 処置後の変化を以下の実験系において測定する。また選択的拮抗薬 (RN1734) を用いて TRPV4 の関与を明らかにした。

・エバンスブルー法: マウス吸入麻酔下 0.5% Evans blue を 0.2mL 尾静脈内投与し、2 時間後 Saline 還流、遠位結腸を摘出し、透過した Evans blue を測定した。

・ウェスタンブロットティング: TRPV4、JNK、p-JNK

・免疫組織染色: 撮影は共焦点レーザー顕微鏡 (機関所有 Nikon A1) で行った。

(3) 味嗜好性の変化

基本味 (甘味、酸味、苦味、塩味及びうま味) の味覚感受性に対する影響を、定量的味覚感受性行動試験である、リック試験 1 及び二瓶選択試験 2 にて検討した。

1 味溶液をマウスに呈示し、10 秒間にその給水ノズルを舐める回数 (リック数) を測定する試験法

2 水と味溶液の入ったボトルをマウスに呈示し、総飲水量のうち味溶液を飲んだ割合を測定する試験法

(4) 味受容体の発現変化、神経線維の形態学的変化の検証

TRP チャンネル、味受容体、神経線維の形態学的変化、発現はそれぞれ免疫組織染色、リアルタイム PCR によって行った。

4. 研究成果

1. DSS 誘起 IBD モデルの病態の進行における TRPV4 の関与

2% DSS 7 日間処置は、野生型 (WT) では、顕著な体重減少、下痢・下血を誘起し、7 日目には大腸の短縮、好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシゲナーゼ活性の増大および組織学的傷

害を惹起した。DSS 処置によるこれらの変化は、TRPV4 遺伝子欠損マウス (TRPV4KO) では、WT とくらべ、いずれも有意に抑制された。さらに TRPV4 選択的作用薬である GSK1016790A を DSS 投与期間中 1 日 1 回 (20 μ g/マウス) 結腸内投与したところ、DSS 処置 WT 群と比べ有意な体重減少、下痢・下血を誘起し、7 日目には大腸の短縮、好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシゲナーゼ活性の有意な増大および組織学的傷害の悪化が確認された TRPV4KO マウスを用いた本研究の結果から、TRPV4 は DSS 誘起大腸炎の病態の悪化に関与していることが明確となった。

次に DSS 誘起大腸炎における造血細胞の影響を検討するため、X 線照射により骨髄破壊した WT、TRPV4KO に WT もしくは TRPV4 から採取した骨髄細胞を移植することで、骨髄キメラマウスを作製した。DSS 誘起大腸炎は、ドナーが WT および TRPV4KO にかかわらず、レシピエントが TRPV4KO の場合に病態の進行が有意に抑制された。よって大腸炎の進行には骨髄由来細胞の TRPV4 ではなく、非骨髄由来の部位に発現する TRPV4 が関与していることが示唆された。

2. IBD モデルの病態の進行における TRPV4 の発現変化

マウス遠位結腸における TRPV4 の局在を免疫組織染色により検討したところ、TRPV4 は正常時において上皮細胞様の構造に免疫活性が観察された。DSS 処置 7 日目の遠位結腸では粘膜、粘膜下層の血管様の構造に発現増大していた (図 1A)。この免疫活性は TRPV4KO では消失していた (図 1B)。ウエスタンブロットによる検討から、正常時と比べ TRPV4 は病態時において、その発現量が有意に増大していた (図 1C)。

