

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08366

研究課題名(和文)便秘症根治を目指したTRPV4チャネルのメチル化異常の誘発と正常化因子の探索

研究課題名(英文) Research for induction or normalization factor for colonic TRPV4 methylation aiming at curing constipation

研究代表者

三原 弘 (Mihara, Hiroshi)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：00612623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：便秘患者では小腸から直腸にかけて伸展や微小炎症を受容するTRPV4イオンチャネルが上皮に多く発現し、便回数減少や罹患期間に関連していた。結腸上皮細胞株と細菌を培養すると、TRPV4の発現が一過性に減少するもの、不変なもの、増加するものに分けられた。発現を増加する細菌として、クレブシエラ菌、腸球菌、大腸菌が見出させ、菌体ではなく、培養成分が増加させた。短鎖脂肪酸である酪酸や、TNF- α 阻害剤で発現増加が抑制された。便秘症状と便秘患者の大腸粘膜の腸球菌比率とが関連しており、酪酸産生菌を維持し、TNF- α 経路の抑制が慢性便秘症の予防や治療につながりう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

慢性便秘症は有病率5%の高頻度疾患であり、今後も増加することが危惧されている。その慢性便秘症において、腸内細菌のTRPV4発現増加への影響及び、酪酸とTNF- α 阻害による発現増加抑制効果が明らかとなったことにより、慢性便秘症の病態解明及び、酪酸産生菌投与や、TNF- α 阻害剤の新規治療法の開発につながり、患者のQOL向上、医療費低減につながる可能性がある。また、TRPV4は結腸以外の消化管だけでなく、膀胱、皮膚、気管などの細菌が暴露する上皮でTRPV4が生理的機能、病態に関与していることが知られており、他領域疾患の研究への波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：TRPV4 ion channel, a receptor for stretching and microinflammation, was highly expressed in the epithelium in constipated patients from the small intestine to the rectum and was associated with decreased stool frequency and duration of disease. When colon epithelial cell lines and bacteria were co-cultured, bacteria was divided into those that transiently decreased, those that remained constant, and those that increased TRPV4 expression. ; K.oxytoca, E. faecalis, and E.coli increased TRPV4 expression; the bacteria themselves did not increase the expression, but culture components did. Butyrate, a short-chain fatty acid, and TNF- α inhibitors suppressed increased expression, and constipation symptoms were associated with the ratio of E. faecalis in the colonic mucosa of constipated patients, suggesting that maintaining butyrate-producing bacteria and suppressing the TNF- α pathway may prevent or treat chronic constipation.

研究分野：消化器

キーワード：慢性便秘 TRPV4 腸内細菌 大腸菌 腸球菌 K.oxytoca 上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸内圧の上昇が排便を誘発するが、便秘患者はこの感受性が低下している。腸管上皮に伸展や微小炎症を検出する TRPV4 が発現しており、胃上皮にピロリ菌が感染すると発現抑制を来すことを我々は明らかにしており () 結腸上皮では腸内細菌やその代謝物が TRPV4 の発現に変化を生じさせ、便秘の病態に関わっている可能性が想定された。

2. 研究の目的

(1) 慢性便秘患者では、脳での応答は正常であることから、腸自体の圧感受性が障害を受けていると考えられているが、その分子機構は全く不明なままであるため、その分子機構そのものを改善させ、便秘を根治させようとする新規治療薬開発はなされていない。慢性便秘患者における、各種便秘症状、粘膜付着菌比率、直腸上皮における TRPV4 発現との間の関連性を明らかにすること

(2) 結腸上皮細胞株における TRPV4 発現機構に与える、腸内細菌、各種サイトカイン、短鎖脂肪酸との分子機構を解明すること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) RomeIV 基準での慢性便秘症患者と健常者から臨床背景、腸管上皮での TRPV4 発現量、粘膜関連腸内細菌比率を取得し、便秘症状との関連性を相関係数、重回帰分析により検討した。

