

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460946

研究課題名(和文) 上部消化管における新規胆汁酸センサーの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel bile acid-sensor in the mouse upper gastrointestinal tract.

研究代表者

鹿野 美千子 (SHIKANO, Michiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70405190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ASIC5 (BLINaC または BASIC) は近年胆道上皮での発現が報告された新規胆汁酸センサーだが、上部消化管での発現については報告されていない。そこで、我々は、ASIC5 の食道における発現を精査した。RT-PCR 法によれば、ASIC5 遺伝子断片はマウス食道の中部と下部で発現が多く、全長クローニングにより新規のスプライシングバリエーションを認め、他の候補として TGR5 についてもヒト正常食道上皮細胞株 (HET-1A) を用いて精査したが、その発現は認められなかった。特異的な抗体がないためタンパクレベルでの発現が未解析であるが、ASIC5 が食道で重要な役割を担っている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Acid-sensing ion channel 5 (ASIC5; also called BLINaC or BASIC) is a novel bile acid-sensitive ion channel, which is expressed in the epithelial cells that line bile ducts (Wiemuth et al, 2012), but the expression in the upper digestive tract is unknown. We thus examined the expression of ASIC5 in the mouse esophagus. RT-PCR analysis found that the short fragments of ASIC5 transcripts were abundantly detected in the middle and lower regions. Full length PCR cloning analysis identified a novel splicing variant from the mouse esophagus along with the registered ASIC5 transcripts. We also examined the expression of acid-sensitive G protein-coupled receptor TGR5 known as another candidate in a human normal esophageal epithelial cell line HET-1A, but apparent expression was not detected. ASIC5 may participate in physiological and pathophysiological functions of the esophagus, although the expression of ASIC5 protein was not confirmed because of lack of antibodies specific to ASIC5.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ASIC5 抗体 マウス食道 RT-PCR ウェスタンブロット 免疫組織化学 ヒト正常食道上皮細胞 TGR5 特異

1. 研究開始当初の背景

胃食道逆流症 (Gastroesophageal reflux disease:GERD) の患者数は近年増加傾向にあり、今後はバレット食道、さらにはバレット腺癌も増加することが懸念されていることから、GERD の病態を解明することは喫緊の課題である。これまでの報告では、胃酸以外の胃内容物の逆流、特に胆汁酸が GERD の進展、バレット食道形成に重要な役割を果たしていることが指摘されているが、食道粘膜における胆汁酸の受容機構については不明な点が多い。胆汁酸は、他の組織では FXR(farnesoid X receptor)核内胆汁酸受容体を介して作用することが知られているが、食道での発現については、施設間で実験結果に相違があり、十分解明されていない。一方、近年細胞膜型の胆汁酸受容体が他の組織で同定された (Wiemuth *et al.*, 2012; Kawamata *et al.*, 2003)。十二指腸や胆嚢の上皮細胞では ASIC5(別名 BASIC)と呼ばれる酸感受性イオンチャネルのファミリー分子が、単球や腸内分泌細胞などでは TGR5 という G タンパク質共役型受容体が、胆汁酸受容体として機能しているという報告があるが、これらの食道粘膜における発現については全く検討されていない。そこで我々は、これら新規の胆汁酸受容体に着目し、解析する実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上部消化管、特に食道上皮に発現している新規胆汁酸受容体を検索し、さらに GERD との関連を検討し、GERD の病態解明につなげることである。

そこで我々は、他の組織で報告された ASIC5 及び TGR5 が上部消化管の胆汁酸に対する即時応答に重要な役割を果たしているのではないかという仮説を立て、これらの遺伝子について、上部消化管における発現、局在、生理機能について調べることにした。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いた解析：遺伝子発現と形態学的解析