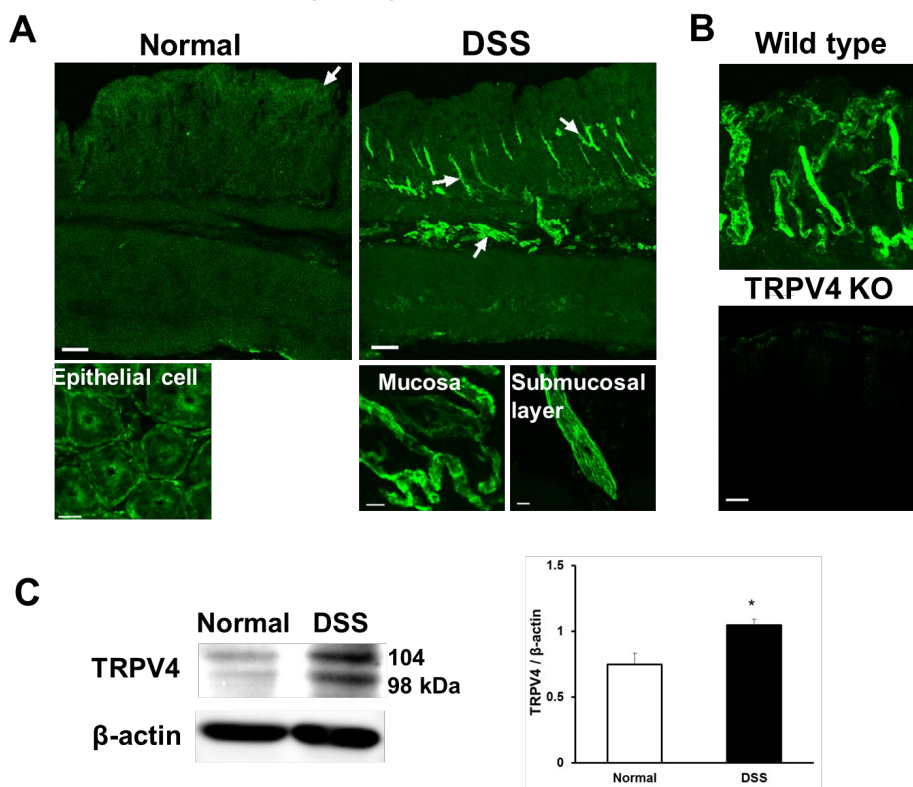


図 1 TRPV4 は病態時、遠位結腸において発現増大する。DSS 投与前 (Normal) 投与 7 日目 (DSS) の遠位結腸における TRPV4 の免疫組織学的染色画像 (A)。WT、TRPV4KO における TRPV4 の免疫活性 (B)。ウエスタンブロットによる Normal、DSS 処置時の TRPV4 (104, 98 kDa) の発現変化 (C)。データは平均 \pm SEM *P < 0.05 vs normal-WT (n = 7)

次に DSS 誘起 IBD モデルにおける TRPV4 の変化について、DSS 投与前 (Normal) 投与 4 日目 (Day 4) 7 日目 (Day 7) に遠位結腸を摘出し、免疫組織染色を行った。TRPV4 は上皮細胞マーカー keratin と共局在した。TRPV4 の免疫活性は Day4、Day7 と炎症の進行に伴って粘膜、粘膜下層の血管様の構造に増加し、Normal と比して Day7 では約 40 倍増加した。一方、筋層における TRPV4 発現は変化しなかった。Day4、Day7 において血管様の構造上の TRPV4 は血管内皮マーカーである CD31 との共局在が観察された。粘膜の CD31 は、Normal と比して Day7 では約 2 倍に増加したが、粘膜下層、筋層の CD31 は Normal とくらべて有意な変化は確認されなかった。また粘膜においてリンパ管マーカー LYVE-1、知覚神経マーカー CGRP と TRPV4 との共局在は確認されなかった。Day4、Day7 の粘膜下層において TRPV4 陽性細胞の増加が観察され、この免疫活性はマクロファージマーカー F4/80 と共局在した。しかしながら F4/80 陽性細胞の大部分は TRPV4 と共局在しなかった。これらの結果をまとめると、TRPV4 は消化管炎症の進行にともない、上皮細胞から粘膜、粘膜下層の血管内皮細胞に発現変化・増大することが明らかとなった。また TRPV4 は炎症時、粘膜下層のマクロファージに一部発現することが示唆された。

正常時の上皮細胞上に TRPV4 発現は検出されたが、血管内皮細胞における TRPV4 発現とくらべその免疫活性は非常に弱いものであった。また Day7 において TRPV4 陽性細胞は F4/80 と共局在したが、多くの F4/80 陽性細胞は TRPV4 と共局在しなかった。

3. TRPV4 を介した血管透過性制御機構

炎症時に血管内皮細胞に増大する TRPV4 と血管透過性の関連性を明らかにするため、エバンスブルー0.2 mL を静脈内投与 2 時間後に遠位結腸を摘出し、腸管へのエバンスブルーの漏出量を測定した (図 2)。DSS 処置は血管透過性を亢進させたが、この増大は WT と比較して TRPV4KO では有意に抑制された (図 2A, B)。TRPV4 作用薬である GSK1016790A の静脈内投与 (3 μ g/kg) は、WT において DSS 処置による血管透過性の亢進をさらに増大させたが、この作用は TRPV4 拮抗薬である RN1734 (600 μ g/kg) の静脈内投与により拮抗された (図 2C)。

