

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870214

研究課題名(和文)消化管上皮の内腔圧受容とATP放出機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of luminal pressure reception and ATP release in gastrointestinal epithelium

研究代表者

三原 弘 (Mihara, Hiroshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：00612623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：国民の約15%が原因不明の慢性の腹痛を自覚し、胃腸内圧への過敏が原因の1つとされます。食道はTRPV4イオンチャネルで引っ張りを感じ、アデノシン三リン酸(ATP)輸送体(VNUT)で袋状になったATPを放出します。研究の結果、食道のみならず胃から直腸にTRPV4とVNUTがあり、引っ張りを含めたTRPV4刺激でVNUTを介してATPが放出されました。TRPV4を全身から除いたマウスは胃の動きが異常となり、ピロリ菌感染により、TRPV4が減少しました(遺伝子メチル化)。胃腸内で合成されるTRPV4活性化成分の定量化にも成功し、目に見えない腹痛を定量化できる可能性が出てきました。

研究成果の概要(英文)：Approximately 15% of Japanese people have chronic abdominal pain of unknown origin and hypersensitivity to gastrointestinal pressure is one of possible causes. The esophagus senses a tension with mechano-sensitive TRPV4 ion channel and releases bag-like adenosine triphosphate (ATP) using its transporter (VNUT). As a result of the study, TRPV4 and VNUT are present not only in the esophagus but also from the stomach to the rectum, and ATP is released via VNUT by TRPV4 stimulation, including stretch stimuli. Mice lacking TRPV4 have gastric motor abnormality and Helicobacter pylori infection decreases TRPV4 (gene methylation). It has also succeeded in quantifying the TRPV4 stimulating component synthesized in the gastrointestinal tract and so the possibility of quantifying invisible abdominal pain has come out.

研究分野：消化器内科

キーワード：消化管上皮 伸展刺激 ATP放出 TRPV4 VNUT

1. 研究開始当初の背景

(1) マウス食道上皮細胞に発現する TRPV4 が、食道内圧の伸展刺激を受容し、VNUT によって濾胞内に取り込まれた ATP を開口分泌 (エキソサイトーシス) していることを明らかにした (Mihara, Boudaka et al, J Physiol 2011)。
(2) TRPV4 は、食道以外の消化管上皮にも発現しており、他の消化管上皮においても、内圧受容、ATP 開口分泌を起こし、内臓痛に関わっている可能性がある。

2. 研究の目的

消化管上皮細胞の圧受容と、ATP 放出機構を明らかにする。

(1) 胃及び結腸上皮細胞に、TRPV4 イオンチャネル及び VNUT が発現し、
(2) 伸展刺激により TRPV4 の活性化を介して、VNUT によって濾胞内に取り込まれていた ATP が開口分泌 (エキソサイトーシス) することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス個体 (野生型、TRPV4 欠損マウス、VNUT 欠損マウス)、各消化管上皮細胞株、患者から採取された生検標本を用いた。

(2) 遺伝子発現は、PCR 法、タンパク発現は Western-blotting 法、免疫染色法を用いた。

(3) TRPV4 の機能は Ca²⁺-イメージング法、電気生理学的検討にて検討した。

(4) ATP 放出はルシフェリルシフェラーゼ反応で定量化した。

(5) TRPV4 活性化剤、ストレッチチャンパー、VNUT 阻害剤を用いた。

(6) TRPV4 遺伝子メチル化をメチル化特異的 PCR 法にて検出した。

(7) アラキドン酸代謝物を HPLC 法により定量化した。

4. 研究成果

(1) マウス個体及びヒトの胃から直腸、各上皮細胞株において TRPV4 と VNUT の遺伝子とタンパク発現が確認され (図 1)、TRPV4 の機能が Ca²⁺-イメージング法、電気生理学的検討にて確認された。

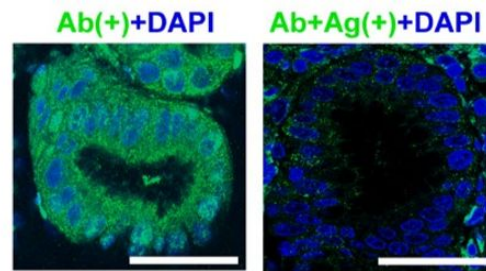


図 1 ヒト胃上皮に発現する TRPV4 (Helicobacter 2017 より)

(2) 消化管上皮細胞の TRPV4 活性化による ATP 放出は、TRPV4 阻害剤、VNUT 阻害剤にて阻害され、胃上皮細胞株の伸展刺激による ATP 放出は TRPV4 阻害剤にて阻害された (図 2)。

