

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09391

研究課題名(和文) 消化管運動の調節に關与する新規イオンチャネルの同定と機能解析

研究課題名(英文) The function of new intestinal ionchannel on gastrointestinal motility

研究代表者

神谷 武 (Kamiya, Takeshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：10254301

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)：我々は消化管運動調節に關与する新規イオンチャネル候補として、酸感受性イオンチャンネル4(ASIC4)の消化管における発現とその機能について検討した。X-gal染色ではASIC4がマウスの空腸から遠位結腸にかけて筋間神経叢に発現し、さらに興奮性および抑制性両神経細胞への発現を認めた。ASIC4ノックアウト(KO)マウスと野生型マウスを比較すると、消化管輸送能ではKOマウスで遅延がみられた。両者の摘出腸管をマグヌス法で測定すると、KOマウスではアセチルコリンに対する収縮反応は小さく、高濃度ニコチンに対する弛緩反応は認めなかった。この結果、ASIC4は下部消化管運動に關与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASIC4はこれまで消化管での発現の報告がなくその受容体機能も不明であったが、本研究によりASIC4の機能の一端が明らかになった。この結果は、ASICの研究のさらなる発展につながると思われる。さらにASIC4は下部消化管運動に關わる新規受容体候補分子となり、過敏性腸症候群、慢性便秘症や機能性下痢症に代表される高頻度な機能性腸疾患に対する新しい治療戦略の鍵分子となる可能性も示された。今回のこれら研究成果は、イオンチャネル研究のみならず、common diseaseである機能性腸疾患に対するアプローチという観点からも、医療経済面も含め現代社会への貢献度は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although acid-sensing ion channel 4 (ASIC4) is a novel mechanical ion channel, the expression and the function in the gastrointestinal (GI) tract is unknown. The aims of this study was to investigate and the function of ASIC4 in the mouse GI tract. RT-PCR analysis showed that ASIC4 transcripts were obtained from the jejunum to distal colon in adult mice. X-gal staining revealed that ASIC4 was expressed in the myenteric plexus. α -galactosidase activity was found in both Ach+ and NOS+ neurons. ASIC4 knock out (KO) mice showed delayed intestinal transit time compared with wild type mice by phenol red method. The ileum of ASIC4-KO mice revealed weak response to Ach and high dose nicotine by Magnus assay. These results suggested that ASIC4 may play an important role in GI motor function.

研究分野：消化器内科学

キーワード：イオンチャネル ASIC4 消化管運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

機能的消化管障害の1カテゴリーである機能的腸疾患は、過敏性腸症候群、慢性便秘症、機能的下痢症に代表される機能的腸疾患は高頻度の疾患である。日常臨床では既存の薬剤に奏効しない症例も多数存在することより、病態のさらなる解明と新規治療薬の開発が望まれ、そのためには未知の消化管運動の分子メカニズムを検討することが必要となる。

酸感受性イオンチャネル(acid-sensing ion channel: ASIC)はアミロライド感受性の陽イオンチャネルで、6つのサブタイプから構成されている。このうちASIC4は他のASICに比べ研究が立ち遅れており、その機能の詳細は未だ不明である。

我々はASIC4-lacZレポーターマウスを作成し、X-gal染色により生体内でのASIC4の発現について解析したところ、消化管では食道～大腸の広範囲、特に小腸～大腸の筋間神経叢にその陽性反応が検出された。さらにASIC4の陽性反応が、消化管運動調節に関与するtransient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2)と一部共発現することを示唆するデータを得た。そこでASIC4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、新規酸感受性イオンチャネルASIC4について、消化管における発現と機能を検討することである。

我々はASIC4が消化管運動の調節に関与しているという仮説をたて、この遺伝子について消化管における発現と局在、その生理機能を精査する研究計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いた遺伝子発現と形態学的解析