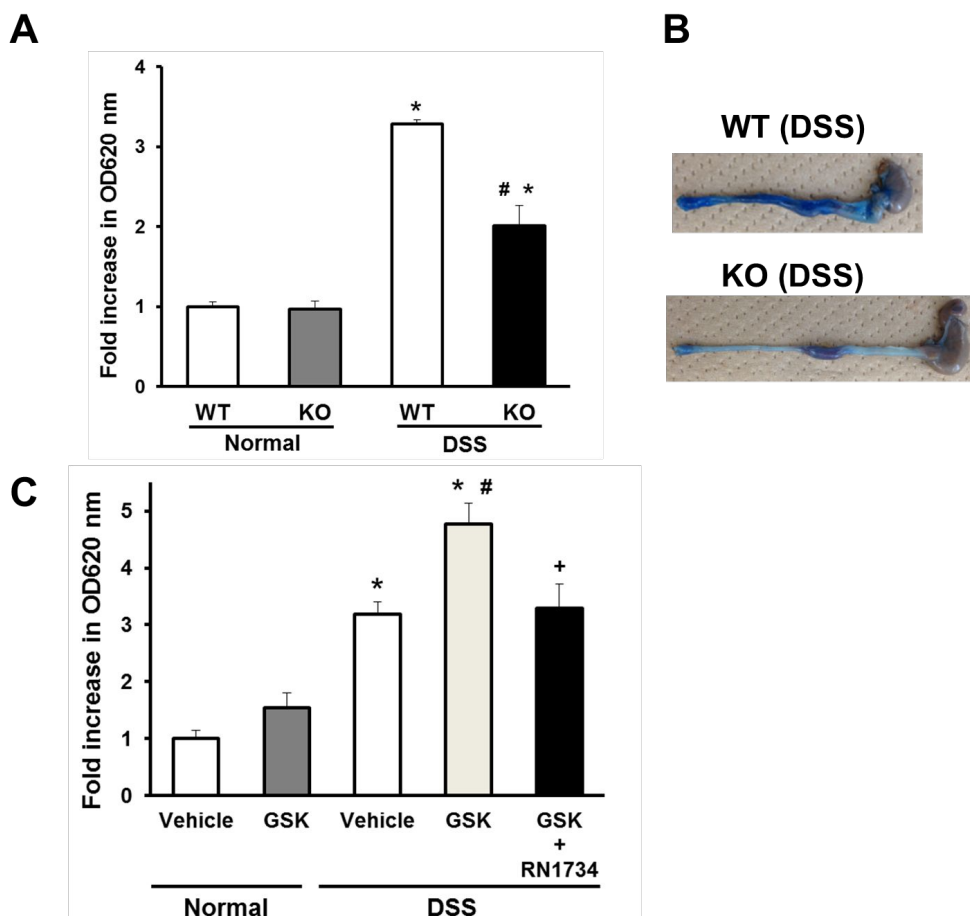


図 2 TRPV4 は DSS 誘起大腸炎における血管透過性の亢進に関与する。 エバンスブルー静脈内投与 2 時間後の、WT、TRPV4KO マウス遠位結腸における漏出量の評価 (A) と DSS 処置 WT、TRPV4KO 大腸の典型写真 (B)。データは平均 \pm SEM、* P < 0.05 vs normal WT もしくは normal KO マウス、# P < 0.05 vs DSS WT マウス ($n = 7$)。DSS 処置前 (normal) 7 日間処置後 (DSS) における TRPV4 作用薬 GSK1016790A (GSK) のエバンスブルー漏出量における影響と TRPV4 拮抗薬 RN1734 の効果 (C)。データは平均 \pm SEM、* P < 0.05 vs normal vehicle もしくは normal GSK 群、# P < 0.05 vs DSS vehicle 群、+ P < 0.05 vs DSS GSK 群 ($n = 7$)

次に内皮細胞の主要な接着因子である VE-cadherin の変化について免疫組織染色により検討を行った。Day7 において、VE-cadherin の構造は Normal と比べて脆弱化した。GSK1016790A の静脈内投与 (10 μ g/kg, Days 2, 4, 6) により、Day7 の VE-cadherin 陽性面積は vehicle 投与群と比して有意に減少した。また血管内皮に発現増大した TRPV4 の免疫活性は VE-cadherin と共局在した。

