

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460301

研究課題名(和文) 脂質摂取によるLRP1を介した消化管運動調節機構の検討

研究課題名(英文) Regulation of intestinal motility by lipid intake via LRP1

研究代表者

正岡 建洋 (Masaoka, Tatsuhiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00317132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：平成25年度にCre/loxpシステムによる神経堤由来領域に特異的なLRP1の欠失を試み、産仔を得ることができた。

平成26年度にこのマウスの遺伝子解析を行ったところ、LRP1のホモ欠損マウスは得られておらず、ヘテロ欠損マウスのみが得られていることが判明した。

平成27年度にorgan bathを用いて小腸運動の解析を行ったところ、ヘテロ欠損マウスでは野生型と比較して、消化管運動異常を認めた。これにより、LRP1遺伝子のヘテロ欠損、すなわちLRP1の発現量が減少することで消化管運動に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, conditional deletion of LRP1 gene in neural crest derived region which include enteric nervous system showed intestinal dysmotility. This study suggest relationship between LRP1 and intestinal motility.

研究分野：消化器内科学

キーワード：消化管運動

1. 研究開始当初の背景

「油ものを食べるとお腹の調子が悪くなる」という感覚は誰しもが経験したことがある感覚であるが、その分子メカニズムは明らかになっておらず、この感覚を制御するための治療標的も明らかになっていない。

神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)を発現する NO 神経は消化管においては抑制性神経として働く。近年、アポリポ蛋白の一つであるアポ E を認識する LDL 受容体が欠損したマウスにおいて胃排出遅延と NO 作動性神経障害が認められることが報告された (*Neurogastroenterol Motil.* 23:773-e335, 2011)。nNOS はシナプス後膜に存在する postsynaptic density protein-95(PSD-95)を介して、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) と NMDAR-PSD-95-nNOS 複合体を形成していると考えられている (*Nitric Oxide* 20:223-230, 2009)。一方、LDL 受容体以外のアポ E の受容体である Lipoprotein receptor related protein 1(LRP1)は PSD-95 を介して NMDAR と結合し、LRP1-NMDAR-PSD-95 複合体を形成していることが示唆されている (*Mol Cell Biol.* 24:8872-83, 2004)。

2. 研究の目的

上記の知見から LRP1-NMDAR-PSD-95-nNOS 複合体の存在並とアポ E がこの複合体に結合することで nNOS の酵素活性、ひいては消化管運動の調節に関与していることが想定される (図 1)。本研究の目的はアポ E と LRP1-NMDAR- PSD-95-nNOS 複合体による消化管運動調節機構を解明し、「油ものを食べるとお腹の調子が悪くなる」感覚の分子メカニズムの解明である。

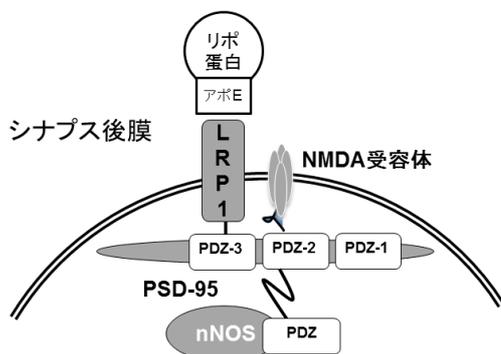


図1: LRP1-NMDAR-PSD-95-nNOS複合体

3. 研究の方法

特定の遺伝子の機能を検討する上でノックアウトマウスは重要なモデル動物であるが、LRP1 のノックアウトは胚レベルで致命的になること

が既に報告されている (*Cell* 71:411-21,1992)。このため、LRP1 の機能解析においては遺伝子改変動物として、臓器特異的な条件的ノックアウトマウスが作製されている。 (*Physiol Rev.* 88:887-918, 2008)。既報の LRP1 条件的ノックアウトマウスの作製においては臓器特異的に Cre 蛋白を発現させたマウスと目的遺伝子を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだマウスを交配させることで、臓器特異的な目的遺伝子の欠失を起こさせる Cre/loxP システムが用いられている (*J Clin Invest.* 101:689-95, 1998)。消化管神経は神経堤細胞が消化管に遊走することで形成される。本研究では本大学の生理学研究室で作製された神経堤由来領域特異的に Cre 蛋白と GFP 蛋白を発現させたマウス (*Cell Stem Cell.* 2:392-403, 2008)と Jackson 研究所で既に樹立されている LRP1 の loxP マウスとを交配させることで消化管神経特異的な LRP1 条件的ノックアウトマウスを作製する。