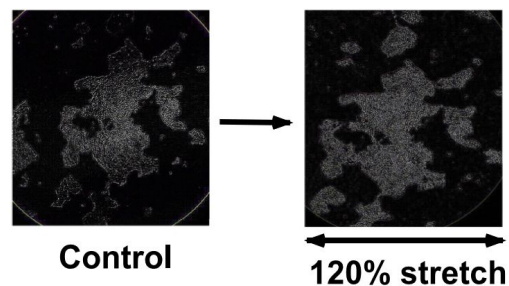


図 2 ラット胃上皮細胞株に 120% 伸展刺激を加えているところ

(3) ピロリ菌感染患者の胃上皮において TRPV4 遺伝子はメチル化異常を来し、TRPV4 発現が抑制されていた。

(4) マウス個体を用いて胃の排出能を比較したところ TRPV4 欠損マウスの胃排出能は、野生型に比べて低下していた。

(5) マウス消化管、消化管上皮細胞株から内因性 TRPV4 活性化因子とその代謝産物を測定条件検討を行い、5,6-EET、8,9-EET、5,6DHET、8,9-DHET を測定しえた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1) 三原弘. 消化管上皮の圧受容と慢性炎症. BIO Clinica、査読無、33; 46~51, 2018
- 2) 三原弘. 消化管上皮の圧受容と慢性炎症. 別冊 BIO Clinica、査読無、6; 117~122, 2017
- 3) H. Mihara, N. Suzuki, JS Muhammad et al. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) silencing in Helicobacter pylori-infected human gastric epithelium. Helicobacter. 2017 Apr;22(2). doi: 10.1111/hel.12361. Epub 2016 Sep 30.
- 4) H. Mihara, N. Suzuki, Boudaka AA et al. Transient receptor potential vanilloid 4-dependent calcium influx and ATP release in mouse and rat gastric epithelia. World J Gastroenterol、査読有、22; 5512-9, 2016 doi: 10.3748/wjg.v22.i24.5512
- 5) 三原弘, 杉山 敏郎. Helicobacter Pylori 感染胃粘膜における TRPV4 メチル化. Progress in Medicine、査読無、35; 431-3, 2015
- 6) N. Suzuki, H. Mihara, H. Nishizono et al. Protease-Activated Receptor-2 Up-Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Function in Mouse Esophageal Keratinocyte. Dig Dis Sci、査読有、60; 3570-8, 2015 doi: 10.1007/s10620-015-3822-6
- 7) H. Yamawaki, H. Mihara, N. Suzuki et al. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 activation in indomethacin-induced intestinal damage. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol、査読有、307; G33-G40, 2014 doi: 10.1152/ajpgi.00105.2013
- 8) 三原弘. H.pylori 感染症と胃運動異常. 消化器内科、査読無、58; 184-8, 2014

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 三原弘, 杉山敏郎. 機能性ディスペプシアにおける TRPV4 の関与. 第 14 回日本消化管学会総会学術集会、2018 年
- 2) 三原 弘, ムハンマド ジブラン, 鈴木 庸弘ら. ピロリ菌感染は正常ヒト胃上皮細胞の伸展感受性イオンチャネル TRPV4 のメチル化サイレンシングを誘導する. 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会、2016 年
- 3) H.Mihara, N.Suzuki, JS Muhammad et al. A mechanosensitive ion channel, TRPV4-methylation silencing in gastric epithelium. Congress of the Asian Neurogastroenterology and Motility Association. 2017 年
- 4) 三原弘, 富永真琴, 杉山敏郎. 胃上皮における TRPV4 メチル化サイレンシング. 第 20 回 Japan Purine Club ミーティング. 2016 年
- 5) H.Mihara, JS Muhammad, S.Nanjo et al. H. Pylori infection directly induces methylation silencing of a gastric epithelial mechano-sensor, Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in gastric epithelial cells. Digestive Disease Week 2016、2016 年
- 6) H.Mihara, JS Muhammad, N.Suzuki et al. Gastrointestinal epithelia could be luminal sensors for chemical, hypo osmolality, acid, temperature and stretch via ATP release. Digestive Disease Week 2015、2015 年
- 7) 三原弘, JS Muhammad, 鈴木 庸弘ら. 化

合物、低浸透圧、酸、伸展、温度の各種刺激により胃上皮細胞から放出されたATPが胃内の情報を神経に伝達しうる。第7回J-FD研究会。2014年

- 8) 三原弘、鈴木庸弘、JS Muhammadら。TRPV4活性化による胃上皮細胞からのATP放出機構の破綻が、H. pylori関連ディスペプシアの一因になり得る。第16回日本神経消化器病学会、第8回機能性ディスペプシア研究会、第82回消化器心身医学研究会、第4回IBS研究会合同学術集会2014。
- 9) H.Mihara, N.Suzuki, T.Ando et al. What is the role of TRPV4 expressed in gastric epithelium? International Symposium on Mechanobiology 2014
- 10) A.Boudaka, H.Mihara, T.Sugiyama et al. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) as a mechanotransducer in the mouse esophagus 第91回日本生理学会大会, 2014年
- 11) H.Mihara, M.Tominaga, T.Sugiyama. A mechanosensitive ion channel, TRPV2 expressed in gastric myenteric plexus contributes to gastric adaptive relaxation and emptying in mice. 第91回日本生理学会大会韓国日本合同シンポジウム, 2014年

〔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〕

ニュースリリース

<https://www.u-toyama.ac.jp/education/news/2016/1011.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三原 弘 (MIHARA, Hiroshi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教
研究者番号: 00612623

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者(順不同)

西園 啓文 (NISHIZONO, Hirofumi)
富山大学・研究推進機構・研究推進総合支援センター・助教

研究者番号: 10502289

杉山 敏郎 (SUGIYAMA, Toshiro)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授
研究者番号: 00196768

富永 真琴 (TOMINAGA, Makoto)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授
研究者番号: 90260041

田淵 圭章 (TABUCHI, Yoshiaki)
富山大学・研究推進機構 研究推進総合支援センター・教授
研究者番号: 20322109

渡辺 志朗 (WATANABE, Shiro)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 00222406

内田 邦敏 (UCHIDA, Kunitoshi)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 20581135

小泉 修一 (KOIZUMI, Schuichi)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 10280752

(4)研究協力者

Ammar Boudaka
山脇 秀元 (YAMAWAKI, Hidemoto)
鈴木 庸弘 (SUZUKI, Nobuhiro)
Jibrán Sualeh Muhammad
小澤 豊美 (KOZAWA, Toyomi)
藤浪 斗 (Fujinami, Haruka)
安藤 孝将 (ANDO, Takayuki)
南條 宗八 (NANJO, Sohachi)