マウス消化管におけるASIC4の発現をRT-PCR、免疫組織化学染色、in situ hybridizationにより精査した。具体的には野生型マウスより食道、胃、十二指腸、回腸、近位結腸、遠位結腸を摘出し、RNAを抽出しRT-PCR法により遺伝子産物の発現を検索した。ついでmRNAレベルでの発現をin situ hybridizationにより検索し、タンパクレベルでの発現は免疫染色に加え、ASIC4-lacZレポーターマウスにおけるX-gal染色によって確認した。次に腸管神経叢の各種マーカーとの二重染色を行った。マーカーにはカハールの間質細胞のc-kit、腸管グリアのGFAP、神経細胞のNF-H、興奮性神経細胞のChAT、抑制性神経細胞マーカーのnNOS、刺激センサーであるTRPV2を用いた。

(2) 消化管輸送能及び排便機能の解析

野生型及びASIC4ノックアウトマウスを用い、フェノールレッド法により消化管輸送能の測定を行った。要約すると、14時間絶食されたマウスにおいて、0.25%フェノールレッド0.2mlを含む試験食をチューブより胃内に注入する。30分後に消化管を摘出し、胃～遠位結腸を4等分化して回収、ホモジナイズ遠心後、上清の吸光度からフェノールレッドの濃度を測定し、消化管輸送能の評価指標とした。排便機能については、野生型及びASIC4ノ

ックアウトマウスを用い、Page らの方法に準じて 1 日あたりの糞便量や重量を測定した。

(3) 平滑筋収縮能解析

ASIC4 の局在が明らかになった近位結腸の腸管を摘出し、腸管運動測定装置（マグナス装置）を用いて平滑筋収縮能解析法にて平滑筋の収縮・弛緩について精査を施行した。

4 . 研究成果

(1) ASIC4 mRNA の発現解析

野生型及び ASIC4 ノックアウトマウス消化管（十二指腸、回腸、近位結腸、遠位結腸）における ASIC4 mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。部位ごとで ASIC4 の遺伝子断片を調べると、野生型マウスの回腸～遠位結腸にその発現を認めた（図 1）。