マウス上部消化管(食道)における ASIC5 の発現を RT-PCR、免疫組織化学染色、*in situ* ハイブリダイゼーション、ウェスタンブロットにより精査した。具体的には、C57BL6J マウスから上部消化管を摘出後、total RNA を抽出して RT-PCR 法にて遺伝子産物の発現を検索した。まずは遺伝子断片の有無を確認した後、遺伝子の全長についても PCR で確認した。次に、タンパクレベルでの局在を決定するため、摘出した臓器を OCT コンパウンドに包埋、クリオスタットにて新鮮凍結切片を作製し、風乾固定後市販の特異抗体を用いて間接蛍光免疫染色を行った。抗体の特異性はペプチド抗原による吸収試験で確認した。mRNA レベルでの発現と局在については、クローニングした ASIC5 サンプルから独自のリポプローブを作製し、<sup>35</sup>S で標識した後、*in situ* ハイ

ブリダイゼーション法を実施した。タンパクレベルでの解析や抗体の評価についてはウェスタンブロットでもチェックを行なった。

(2) HET-1A 細胞を用いた解析

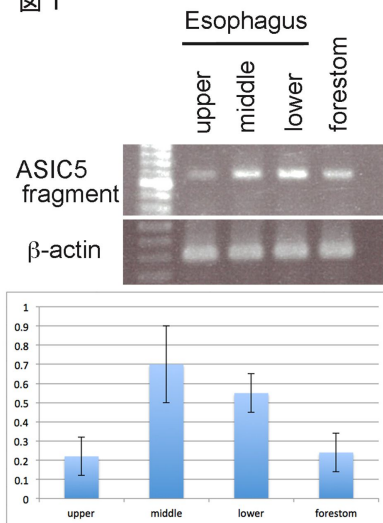
ヒト食道上皮細胞における TGR5 遺伝子の発現の有無について、ヒト正常食道上皮細胞の性質を保持する細胞株 HET-1A 細胞を用い、RT-PCR 法により解析した。使用した HET-1A 細胞については、この細胞で発現が確認されている一過性受容体電位バニロイド 1(TRPV1)及び TRPV4 の PCR の結果により評価した。

4. 研究成果

(1) ASIC5 mRNA の発現解析

マウス上部消化管(食道)における ASIC5 mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。まず食道を上部、中部、下部に 3 等分して、部位ごとで ASIC5 の遺伝子断片を調べると、食道の中部と下部で特に発現が強いことが明らかとなった(図 1)。

図 1



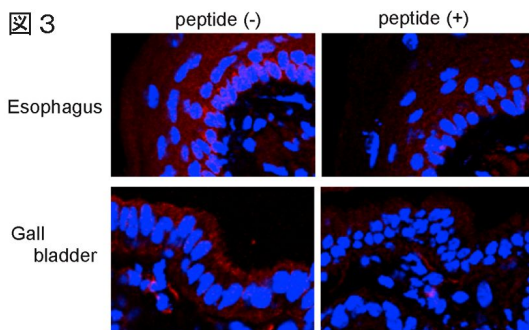
さらに食道組織において ASIC5 mRNA の全長も PCR してその分子同定を行ったところ、登録型の ASIC5-001 とともに ASIC5-002 もクローニングされ、マウス食道には 001 タイプに加え、002 タイプも mRNA として発現していることが示唆された(図 2)。

図 2

```

001. 1 ATGGAACATACTGAGAAATCACAAGTGCCAGCGGAGAAAGGACTCTTAGGAAAGATAAAA
002. 1 -----
001. 61 CGTTACCTCTCAAAGAGACCACCTGCCATCTCCAAGTACCCGGAAGAAGTTCGATCAAGAC
002. 1 -----
001. 121 TTTGCCATGTGCCACTTCTTTTCATGGGATACATAAATTGCCAGAACGAGAACAAGTT
002. 1 -----ATGTCCACTTCTTTTCATGGGATACATAAATTGCCAGAACGAGAACAAGTT
001. 181 CGAAAGGTGATCTGGCTGGCTGGTGGTGGCTGGCTGTCTGCTCTCTGGTGTGGCAATC
002. 55 CGAAAGGTGATCTGGCTGGCTGGTGGTGGCTGGCTGTCTGCTCTCTGGTGTGGCAATC
001. 241 TACAGTCTGTTGGTCAATTACTTCACATGGCCCAACGACAACATCTATAGAAGTTCAGTAT
002. 115 TACAGTCTGTTGGTCAATTACTTCACATGGCCCAACGACAACATCTATAGAAGTTCAGTAT
001. 301 GTGGAAAAAATCGAGTCCCAGCTGTGACACTCTGTAACCTGAACAGATTCCAAACAGAA
002. 175 GTGGAAAAAATCGAGTCCCAGCTGTGACACTCTGTAACCTGAACAGATTCCAAACAGAA
    
```

