

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590791

研究課題名（和文） 食道知覚における TRP イオンチャンネルの機能解析

研究課題名（英文） The role of functional TRP ion channels on esophageal perception

研究代表者

神谷 武 (KAMIYA TAKESHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10254301

研究成果の概要（和文）：マウス食道上皮に、TRP イオンチャンネルの一つ TRPV4 が存在すること、および上皮基底層～中間層に局在することを確認した。この TRPV4 は、食道上皮細胞でのカルシウム流入、ATP の産生に関与し、食道の知覚そして粘膜防御にかかわる機能を有することが明らかになった。また TRPV4 のこれらの機能は、酸の存在によって低下することも見いだされた。これらの結果より、食道の TRPV4 が胃食道逆流症の病態に関与することが示唆され、胃食道逆流症の病態解明に結びつく重要な知見と考えられた。

研究成果の概要（英文）：TRPV4 channels were mainly expressed in the esophageal epithelial cells of the basal and intermediate layers. Both 4 $\alpha$ -PDD, a selective agonist for TRPV4, and hypoosmolar solution elevated the intracellular calcium concentration in a subset of the isolated esophageal cells. These calcium increases were inhibited by RuR, a TRPV4 antagonist, and were suppressed by extracellular protons. Direct exposure of TRPV4-expressing cells to gastric acid, as would occur in the case of GERD, could influence their cellular functions, possibly aggravating the disease state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：食道、知覚、イオンチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃食道逆流症 (Gastroesophageal reflux disease; GERD) は、胃酸を中心とする胃内容物の食道内への逆流と、胃酸による粘膜障害そして食道の知覚過敏が主要な病態と考えられている。その発症には食生活の欧米化、肥満などの因子も関与し、それゆえ胃食道逆流症は生活習慣病の一つとも考えら

れており、今後その患者数はさらに増加することが予想されている。また胃食道逆流症の病態の一つである食道の知覚過敏は、胃から逆流した酸と、過食や逆流物による進展刺激、内圧上昇に対して現れる。しかし食道の知覚に関しては、これまで生物学的研究、分子生物学的研究ともほとんどなされていないのが現状である。

(2) これまで Transient receptor potential vanilloid (TRP)イオンチャンネルの食道における存在、局在や機能解析などの検討はまったくされていない。このうち TRP ファミリーのタイプ1、TRPV1 はカプサイシン、酸によって活性化され、消化管においても知覚の中心をなす物質と考えられてきた。しかし TRPV1 は pH6 で最も活性化されることから、食道における酸のセンサーとするには矛盾が生じる。我々は TRP チャンネルのうち、温度感受性で進展刺激で活性化され、pH4 の酸にも反応するとされる TRPV4 に着目し、その食道における存在、局在、役割を検討する本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

(1) マウス食道において TRP イオンチャンネルのうち TRPV1、TRPV4 の発現の有無、および存在を認めた場合その局在を明らかにする。

(2) 食道粘膜に存在する TRP イオンチャンネル (予想としては TRPV4) に着目し、マウス食道上皮単離細胞を用いてカルシウムイメージング法により細胞内カルシウムの流入を、また ATP アッセイにて ATP 産生の有無を検討する。また TRPV4 の活性化因子  $4\alpha$ -phorbol 12, 13 didecanoate ( $4\alpha$ -PDD) や低浸透圧刺激を、さらに抑制因子として、Ruthenium red (RuR) を用いてその機能解析を行う。

(3) カルシウムイメージング法や ATP アッセイのさいの細胞外液を pH5 の酸性条件とし胃酸にさらされる食道上皮という胃食道逆流症という病的状態を作り出し、食道上皮での TRPV4 の機能が酸によりどのような影響を受けるか確認する。この酸と TRPV4 機能の関連性の検討から、胃食道逆流症の病態における TRPV4 のかわりに関して考察を加える。