LRP1 条件的ノックアウトマウスを作製後、本邦で初めて導入した消化管の長短軸方向の長さの経時変化及び単位時間あたりの蠕動回数を定量することが可能 Organ bath を用いて消化管運動の評価を行う。

また、LRP1 条件的ノックアウトマウスにおける消化管神経叢での nNOS 発現について検討する。胃、空腸、大腸を摘出し、粘膜層を剥離して、筋層及び筋間神経叢のみとした標本を作成し、定量的 RT-PCR 法により、nNOS mRNA 発現、ウエスタンブロット法により nNOS 蛋白質発現量を定量する。また、蛋白質レベルの発現量としては蛍光免疫染色により、NO 作動性神経数の定量を行う。

4. 研究成果

平成 25 年度に神経堤由来領域特異的に Cre 蛋白と GFP 蛋白を発現させたマウスと LRP1 の loxP マウスの交配を行い、Cre/loxP システムによる神経堤由来領域に特異的な LRP1 の欠失を試み、産仔を得ることができた。

平成 26 年度にこのマウスの遺伝子解析を行ったところ、LRP1 のホモ欠損マウスは得られておらず、ヘテロ欠損マウスのみが得られていることが判明した。ホモ欠損マウスは受精以降のいずれかの段階で致死的になっていることが推察された。

平成 27 年度にはこのヘテロ欠損マウスの表現型解析を行った。organ bath を用いて小腸運動の解析を行ったところ、ヘテロ欠損マウスでは野生型と比較して、蠕動運動の低下を認めた。これにより、LRP1 遺伝子のヘテロ欠損、すなわち LRP1 の発現量が減少することで消化管運動に影響を及ぼすことが示唆された。同様のマウスの作製、及び表現型の解析については本報告書の作成時点で国内外の他の歩のは行われていない。研究期間は終了したが、これまでに得られたヘテロ欠損マウスを用いて、次年度以降も引き続き、同マウスの表現型の解析を行い、本研究計画