(2) ヒト結腸上皮細胞株 (CCD841) と様々な腸内細菌 (菌体成分および培養成分)、リポポリサッカライド、葉酸、短鎖脂肪酸、または、サイトカインとを培養し、TRPV4 の発現について、定量的 PCR、プロモーターDNA メチル化パイロシークエンス、ウェスタンブロッティング法、マイクロアレイネットワーク解析により検討した。

4. 研究成果

(1) 便秘患者は健常者に比べて小腸から直腸にかけて TRPV4 イオンチャネルが上皮に多く発現していた。

(2) 便秘患者において、TRPV4 発現量と便回数減少や罹患期間が関連していた。

(3) 結腸上皮細胞株と細菌を培養すると、TRPV4 の発現が一過性に減少するもの、不変なもの、増加するものに分けられた (、 図 1)。発現を増加する細菌として、クレブシエラ

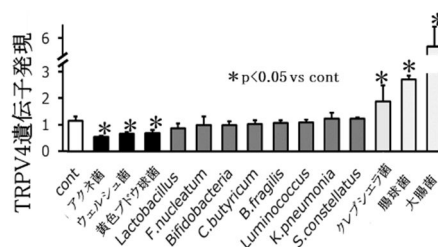


図1 ヒト結腸上皮細胞株と細菌培養でのTRPV4発現変化

菌、腸球菌、大腸菌が見出された。

(4) アクネ菌，ウェルシュ菌，黄色ブドウ球菌において TRPV4 の発現を一過性に減少させたが、メチル化は誘導されていなかった。

(5) クレブシエラ菌、大腸菌において、TRPV4 の発現を増加させるのは、菌体ではなく、培養成分であった（図 2）。

(6) 大腸菌培養上清によって増加する TRPV4 発現は、短鎖脂肪酸の一つである酪酸や TNF 阻害で抑制された（図 2）。

(7) マイクロアレイネットワーク解析では、大腸菌培養上清により、TNF- α 、サイトカイン、NOD シグナルの活性化が見られた。

(8) 便秘患者の便秘症状と大腸粘膜の腸球菌比率とが関連していた。

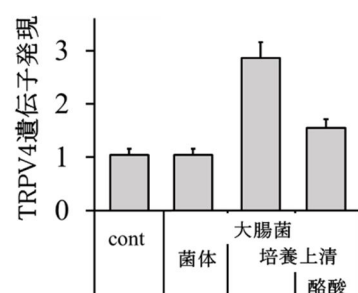


図2 ヒト結腸上皮細胞株と大腸菌の菌体、培養上清と酪酸との培養でのTRPV4 発現変化

<引用文献>

三原 弘 . 消化管上皮の圧受容と慢性炎症 . BIO Clinica がんの化学療法 . 2018 ; 33 : 146-51

H Mihara, A Boudaka, M Tominaga, T Sugiyama : Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Regulation of Adenosine Triphosphate Release by the Adenosine Triphosphate Transporter Vesicular Nucleotide Transporter, a Novel Therapeutic Target for Gastrointestinal Baroreception and Chronic Inflammation . Digestion 2020;101:6-11

二神 生爾, 多田 智裕, 渡邊 嘉行, 三原 弘, 山脇 博士 : 座談会 上部消化管疾患に迫る 形態と機能からの新たなるアプローチ . 日消誌 2020;117:876-887

