

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590731
 研究課題名（和文） 消化管苦味受容体からの求心性シグナルの脳内分子イメージングと消化管生理機能解析
 研究課題名（英文） Molecular brain imaging of efferent gastrointestinal signal via bitter taste receptors and the analyses of its physiological function
 研究代表者
 富永 和作 (TOMINAGA KAZUNARI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：80336768

研究成果の概要（和文）：苦味受容体の消化管粘膜での存在は、設計されたラット苦味受容体 24 種の PCR primer を用いると、24 種の受容体中で 22 種の mRNA まで解析が可能となり、PCR 解析の結果から食道粘膜から大腸にいたるまでの消化管において幅広く発現していることが判明した。しかし、種々の検出プローブなどの作成や種々条件設定にも関わらず、詳細なる細胞局在の同定には至らなかった。一部受容体リガンド投与の動物実験では、消化管の運動機能の低下をきたしたが、苦味受容体の詳細な消化管での生理学的意義については言及できなかった。

研究成果の概要（英文）：Gene expression of 22 kinds of T2R families, bitter taste receptors, was ubiquitously observed in most digestive tracts from the esophagus to the colon by PCR methods. Unfortunately, the detailed localization of them could not be proved even by using various probes of molecular methods. However, a part of the bitter taste receptors may be associated with the delay of gastric emptying.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：内科、消化器病学、味覚、分子イメージング、受容体

1. 研究開始当初の背景

(1). ヒトに備わる五感には、様々な刺激に

より個々の受容体を介した刺激伝達がなされ、ヒトの情動にまで影響を及ぼしている。感覚受容体として、味覚、痛覚/温度覚などで近年発見されてきているが、詳細な伝達系を含めた機能や消化管臓器での生理的役割については不明であり、各種病態下での役割については全く解明されていない。

- (2). 五感の中で味覚は、生物が生存していく上で必要不可欠である。その理由としては、味細胞で受容される味質は、甘味、うま味、塩味、酸味、苦味の5つの基本的な味に分類され、個々の持つ役割として、甘味は糖のシグナル、うま味はタンパク質(アミノ酸)・遺伝子(核酸)のシグナル、塩味はミネラルのシグナル、酸味は腐敗物のシグナル、苦味は毒物のシグナルとして知られているからである。
- (3). 一般に味覚とは、舌、咽頭及び軟口蓋に存在する味蕾を構成する味細胞により受容される。消化管に味蕾は存在しないが、1996年に味覚関連G蛋白である *gastducin* の、ラット消化管粘膜での局在が初めて報告され、消化管粘膜に味を感知する味細胞様の細胞の存在が示唆された。さらに、1999年には Lindemann により苦味受容体(T2Rs)は、7回膜貫通型GTP結合タンパク質共役型受容体であることが示され、その受容体が消化管粘膜においても存在する可能性も報告されてきた。

2. 研究の目的

消化器疾患を解析し新たな治療法を確立するため、内臓感覚受容体の病態下における意義を解析することを目的とする。脳腸関連の重要性が注目されている中で、消化管機能における感覚受容体の関わりは未だ明らかにされておらず、特異的リガンドによる神経

活性の可視化という手法を用い、消化管・中枢神経系での受容体や化学介在物質の発現部位や活性化領域を生体内で定量化し、各種疾患動物モデルを駆使して病態におけるそれらの意義を明らかにしたい。

3. 研究の方法

- (1). 苦味受容体の種差に伴う相同性解析
公開データベースを利用してマウス、ラット、ヒト苦味受容体の検索を行い、発生学的理解を深めるためにマウス・ラット・ヒト間で相同性解析を試みる。
- (2). ラット苦味受容体 mRNA の発現
苦味受容体レパートリーについて RT-PCR用のプライマーを設計・合成し、舌及び消化管における苦味受容体 mRNA の発現を検索する。
- (3). 免疫組織化学的染色
免疫組織化学的染色法を用い、味覚関連G蛋白である α -*gastducin* の局在についての観察及び染色条件の検討を行う。
- (4). 味覚関連G蛋白である α -*gastducin* 並びに苦味受容体 mRNA の発現
味覚関連G蛋白である α -*gastducin* と苦味受容体に関して、*in situ hybridization* 法を用いて、設定プライマー並びに種々条件設定にて、ラット舌(有廓乳頭)を陽性コントロールとし、全消化管粘膜に対して検討する。
- (5). 苦味受容体における消化管機能における役割解析

既知の苦味受容体リガンド(T2R16 に対して *denatonium*、T2R38 に対して PTC)を用いて、全身的な投与によるラット生体機能の変化や以下の各種病態モデルを用いて、苦味受容体の生体における意義について解析する。

①胃排出能：フェノールレッド液体法

7週令のSD系雄性ラット24時間絶食後、*denatonium*(10 mM)、PTC(10 mM)を経口投与

し、1 時間後にフェノールレッドを投与し、その 15 分後に屠殺し胃排出能を測定する。

②ラット酢酸潰瘍：創傷治癒

7 週令の SD 系雄性ラットに既報に従い酢酸潰瘍を作成し、作成4日目より denatonium(1, 3, 10 mM)を1日1回経口投与し、7日目に屠殺後潰瘍面積を計測し、創傷治癒への影響について検討する。

③ラット DSS 大腸炎：発症抑制

7 週令の SD 系雄性ラットに、4%DSS を 10 日間自由引水させ大腸炎を発生させると同時に、denatonium(1, 10 mM)、PTC(1, 10 mM)を経口投与し、11 日目に屠殺し、摘出大腸長について検討し、発症への影響について検討する。