WT : 野生型マウス tm1d : ASIC4 ノックアウトマウス

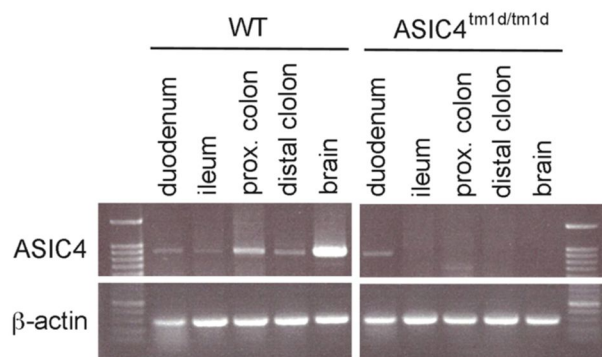


図 1

さらに X-gal 染色で ASIC4 発現を検討すると、野生型マウスの回腸～遠位結腸の筋間神経叢にその陽性反応が検出された（図 2）。

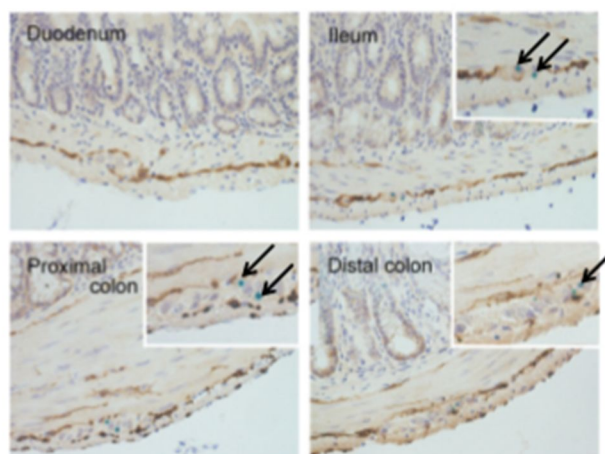


図 2

次いで腸管神経叢の種々のマーカーとの二重染色を行うと、NF-H、ChAT、nNOS と一部共発現していることが判明した（図3、4）。

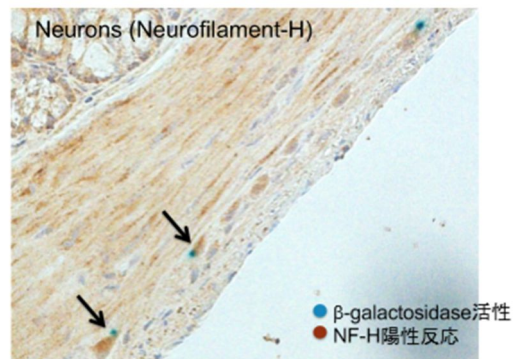


図3

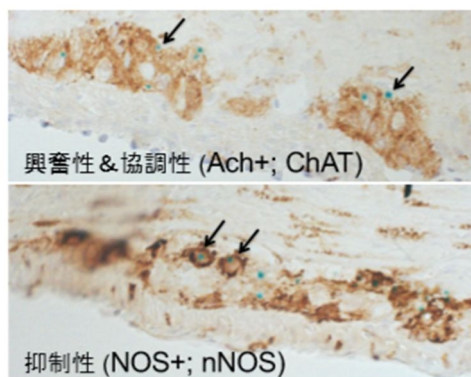


図4

(2) 消化管輸送能及び排便機能の解析

野生型及び ASIC4 ノックアウトマウスを 14 時間絶食後に、フェノールレッドを含む試験食を投与し、30 分後に消化管を摘出し、胃～遠位結腸を 4 等分化して回収、ホモジナイズ遠心後、上清の吸光度をからフェノールレッド濃度を測定し、輸送能を評価すると、ASIC4 ノックアウトマウスでは野生型に比べフェノールレッドの輸送が遅延していた（図5）。

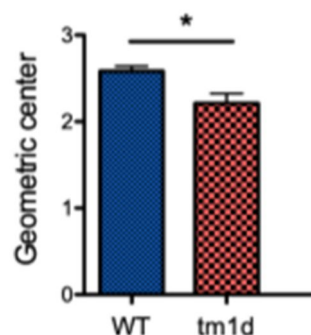


図5

代謝ケージから回収した排便量は、野生型及び ASIC4 ノックアウトマウス両者に有意な差を認めなかった（図6）。

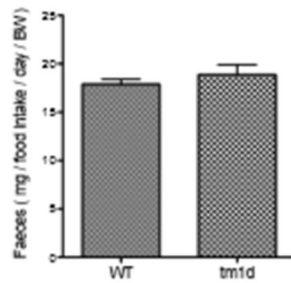


図 6

(3) 平滑筋収縮能解析

野生型及び ASIC4 ノックアウトマウスより摘出した腸管（回腸）を用いて、マグヌス法にてその収縮・弛緩を測定した。刺激を加えない条件下の自発電気活動に両群間で差はみられなかった。次にアセチルコリン、ニコチン、プロベネシド（TRPV2 アゴニスト）を投与し、これらが腸管運動に及ぼす影響を観察した。両群ともにアセチルコリンに対する腸管収縮は濃度依存性に強くなったものの、その収縮の程度は ASIC4 ノックアウトマウスの方が野生型に比べ小さい傾向にあった。ニコチンに対する反応は、両群ともある濃度までは濃度依存性に収縮が強くなる傾向があり、収縮の程度に差はなかった。さらにニコチンを高濃度（ $10^{-5}M$ ）で投与すると、野生型マウスでは収縮に続いて弛緩反応が観察されたが、ASIC4 ノックアウトマウスではこの弛緩反応がほとんど観察されなかった（図 7）。プロベネシド投与では、両群マウスいずれにも弛緩反応が観察されたが、その反応は小さく両群間で差を認めなかった。