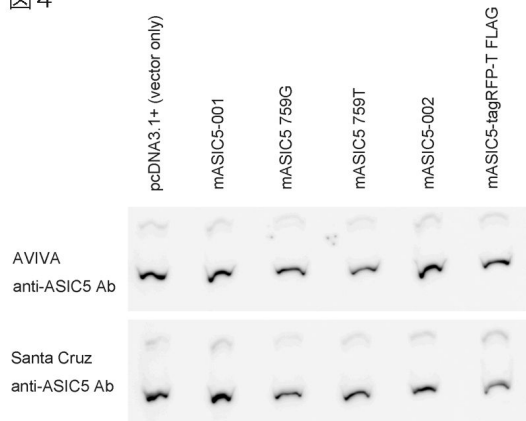
次に ASIC5 タンパクの局在を確かめるために間接蛍光免疫染色を行った。市販の特異抗体 (AVIVA SYSTEM BIOLOGY, APR37696) を用いて行った免疫染色では、食道及び陽性コントロールとして用いた胆嚢において、いずれもその粘膜上皮が染色され、添付のペプチドによる吸収試験でその上皮の染色性は低下していた (図 3)。



一方、ASIC5 mRNA の局在を検索するため <sup>35</sup>S 標識プローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション法も実施したが、食道に明確なシグナルを認めなかった。

そこで、ASIC5-蛍光色素融合タンパク、タグ付き ASIC5 など、様々な ASIC5 コンストラクトを作製し、これを培養細胞に発現させた後、その細胞から total RNA 及びタンパクを回収、RT-PCR とウェスタンブロットを行なった。RT-PCR では ASIC5 が検出されないベクターコントロールでも Western blot では予想される分子量付近にバンドが認められ (図 4 レーン 1) さらに ASIC5-tagRFP-T 融合タンパクでもバンドのシフトがないことから (図 4 レーン 6)、この抗体の非特異性が明らかとなった。

図 4



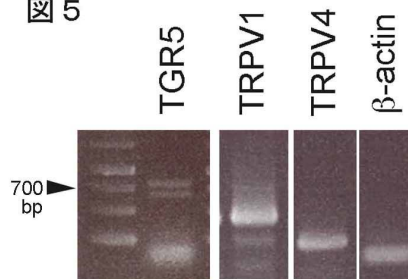
並行して別の市販抗体 [Accn5(Y-16), Santa Cruz Biotechnology, sc-101880] (図 4 下段) さらに外注にてオリジナル抗体を作製してこの問題の解決にあたったが、現在までのところ、食道組織における ASIC5 タンパクの発現は確認できていない。ASIC5 と遺伝子配列が類似した別のセンサー分子が発現している可能性がありさらに解析を進め

る予定である。

## (2) TGR5 G タンパク質共役型胆汁酸受容体の解析

TGR5 胆汁酸受容体は、ヒトの胃や小腸での発現については報告があるものの、食道粘膜では調べられていない。そこでヒトの正常食道上皮細胞の性質を保持していることが知られている細胞株である HET-1A 細胞を用い、健常時における TGR5 の発現について調べた。HET-1A 細胞には TRPV1 や TRPV4 遺伝子が発現していることが報告されているが、これらが十分に増幅されている条件においても TGR5 遺伝子断片 (690 bp) はほとんど増幅されなかった (図 5)。