4. 研究成果

(1). マウス及びラットの苦味受容体としてそれぞれ 35 種の受容体遺伝子と 5 種の偽遺伝子が特定できた。また、ヒト苦味受容体としては 36 種の受容体遺伝子と 2 種のバリエーション、8 種の偽遺伝子が特定できた。次にデータベースからこれら受容体の mRNA を拾い出し、続いて蛋白への翻訳状況を確認した。苦味受容体の発生学的理解を深めるためマウス・ラット・ヒトの間で相同性解析を試みたが、統一的な見解を出すことが難しいと考えられたため、それぞれの種の中での系統樹解析を行うにとどまった。

(2). SD 系雄性ラットの舌、及び消化管組織での mRNA 発現について検討した結果、24 種類の中で、22 種の T2R が何らかの消化管粘膜において発現を示した。しかし、今回の検討では、局在の詳細な同定にまでにはいたらなかった。

(3). ラット舌(有廓乳頭)を陽性コントロールとして、免疫化学的染色を行った。舌組織・十二指腸において α -gastducin の特異的な染

色像が観察された。しかしながら、同条件ならびに種々条件設定においても、他組織では特異的な染色像が観察できなかった。

(4). ラット舌(有廓乳頭)を用いて *in situ* hybridization 法を行った。その結果、プローブ添加量 10 ng/slide かつハイブリダイゼーション温度を 63°Cにて α -gastducin の発現が確認された。しかしながら、検討した T2R サブタイプ (TAS2R1 と R4, R9, R16, R38) の発現については舌並びに各種消化管のいずれにおいても確認できなかった。

(5). 苦味受容体における消化管機能における役割解析

①胃排出機能

Denatonium(10 mM)投与群では、コントロール群に比し約 3 倍の胃内残存を認め、PTC(10 mM)投与群では、約 5 倍の残存率を示した。以上のことから、ラット苦味受容体リガンドの投与は、胃の排出機能に対しては抑制的に作用することが判明した。

②酢酸潰瘍治癒

Denatonium(10 mM)連日投与は、酢酸潰瘍面積に対して影響を与えなかった。

③DSS 大腸炎

実験大腸炎の発症に対して、denatonium(1, 10 mM)、PTC(1, 10 mM)の経口投与は、高用量で一部抑制効果が認められも有意差は認められなかった。

・まとめ

今回の研究は、ひとえに先行研究の域を脱しておらず、苦味受容体の消化管粘膜での存在、細胞局在さらには生理学的意義について言及することはできなかった。しかし、その存在の報告もあり十分な検出ツールの再検討を行い、しかるべきモデル系での生理学的意義を追求することが重要である。そのためには、すでに解明されているヒト、ラット、

マウスすべての遺伝子情報を熟知し、それに合致したツールの合成、さらにはリガンドに対する科学的合成などが今後の発展研究での視点を模索する上で重要と思われた。

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 9 件)

- ① Tsumoto C, Tominaga K, Okazaki H, Tanigawa T, Yamagami H, Watanabe K, Nakao T, Koh K, Watanabe T, Fujiwara Y, Yamane T, Oshitani N, Hino M, Higuchi K, Arakawa T. Long-term efficacy of Helicobacter pylori eradication in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: 7-year follow-up prospective study. Ann Hematol. 査読有, 88(8), 2009, 789-93.
- ② Otani K, Watanabe T, Tanigawa T, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. Anti-inflammatory effects of IL-17A on Helicobacter pylori-induced gastritis. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 1;382(2), 2009, 252-8.
- ③ Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, Yamagami H, Okazaki H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Higuchi K, Takeuchi K, Arakawa T. Probiotic Lactobacillus casei strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有, 297(3), 2009, G506-13.
- ④ Ochi M, Tominaga K, Tanaka F, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Effect of chronic stress

on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats. Life Sci. 査読有, 82(15-16), 2008, 862-8.

- ⑤ Tominaga K, Higuchi K, Ochi M, Kadouchi K, Kawamura E, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Shiomi S, Arakawa T. Concurrent assessment of reservoir and emptying of the stomach for dyspepsia patients. Hepatogastroenterology. 査読有, 55(82-83), 2008, 744-9.
- ⑥ Ochi M, Tominaga K, Iketani T, Kadouchi K, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Kiriike N, Arakawa T. Perfectionism underlying psychological background correlated with the symptoms of functional dyspepsia. J Gastroenterol. 査読有, 43(9), 2008, 699-704.
- ⑦ Tanaka F, Tominaga K, Shiota M, Ochi M, Kuwamura H, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Iwao H, Arakawa T. Interleukin-10 gene transfer to peritoneal mesothelial cells suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer cells due to a persistently high concentration in the peritoneal cavity. Cancer Gene Ther. 査読有, 15(1), 2008, 51-9.
- ⑧ Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, Nishio H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Takeuchi K, Arakawa T. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. Gut. 査読有, 57(2), 2008, 181-7.
- ⑨ Sasaki E, Tominaga K, Kuwamura H, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Synergistic antitumor effect of combined 5-fluorouracil (5-FU) with 5-chloro-2,4-dihydropyridine on 5-FU-resistant gastric cancer cells: possible

role of a dihydropyrimidine
dehydrogenase-independent mechanism. J
Gastroenterol. 査読有, 42(10), 2007, 816-22.

6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 和作 (TOMINAGA KAZUNARI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80336768

(2)研究分担者

藤原 靖弘 (FUJIWARA YASUHIRO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40285292

渡辺 俊雄 (WATANABE TOSHIO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50336773

谷川 徹也 (TANIGAWA TETSUYA)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70423879

(3)連携研究者

樋口 和秀 (HIGUCHI KAZUHIDE)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：20218697