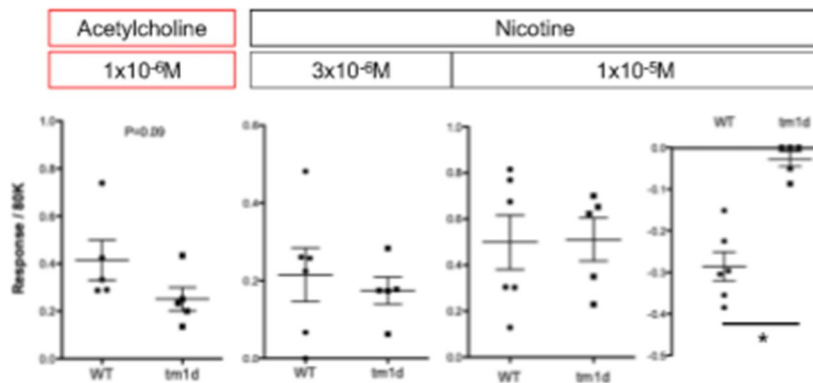


図 7

< 引用文献 >

Shikano M, Ueda T, Kamiya T, Ishida Y, Yamada T, Mizushima T, Shimura T, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Shimada S, Ugawa S, Joh T.
 Acid inhibits TRPV4-mediated Ca^{2+} influx in mouse esophageal epithelial cells.
 Neurogastroenterol Motil. 2011; 23: 1020-1028.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Satoru, Sasaki Kinro, Kato Hiroyuki, Fukudo Shin, Iwakiri Ryuichi, Kamiya Takeshi, Motoya Satoshi, Murakami Kazunari, Nagahara Akihito, Suzuki Hidekazu, Watanabe Toshio, Takahashi Shin'ichi, Chan Francis?K.L., Hahm Ki-Baik, Kachintorn Udom, Ming Fock?Kwong, Rani Abdul?Aziz, Sollano Jose?D., Zhu Qi	4. 巻 99
2. 論文標題 Questionnaire-Based Survey on Management of Ulcerative Colitis-Associated Cancer in East Asian Countries	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 86 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000494419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeda Norihisa, Takemura Masaya, Kanemitsu Yoshihiro, Hijikata Hisatoshi, Fukumitsu Kensuke, Asano Takamitsu, Yamaba Yusuke, Suzuki Motohiko, Kubota Eiji, Kamiya Takeshi, Ueda Takashi, Niimi Akio	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of anti-reflux treatment on gastroesophageal reflux-associated chronic cough: Implications of neurogenic and neutrophilic inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Asthma	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02770903.2019.1641204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hojo M, Nagahara A, Halm KB, Iwakiri R, Watanabe T, Rani AA, Zhu Q, Chen FKA, Sollano JD, Kamiya T, Yamaguchi S, Motoya S, Fock KM, Fukudo S, Kachinton U, Suzuki H, Murakami K	4. 巻 101
2. 論文標題 Management of Gastroesophageal Reflux Disease in Asian Countries: Results of a Questionnaire Survey	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 66 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000504749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 神谷 武、鹿野美千子、植田高史、鷗川眞也、城 卓志
2. 発表標題 機能的消化管疾患の病態におけるイオンチャネルの役割および内臓知覚に対するプロバイオティクスの効果
3. 学会等名 第14回日本消化管学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神谷 武、久保田英嗣、片岡洋望、城 卓志
2. 発表標題 機能性消化管疾患に対する治療評価法の検討
3. 学会等名 第20回日本神経消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田高史、鹿野美千子、柴田泰宏、熊本奈都子、神谷 武、鶴川眞也
2. 発表標題 マウス消化管におけるASICチャネルの発現
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kamiya T, Shikano M, Hagiwara H, Ueda T, Ugawa S, Joh T
2. 発表標題 The inhibitory effect of Keishikashakuyakuto, a Japanese herbal medicine, on visceral pain induced by colorectal distension
3. 学会等名 Annual Meeting of American Neurogastroenterology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	鶴川 眞也 (Ugawa Shinya) (20326135)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	植田 高史 (Ueda Takashi) (90244540)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究 協 力 者	鹿野 美千子 (Shikano Michiko)		