の目的である脂質摂取による LRP1 を介した消化管運動調節機構についての検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. Lee SY., Masaoka T., Han HS., Matsuzaki J., Hong MJ., Fukuhara S., Choi HS., Suzuki H. A prospective study on symptom generation according to spicy food intake and TRPV1 genotypes in functional dyspepsia patients. **Neurogastroenterol Motil.** 査読有 2016 Apr 19. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/nmo.12841.
2. Matsushita M., Masaoka T., Suzuki H. Emerging treatments in neurogastroenterology: Acotiamide, a novel treatment option for functional dyspepsia. **Neurogastroenterol Motil.** 査読有 28(5), 2016, 631-8. doi: 10.1111/nmo.12756.
3. Vanormelingen C., Vanuytsel T., Masaoka T., De Hertogh G., Vanheel H., Vanden Berghe P., Farré R., Tack J. Normoglycaemic biobreding rat: a spontaneous model for impaired gastric accommodation. *Gut* 査読有 65(1), 2016, 73-81. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308154.
4. Mori H., Suzuki H., Matsuzaki J., Tsugawa H., Fukuhara S., Miyoshi S., Hirata K., Seino T., Matsushita M., Masaoka T., Kanail T. Efficacy of 10-day sitafloxacin-containing third-line rescue therapies for *Helicobacter pylori* strains containing the *gyrA* mutation. **Helicobacter.** 査読有 2015 Nov 27. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/hel.12286.
5. Tsugawa H., Mori H., Matsuzaki J., Masaoka T., Hirayama T., Nagasawa H., Sakakibara Y., Suematsu M., Suzuki H. Nordihydroguaiaretic acid disrupts the antioxidant ability of *Helicobacter pylori* through the repression of SodB activity *in vitro*. **BioMed Research. International.** 査読有 2015, 734548. doi: 10.1155/2015/734548
6. Fukuhara S., Matsuzaki J., Tsugawa H., Masaoka T., Miyoshi S., Mori H., Fukushima Y., Yasui M., Kanai T., Suzuki H. Mucosal expression of aquaporin-4 in the stomach of histamine type 2 receptor knockout mice and *Helicobacter pylori*-infected mice. **J Gastroenterol Hepatol.** 査読有 2014, Suppl 4:53-9, doi: 10.1111/jgh.12796
7. Kawai T., Takahashi S., Suzuki H., Sasaki H., Nagahara A., Asaoka D., Matsuhisa T., Masaoka T., Nishizawa T., Suzuki M., Ito M., Kurihara N., Omata F., Mizuno S., Torii A., Kawakami K., Ohkusa T., Tokunaga K., Mine T., Sakaki N. Changes in the first line *Helicobacter pylori* eradication rates using the triple therapy-a multicenter study in the Tokyo metropolitan area (Tokyo *Helicobacter pylori* study group). **J Gastroenterol Hepatol.** 査読有 2014, Suppl 4:29-32. doi: 10.1111/jgh.12796
8. Masaoka T., Suzuki H. Does Bile Reflux Influence the Progression of Barrett's Esophagus to Adenocarcinoma? **J Neurogastroenterol Motil.** 査読有 2014, 20, 124-6 doi: 10.5056/jnm.2014.20.1.124.
9. Suzuki H., Matsuzaki J., Masaoka T., Inadomi JM. Greater loss of productivity among Japanese workers with gastro-esophageal reflux disease (GERD) symptoms that persist vs resolve on medical therapy. **Neurogastroenterol Motil.** 査読有 2014,26:764-71 doi: 10.1111/nmo.12319
10. Masaoka T., Vanuytsel T., Vanormelingen C., Kindt S., Salim Rasoel S., Boesmans W., De Hertogh G., Farré R. Vanden Berghe P., Tack J. A spontaneous animal model of intestinal dysmotility evoked by inflammatory nitregeric dysfunction. **PLoS One.** 査読有 2014, 9:e95879, doi: 10.1371/journal.pone.0095879.
11. Masaoka T., Suzuki H. Does the AIMS65, a new risk score for upper gastrointestinal bleeding, work in Japan? **Dig Endosc.** 査読有 2014, 26:331-332 doi: 10.1111/den.12224
12. Vanuytsel T., Vanormelingen C., Vanheel H., Masaoka T., Salim Rasoel S., Toth J., Houben E., Verbeke K., De Hertogh G., Vanden Berghe P., Tack J. Farré R. From intestinal permeability to dysmotility: the Biobreding rat as a model for functional gastrointestinal disorders. **PLoS One,** 査読有 2014, 9:e111132, doi: 10.1371/journal.pone.0111132.
13. Masaoka T., Suzuki H. Do we need to eradicate *Helicobacter pylori* in patients with GORD? **United European Gastroenterology J.** 査読有 2013, 1: 223-225, doi: 10.1177/2050640613497713
14. Demedts, I., Masaoka T., Kindt, S., De Hertogh, G., Geboes, K., Farre, R., Vanden Berghe, P., Tack, J. Gastrointestinal motility changes and myenteric plexus alterations in spontaneously diabetic biobreding rats. **J. Neurogastroenterol. Motil.** 査読有 2013, 19:161-170, doi: 10.5056/jnm.2013.19.2.161.
15. Demedts, I., Vanormelingen, C., Van Billoen, H., Vanuytsel, T., Farre, R., Masaoka T., Verbruggen, A., Verbeke, K., Vanden Berghe, P., Tack, J. Validation of octanoate breath test for measuring gastric emptying in rats. **J. Neurogastroenterol. Motil.** 査読有 2013, 19:171-178 doi: 10.5056/jnm.2013.19.2.171.
16. Farre, R., Vanheel, H., Vanuytsel, T., Masaoka T., Tornblom, H., Simren, M., Van Oudenhove, L., Tack, J. F. In functional

dyspepsia, hypersensitivity to postprandial distention correlates with meal-related symptom severity. **Gastroenterology** 査読有 2013, 145:566-573
doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.018.