三原弘 : 便秘症、腸内細菌と TRPV4 . Medical Science Digest 2021;47,526-7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 二神 生爾, 多田 智裕, 渡邊 嘉行, 三原 弘, 山脇 博士	4. 巻 117
2. 論文標題 上部消化管疾患に迫る 形態と機能からの新たなるアプローチ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日消誌	6. 最初と最後の頁 876-887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.117.876	査読の有無 無
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 三原 弘	4. 巻 34
2. 論文標題 消化管上皮の圧受容と慢性炎症、そしてATP放出阻害という治療標的	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 77 - 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hiroshi Mihara, Ammar Boudaka, Makoto Tominaga, Toshiro Sugiyama	4. 巻 101
2. 論文標題 Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Regulation of Adenosine Triphosphate Release by the Adenosine Triphosphate Transporter Vesicular Nucleotide Transporter, a Novel Therapeutic Target for Gastrointestinal Baroreception and Chronic Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000504021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 三原弘	4. 巻 47
2. 論文標題 便秘症, 腸内細菌とTRPV4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 526-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroshi Mihara, Sohachi Nanjo, Kunitoshi Uchida, Iori Motoo, Takayuki Ando, Haruka Fujinami, Ichiro Yasuda
2. 発表標題 LIPOPOLYSACCHARIDE O-ANTIGEN SPECIFIC TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 4 (TRPV4)-DEPENDENT ATP RELEASE FROM COLON EPITHELIA
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三原 弘、小澤豊美、南條宗八、元尾伊織、安藤孝将、藤浪斗、安田一朗
2. 発表標題 腸内細菌による結腸上皮の機械刺激感受性イオンチャネル (TRPV4) の発現変化の検討
3. 学会等名 第22回日本神経消化器病学会神経消化器病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Mihara, Mayo Fuchino, Ichiro Yasuda
2. 発表標題 Tryptase induces intestinal hyperpermeability via Up-regulated transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) activation
3. 学会等名 日本消化器病学会週間2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三原 弘、内田邦敏、小泉修一、森山芳則
2. 発表標題 TRP研究会2020
3. 学会等名 胃腸上に発現するTRPV4 活性化のVNUT 阻害による制御及び、腸内細菌によるTRPV4 発現抑制に関する検討
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Mihara, Sohachi Nanjo, Kunitoshi Uchida, Iori Motoo, Takayuki Ando, Haruka Fujinami, Ichiro Yasuda
2. 発表標題 LIPOPOLYSACCHARIDE O-ANTIGEN SPECIFIC TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 4 (TRPV4)-DEPENDENT ATP RELEASE FROM COLON EPITHELIA
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三原弘, 南條宗八, 藤浪斗, 安田一朗, 渡邊嘉行, 及川律子, 山本博幸, 伊東文生
2. 発表標題 慢性便秘症の症状, 粘膜関連腸内細菌と直腸上皮TRPV4発現・メチル化異常との関連
3. 学会等名 第63回 日本消化器病学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三原弘, 南條宗八, 元尾伊織, 安藤孝将, 安田一朗, 内田 邦敏
2. 発表標題 大腸菌培養上清による大腸TRPV4過剰発現とTNF- の関連
3. 学会等名 第4回機能性腸疾患研究会
4. 発表年 2021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	内田 邦敏 (Uchida Kunitoshi) (20581135)	静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授 (23803)	

6. 研究組織（つづき）

	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	南條 宗八 (Nanjo Sohachi) (70649285)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	

	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
研究協力者	渡邊 嘉行 (Watanabe Yoshiyuki)	聖マリアンナ医科大学・消化器・肝臓内科 (32713)	
研究協力者	作村 美穂 (Sakumura Miho)	富山大学・第三内科 (13201)	
研究協力者	元尾 伊織 (Motoo Iori)	富山大学・第三内科・助教 (13201)	
研究協力者	安藤 孝将 (Ando Takayuki)	富山大学・第三内科・講師 (13201)	
研究協力者	峯村 正実 (Minemura Masami)	富山大学・第三内科 (13201)	
研究協力者	ムハンマド ジブラン (Muhammad Jibrán Sualeh)	富山大学・第三内科 (13201)	現在は、University of Sharjah, United Arab Emiratesにて勤務。

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山本 博幸 (Yamamoto Hiroyuki)	聖マリアンナ医科大学・消化器・肝臓内科 (32713)	
研究協力者	伊東 文生 (Ito Fumio)	聖マリアンナ医科大学・消化器・肝臓内科 (32713)	
研究協力者	安田 一郎 (Yasuda Ichiro)	富山大学・第三内科 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関