最後にマウス大動脈由来内皮細胞株において、TNF- α 処置、TNF- α /GSK1016790A 併用時の TRPV4、VE-cadherin の変化について、ウエスタンブロットにより検討を行った。TNF- α 、6 時間処置によって、TRPV4 の発現量は処置前と比べ有意に増加したが、VE-cadherin は変化しなかった。TNF- α /GSK1016790A の併用において、TRPV4 の発現量は処置前と比べ有意に増加した。一方 VE-cadherin は有意に減少した。過去の報告から、JNK シグナルは VE-cadherin の発現、血管透過性を調節していることが示唆されている (12, 13)。VE-cadherin の発現に影響を与える JNK のリン酸化について TNF- α 処置、GSK1016790A 処置、TNF- α /GSK1016790A 併用時の検討をおこなった。その結果 TNF- α /GSK1016790A 併用時において JNK のリン酸化が確認されたが、TNF-

、GSK1016790A それぞれの単独処置では影響を及ぼさなかった。したがって、JNK シグナル経路の活性化には、炎症下 TNF- の反応が必要である可能性が示唆された。これらの結果から、DSS による大腸炎症時、TRPV4 の活性化により JNK シグナルが活性化し、VE-cadherin が減少していることが示唆された。

4. 味覚受容における TRPV4 の関与

免疫組織学的検討から、C57Bl6 マウスにおいて TRPV4 は、食道、胃、小腸および大腸などの消化管に広く発現しており、特に舌で最も顕著であった (図 3A, B)。味細胞マーカーとの二重免疫染色により TRPV4 は、sonic hedgehog 陽性の味蕾前駆細胞 (IV 型) に発現していることが明らかとなった (図 3C)。さらに野生型 (WT) と TRPV4 遺伝子欠損動物 (TRPV4KO) を用いて味嗜好性の解析を行ったところ、TRPV4KO は WT と比較して、酸味溶液に対する感受性が有意に低下していた。TRPV4KO の味蕾内における、酸味受容細胞である III 型味細胞マーカーの免疫活性および mRNA 発現は WT と比較し有意に減少していた。さらに、TRPV4KO では、味蕾における Ki67 陽性細胞数および カテニン発現が WT と比べて低かった。ゆえに、TRPV4 は酸味受容細胞である III 型味細胞への分化および増殖を制御することで、酸味の感受性に影響していることが示唆された。