## 3. 研究の方法

(1) TRP チャンネルのうち TRPV1、TRPV4 の食道での発現と局在を検討する。対象として C57BL ワイルドタイプマウスを用い、食道を採取し、RT-PCR 法、DIG-in situ hybridization 法により mRNA レベルで、また免疫組織化学染色、Western blotting によりタンパクレベルで発現の有無、発現がある場合はその局在を検討する。

(2) TRP チャンネルのうち食道上皮での存在、局在が明らかになった TRPV4 に対し、その機能解析を行う。C57BL マウス食道上皮細胞を単離した初代培養細胞を用いてカルシウムイメージング法、ATP アッセイ法を行う。

細胞内へのカルシウム流入を測定するカルシウムイメージング法では、刺激として TRPV4 の選択的アゴニストである  $4\alpha$ -phorbol 12, 13 didecanoate ( $4\alpha$ -PDD)  $10\mu\text{M}$  と低浸透圧 ( $160\text{mOsm}$ ) を利用し、阻害薬として TRPV ファミリーのアンタゴニストである Ruthenium red (RuR)  $10\mu\text{M}$  を使用した。また胃食道逆流症の主要な病態因子と考えられる酸が TRPV4 活性におよぼす影響を、細胞外液を pH 5.0 に変化させて検討した。

## 4. 研究成果

(1) RT-PCR では、TRPV4 のアミノ酸配列の N 末端、中間、C 末端を増幅するプライマーを設計し、マウス食道上皮から抽出した total RNA と反応させると、それぞれ目的とする高さのシングルバンドが得られた。これにより、マウス食道に mRNA レベルで TRPV4 が発現していることを証明した。次に DIG-in situ で、マウス食道上皮中間層～基底層に TRPV4 mRNA が分布していることを確認した。次にマウス全食道から抽出したタンパクで行った Western blotting では、目的とする  $110\text{kDa}$  の高さのウサギ多クローン TRPV4 抗体のバンドが得られ、タンパクレベルでの TRPV4 の発現を確認した。なお使用した抗体の抗体特異性は吸収試験により確認した。免疫染色では、TRPV4 の抗原抗体反応のシグナルは食道上皮にのみ観察され、上皮基底層に強い蛍光発色を認め、上皮中間層には中等度の発色が観察された。TRPV1 は PCR ではシングルバンドは得られたが、免疫染色では食道上皮に発色は観察されず、その食道上皮での存在は確認できなかった。これらの結果より、食道上皮での TRPV4 の存在と、上皮基底層～中間層への発現が証明された。

(2) TRPV4 の機能解析のために施行したカルシウムイメージングでは、単離した食道上皮細胞の 87.5% (84/96) が TRPV4 の選択的アゴニストである  $4\alpha$ -PDD に応答し、細胞内カルシウム濃度の増加を引き起こした。この応答は非特異的 TRPV チャンネルアンタゴニストの RuR で有意に抑制された。さらに低浸透圧刺激には検討した細胞の 93.8% (90/96) が応答し、70.8% (68/96) が RuR で抑制された。この RuR で抑制された細胞はすべて  $4\alpha$ -PDD にも応答した。すなわち、単離したマウス食道上皮細胞の約 70%が低浸透圧にも  $4\alpha$ -PDD にも応答することが示唆された。注目すべきことに、TRPV4 のこれらの刺激に対する応答は、細胞外液の酸性化 (pH7.4→5.0) によって顕著に抑制され、TRPV4 の機能は酸性条件下では低下することが明らかになった。

(3) TRPV4 が活性化し、細胞内カルシウム

イオンの流入を引き起こした後、どのような現象につながるかを検討するため、ATP アッセイをおこなった。単離した食道上皮細胞を  $4\alpha$ -PDD で刺激すると ATP の細胞外放出が認められ、この放出は RuR により抑制された。ATP は神経伝達物質として知覚神経に作用する。さらに上皮の恒常性、バリア機能を保つのに必要な細胞の分化・増殖、免疫反応、細胞体積の調節などの過程に必要なシグナルとしても知られており、食道上皮 TRPV4 は、ATP の産生を介して食道の知覚と食道粘膜の防御機構に関与している可能性が考えられた。