17. Janssen, P., Harris, M. S., Jones, M., Masaoka T., Farre, R., Tornblom, H., Van Oudenhove, L., Simren, M., Tack, J. The relation between symptom improvement and gastric emptying in the treatment of diabetic and idiopathic gastroparesis. **Am. J. Gastroenterol.** 査読有 2013, 108:1382-1391,
doi: 10.1038/ajg.2013.118
18. Hirata, K., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Masaoka T., Saito, Y., Nishizawa, T., Iwasaki, E., Fukuhara, S., Okada, S., Hibi, T. Improvement of reflux symptom related quality of life after Helicobacter pylori eradication therapy. **J. Clin. Biochem. Nutri.** 査読有 2013, 52:172-8
doi: 10.3164/jcfn.12-107
19. Matsuzaki J, Suzuki H, Okuda S, Tanimoto A, Asakura K, Fukuhara S, Okada S, Hirata K, Mori H, Masaoka T. Higuchi H, Hozawa S, Kuribayashi S, Takebayashi T, Hibi T. Biliary Findings Assist in Predicting Enlargement of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. **Clin Gastroenterol Hepatol.** 査読有 2013, 11:548-54
doi: 10.1016/j.cgh.2012.11.027.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 正岡 建洋 高解像度食道内圧測定で診断した胃食道接合部通過障害の臨床的意義。第 17 回日本神経消化器病学会。2015 年 11 月 12 日 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県国頭郡恩納村)
2. 正岡 建洋 シカゴ分類第 3 版に基づいた高解像度食道内圧測定による食道運動障害の診断。第 69 回日本食道学会学術集会。2015 年 7 月 3 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
3. 正岡建洋 東京都内多施設共同調査における Helicobacter pylori 一次・二次除菌率の経年変化 続報。第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会。2015 年 6 月 27 日 ポートピアホテル (兵庫県神戸市)
4. 正岡建洋 FD 患者の亜分類並びにアコチアミドの有効性と胃排出能の関係。第 101 回日本消化器病学会総会。2015 年 4 月 23 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)
5. 正岡建洋 当院における NutCracker 食道症例の検討 第 11 回日本消化管学会。2015 年 2 月 13 日。京王プラザホテル(東京都新宿区)
6. Masaoka T. et al. Relationship between sub-classification of functional dyspepsia and gastric emptying **4th Biennial Congress of**

Asian Neurogastroenterology & Motility Association 2015 年 2 月 7 日 デリー (インド)

7. 正岡建洋 高解像度食道内圧測定で診断された NutCracker 食道症例の検討 第 16 回日本神経消化器病学会。2014 年 11 月 7 日 学術総合センター (東京都千代田区)
8. 正岡建洋 FD の亜分類と胃排出遅延の関係の検討 第 8 回機能性ディスペプシア研究会 2014 年 11 月 6 日 学術総合センター (東京都千代田区)
9. 正岡建洋 胃十二指腸領域由来症状の関連の検討 第 22 回日本消化器病関連学会週間(JDDW2014)。2014 年 10 月 24 日 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
10. Masaoka T. et al. Role of delayed gastric emptying in pathogenesis of Japanese FD patients 第 22 回日本消化器病関連学会週間(JDDW2014)。2014 年 10 月 23 日 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
11. Masaoka T. et al. Endoplasmic reticulum chaperone, 78 kDa glucose-regulated protein regulates neuronal nitric oxide expression. **The 1st Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting** 2014 年 9 月 6-7 日 広州 (中国)
12. 正岡建洋 東京都多施設共同調査における Helicobacter pylori 一次・二次除菌率の経年変化の検討 2014 年 6 月 28 日 ステーションコンファレンス東京 (東京都千代田区)
13. Masaoka T. (Invited) Stem cell research in Neurogastroenterology and Motility **15th Recent Update of Neurogastroenterology and Motility Symposium.** 2014 年 6 月 14 日 ソウル (韓国)
14. 正岡建洋 機能性ディスペプシア患者及び糖尿病患者における 13C 酢酸負荷呼吸気試験を用いた胃排出遅延の合併率の検討。第 100 回日本消化器病学会総会。2014 年 4 月 25 日 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
15. 正岡建洋 Blatchford score を用いた上部消化管出血に対する緊急内視鏡検査の必要性の評価。第 97 回日本消化器内視鏡学会関東地方会。2013 年 12 月 14 日。シェーンバツハ・サポー (東京都千代田区)
16. 正岡建洋 小胞体シャペロン GRP78 は nNOS 発現を制御する 第 15 回日本神経消化器病学会 2013 年 11 月 8 日・ビッグハート出雲 (島根県出雲市)
17. 正岡建洋 FD 症状を緩和する緑茶主成分 Epigallocatechin gallate による小胞体シャペロン GRP78 抑制を介した nNOS 活性化機構の検討 第 21 回日本消化器病関連学会週間(JDDW2013)。2013 年 10 月 11 日 新高輪プリンスホテル (東京都品川区)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正岡建洋 (Masaoka Tatsuhiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00317132

(2) 研究分担者

鈴木秀和 (Suzuki Hidekazu)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：70255454