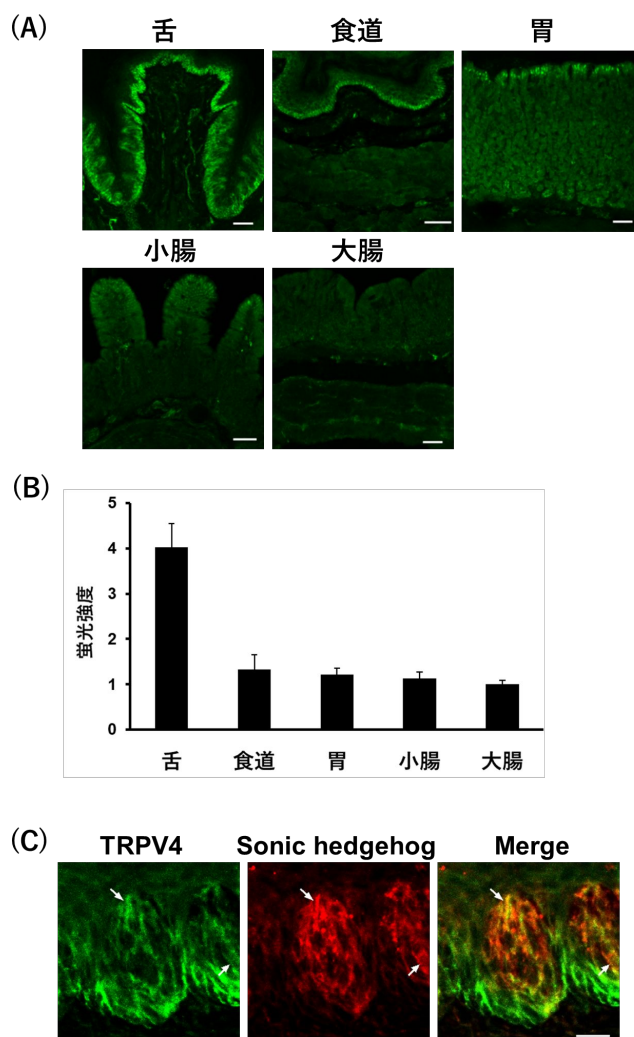


図 3 マウス消化管における TRPV4 発現 マウス舌、食道、胃、小腸、大腸における TRPV4 の免疫組織学的染色画像 (A) と各部位の蛍光強度 (B)。データは平均 ± SEM (n = 7)。スケールバーは 50 μ m。マウス舌 (有核乳頭) における TRPV4 と sonic hedgehog の 2 重染色画像、矢印は共局在部位を示す (C)。スケールバーは 20 μ m。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Matsumoto K, Ohishi A, Iwatsuki K, Yamazaki K, Takayanagi S, Tsuji M, Aihara E, Utsumi D, Tsukahara T, Tominaga M, Nagasawa K, Kato S. Transient receptor potential vanilloid 4 mediates sour taste sensing via type III taste cell differentiation. Scientific Reports, 9, 2019, 6686. 査読有 DOI: 10.1038/s41598-019-43254-y.

Matsumoto K, Kawanaka H, Hori M, Kusamori K, Utsumi D, Tsukahara T, Amagase K, Horie S, Yamamoto A, Ozaki H, Mori Y, Kato S. Role of transient receptor potential melastatin

2 in surgical inflammation and dysmotility in a mouse model of post-operative ileus. American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology, 318, 2018, G104-G116. 査読有 DOI: 10.1152/ajpgi.00305.2017.

Utsumi D, Matsumoto K, Tsukahara T, Amagase K, Tominaga M, Kato S. Transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential ankyrin 1 contribute to the progression of colonic inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Journal of Pharmacological Sciences, 36, 2018, 121-132. 査読有 DOI: 10.1152/ajpgi.00305.2017. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.12.012.

Matsumoto K, Yamaba R, Inoue K, Utsumi D, Tsukahara T, Amagase K, Tominaga M, Kato S. Transient receptor potential vanilloid 4 channel regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. British Journal of Pharmacology, 175, 2018, 84-99. 査読有 DOI: 10.1111/bph.14072.

Matsumoto K, Takagi K, Kato A, Ishibashi T, Mori Y, Tashima K, Mitsumoto A, Kato S, Horie S. Role of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels in visceral nociception and hypersensitivity. Experimental Neurology, 285, 2016, 41-50. 査読有 DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.09.001.

〔学会発表〕(計7件)

松本 健次郎、加藤 伸一 Involvement of transient receptor potential vanilloid (TRPV4) in the regulation of murine colitis and colitis-associated cancer model. 日本薬理学会(招待講演) 2019

松本 健次郎、堀江 俊治、加藤 伸一 幼少期マウス社会的敗北ストレスを用いた、過敏性腸症候群モデルの検討. 神経消化器病学会 2018

松本 健次郎、天ヶ瀬 紀久子、加藤 伸一 マウス IBD 関連大腸がんの病態における温度感受性 TRPV4 チャンネルの役割. 日本潰瘍学会 2018

Matsumoto K, Utsumi D, Amagase K, Tominaga M, Kato S. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulfate sodium-induced murine colitis. Experimental Biology (国際学会) 2017

松本 健次郎 難治性消化管疾患の病態制御における温度感受性 TRP チャンネルおよびセロトニン 5-HT₃ 受容体の役割解明 生体機能と創薬シンポジウム(招待講演) 2017

松本 健次郎、堀 正敏、堀江 俊治、天ヶ瀬 紀久子、尾崎 博、森 泰生、加藤 伸一 TNBS 誘起内臓痛覚過敏、術後麻痺性イレウスの病態における TRPM2 の機能解析 第13回 TRP チャンネル研究会 2017

松本 健次郎、天ヶ瀬紀久子、加藤伸一 マウス大腸炎および大腸炎関連発がんにおける血管内皮細胞発現 TRPV4 の関与 第35回サイトプロテクション研究会 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

京都薬科大学 薬物治療学分野ホームページ

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/chiryu/chiryu-j.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：加藤 伸一、富永 真琴

ローマ字氏名：SHINICHI KATO, MAKOTO TOMINAGA

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。