(4) 本研究によって、機能を有する TRPV4 の食道上皮における存在と、上皮中間層～基底層に分布するという局在が国内、国外を通してはじめて明らかになった。食道上皮 TRPV4 はその分布様式より、健常状態では上皮表層の物理的バリアにより、飲水などでうける低浸透圧刺激や胃酸などの暴露から守られていると考えられるが、胃食道逆流症のような病的状態では、粘膜障害あるいは細胞間隙が広がることで酸 ( $H^+$ ) が直接基底細胞に到達すると考えられる。ゆえに TRPV4 を介した正常な細胞機能が抑制され、粘膜障害などの病態に進展に関与し、また ATP を介した知覚神経の亢進、胸やけなどの症状出現につながることを推察される。TRPV4 の胃食道逆流症の病態に対する関与を明らかにするには、さらなる検討が必要である。

#### 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 4 件)

① 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. *Neurogastroenterology & Motility*. 査読有、23 巻、2011、1020-e497 doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01767.x

② Ueda T, Shikano M, Kamiya T, Joh T, Ugawa S. The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular  $Ca^{2+}$  in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol*, 査読有、301 巻、2011、G138-G147 doi: 10.1152/ajpgi.00511.2010

③ 神谷 武、鹿野美千子、城 卓志、植田高史、鶴川真也、島田昌一。マウス食道上皮における酸感受性 TRPV4 の発現と機能。Therapeutic Research、査読無、32 巻、2011、

585-589

<http://www.lifescience.co.jp/>

④ 神谷 武、鹿野美千子、城 卓志。FD に知覚異常は関与するか。分子消化器病、査読無、8 巻、2011、340-344

<http://www.sentan.com>

[学会発表] (計 5 件)

① Kamiya T, Shikano M, Hirata Y, Mizushima T, Murakami K, Shimura T, Mizoshita T, Mori Y, Tanida S, Kataoka H, Joh T. Functional TRPV4 channels are expressed in mouse esophageal epithelial cells. *United European Gastroenterology Week 2011*. 2011.10/24-26, Stockholm, Sweden

② Kamiya T, Shikano M, Hirata Y, Mizushima T, Murakami K, Shimura T, Mizoshita T, Mori Y, Tanida S, Kataoka H, Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Shimada S, Joh T. Acid-sensitive TRPV4 channel is expressed in mouse esophageal epithelium cells. *Digestive Disease Week 2011*. 2011. 5/7-10, Chicago, USA

③ 神谷 武、鹿野美千子、海老正秀、田中守、平田慶和、水島隆史、志村貴也、村上賢治、溝下 勤、森 義徳、谷田諭史、片岡洋望、城 卓志。マウス食道上皮における酸感受性 TRPV4 の発現と機能。第 7 回日本消化管学会総会 ワークショップ。2011. 2/18-19, 京都

④ 鹿野美千子、神谷 武、田中 守、海老正秀、水島隆史、平田慶和、志村貴也、村上賢治、溝下 勤、久保田英嗣、谷田諭史、片岡洋望、城 卓志。食道上皮での TRPV4 の発現と機能。第 96 回日本消化器病学会総会。2010. 4/24-26, 新潟

⑤ 神谷 武、鹿野美千子、片岡洋望、谷田諭史、溝下 勤。食道上皮における TRPV1, TRPV4 の発現。第 37 回日本潰瘍学会。2009. 11/6-7, 東京

[その他]

名古屋市立大学大学院医学研究科消化器代謝内科学ホームページ業績集

<http://www.ncu-shotai.ac/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 武 (KAMIYA TAKESHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教

授

研究者番号：10254301

(2)研究分担者

島田 昌一 (SHIMADA SHOICHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20216063

(3)連携研究者

該当者なし