図 5



## (3) その他の候補分子の解析

近年、同じ酸感受性イオンチャネルに属する ASIC1a が胆汁酸により応答増強することが報告された (Ilyaskin *et al.*, 2017)。ASIC5 や ASIC1a 以外の ASIC サブタイプも胆汁酸感受性を有する可能性があることから、これまでの研究で不明な点が多い ASIC4 にも着目して ASIC5 と並行して解析を進めている。米国カリフォルニア大学デイヴィス校が主催する KnockOut Mouse Project (KOMP) から購入した ES 細胞から ASIC4-lacZ レポーターマウスを作製し、これを用いてその発現を解析したところ、上部消化管では胃の筋間神経叢の一部のニューロンに発現していた。現在、野生型と ASIC4 ノックアウトマウスを用いて消化管輸送能試験や代謝ケージを使い糞便検査をして消化管運動能に有意差がないか解析している。

## <引用文献>

Wiemuth D, Sahin H, Falkenburger BH, Lefèvre CM, Wasmuth HE, Gründer S. BASIC--a bile acid-sensitive ion channel highly expressed in bile ducts. *FASEB J.* 26(10):4122-30 (2012) DOI:10.1096/fj.12-207043.

Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Yugo Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *J Biol Chem.* 278(11): 9435-40 (2003)

DOI:10.1074/jbc.M209706200

Ilyaskin AV, Diakov A, Korbmacher C, Haerteis S. Bile acids potentiate proton-activated currents in *Xenopus laevis* oocytes expressing human acid-sensing ion channel(ASIC1a). *Physiol Rep.* 5(3): pii:e13132 (2017)  
DOI:10.14814/phy2.13132.

#### 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)

Kamiya T, Shikano M, Kubota E, Mizoshita T, Wada T, Tanida S, Kataoka H, Adachi H, Hirako M, Okuda N, Joh T. A multicenter randomized trial comparing rabeprazole and itopride in patients with functional dyspepsia in Japan: the NAGOYA study. *J Clin Biochem Nutr.* 査読あり 60(2) (2017) 130-135.  
DOI:10.3164/jcfn.16-106.

Kimura Y, Kamiya T, Senoo K, Tsuchida K, Hirano A, Kojima H, Yamashita H, Yamakawa Y, Nishigaki N, Ozeki T, Endo M, Nakanishi K, Sando M, Inagaki Y, Shikano M, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Katsumi K, Joh T. Persistent reflux symptoms cause anxiety, depression, and mental health and sleep disorders in gastroesophageal reflux disease patients. *J Clin Biochem Nutr.* 査読あり 59 (1) (2016) 71-77.  
DOI:10.3164/jcfn.16-9.

Ueda T, Hoshikawa M, Shibata Y, Kumamoto N, Ugawa S. Basal cells express functional TRPV4 channels in the mouse nasal epithelium. *Biochem Biophys Rep* 査読あり 4 (2015) 169-174.  
DOI:10.1016/j.bbrep.2015.09.008

Kamiya T, Shikano M, Tanaka M, Ozeki K, Ebi M, Katano T, Hamano S, Nishiwaki H, Tsukamoto H, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Okuda N, Joh T. Therapeutic effects of biobran, modified arabinoxylan rice bran, in improving symptoms of diarrhea predominant or mixed type irritable bowel syndrome: a pilot, randomized controlled study. *Evid Based Complement Alternat Med.* (2014) 828137.  
DOI:10.1155/2014/828137.

[学会発表](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鹿野 美千子 (SHIKANO, Michiko)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科  
・研究員  
研究者番号: 70405190

##### (2) 研究分担者

神谷 武 (KAMIYA, Takeshi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 10254301

植田 高史 (UEDA, Takashi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科  
・准教授  
研究者番号: 90244540