

第156回 名古屋市立大学医学会例会
特別講演 I

消化管上皮細胞の感覚センサーとしての働き

植田 高史

名古屋市立大学大学院医学研究科 基礎医科学講座機能組織学

Gastrointestinal epithelial cells function as a sensor for the detection of intraluminal environments.

TAKASHI UEDA

*Department of Neurobiology and Anatomy,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences*

1. はじめに

消化管は消化管上皮を隔てて外界と接しており、口から入ってきた食物などの情報を感知するとともに、その情報に応答する独自の神経系や免疫系を有している。このシステムが正常に機能している場合は、それほど意識にのぼらずサイレントであるが、異常をきたすと、痛覚過敏や免疫異常を生じ、逆流性食道炎や潰瘍性大腸炎などの原因になると考えられる。

この情報感知に関与する消化管の感覚は、大きく内在神経系 (intrinsic primary afferent neurons : IPAN) と外来神経系 (external primary afferent neurons : EPAN) の二つの系からなり、前者は刺激に対する腸管運動の発生に、後者は刺激に対する痛みなど、有意識性内臓感覚の惹起に寄与していることが知られている¹⁾。さらに感覚の仕組みは消化管の部位によっても異なり、食道では皮膚と同様に上皮下に存在する自由神経終末が感覚に関与しているのに対し (食道型)、腹部消化管である胃、小腸および大腸では、自由神経終末に加え、上皮内に散在する胃腸内分泌細胞 (enterochromaffin cells : EC 細胞) がその感覚に重要であるとされている (胃腸型)²⁾。しかしながら、Arai らのヒト大腸における EC 細胞の観察によれば、EC 細胞の数は上皮細胞全体の約 1% と少ない上に、その半数が腸陰窩の深部に集中しており³⁾、EC

細胞が、管腔の表層に存在する刺激物質、あるいは管腔内を速やかに移動する刺激物質の情報を十分に監視できているかは疑問である。

近年、新たな感覚の仕組みが提唱されてきている。これによれば、上皮細胞は様々な刺激に応答し、ATP などの神経伝達物質様の物質を放出することにより、その情報を感覚神経に伝達しているというものである。これまで消化管の上皮細胞は、食道においては保護機能、腸管においては分泌および吸収機能に特化していると考えられがちであったが、これら消化管上皮細胞に感覚の機能を担うセンサー分子が発現し機能していることを証明できれば、消化管の感覚に新しい概念をもたらす可能性がある。

上記の背景を踏まえて、本稿では体性感覚に関わる後根神経節細胞から単離された TRPV (transient receptor potential vanilloid) チャネルファミリーの消化管上皮における発現について我々の実験から得られたデータを紹介するとともに、TRP チャネルファミリーの消化器系で果たす役割について考察する。

2. TRPV (transient receptor potential vanilloid) チャネルファミリーと消化管での発現

TRP チャネルは1989年光受容に異常を示すショウジョウバエの変異体から発見された遺伝

子で、哺乳動物では、遺伝子の相同性から、TRPC (TRP canonical), TRPV (TRP vanilloid), TRPM (TRP melastatin), TRPML (TRP mucolipin), TRPP (TRP polycystic : または PKD と呼ばれる), TRPA (TRP ankyrin) の六つのファミリーに分類されている⁴⁾. TRPV チャンネルファミリーは、TRPV1 (カプサイシン受容体) およびこれに相同性の高い TRP チャンネル群であり、これらはさらに温度感受性をもち thermoTRP ファミリーに属す TRPV1 ~ TRPV4 と生体カルシウム調節に関与する TRPV5 と TRPV6 に分類される. 恒常的活性型の後者に対して、TRPV1 ~ TRPV4 はリガンド作動性の非選択性陽イオンチャンネルであり、刺激に応答して細胞内カルシウムの濃度を上昇させる. またこれらは、温かさや熱さという温度刺激ばかりか、機械刺激や構造の異なった複数のリガンドによっても活性化され、その中には消化管に作用する生理活性物質も含まれている. 例えば TRPV1 は感覚神経特異的に発現し、痛みや唾液・胃液の分泌を引き起こす唐辛子の主成分のカプサイシンによっても活性化され、痛覚受容体としても機能している⁵⁾. また、TRPV3 は消化促進や抗炎症作用を持つハーブ (オレガノ、クローブ、タイムなど) の成分として知られる carvacrol や thymol などに応答する⁶⁾. 加えて、これらはアラキドン酸やプロスタグランジン E₂ (PGE₂) などの炎症関連メディエーターにより感作され、炎症性痛覚過敏との関係が示唆されている. しかしながら、TRPV1 を除いた thermoTRP ファミリーの消化管における発現については不明であった. そこで我々は、マウスの消化管 (食道、前胃、胃、十二指腸、近位結腸および遠位結腸) から全 RNA を抽出し、TRPV1 ~ TRPV4 の特異的なプライマーを用い RT-PCR 反応を行った. その結果、図 1 に示すように、遺伝子ごとに異なった発現パターンが得られた. 興味深いのは、1) 遠位結腸にのみ明確な TRPV3 遺伝子断片の増幅を認めたこと、2) 食道および前胃に TRPV4 の遺伝子断片の増幅が著しいこと、であり、我々はこれらについてさらに解析を進め

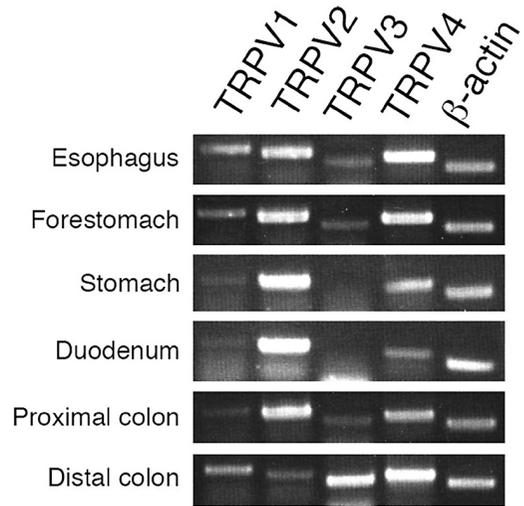


図1 マウス消化管各部における thermoTRP チャンネルの遺伝子発現

た.

3. 遠位結腸における TRPV3⁷⁾

大腸は主に水分の吸収を担う臓器で、大腸上皮の表層には吸収上皮細胞 (absorptive cells) が観察される. また便から粘膜を保護するために発達した粘液分泌細胞 (杯細胞 : goblet cells) が陰窩壁に沿って多数みられ、陰窩中部 ~ 深部にかけて EC 細胞や幹細胞が散見される (図 2 A). 我々はまず RT-PCR 反応の結果を確認するため、TRPV3 の mRNA の局在を TRPV3 に特異的な RI プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーション法にて検討した. TRPV3 の mRNA のシグナル粒子は、近位結腸ではほとんど認められず、遠位結腸の上皮表層に豊富に認められた (図 2 B). 遠位結腸においてもこれ以外の組織構造に明確な mRNA の陽性反応は観察されなかったため、TRPV3 mRNA は遠位結腸上皮の表層の細胞に限局して発現していることが明らかとなった. さらに TRPV3 に対する特異抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、近位結腸に免疫陽性反応はみられず、遠位結腸の上皮表層にのみ陽性反応を認めた (図 2 C).

TRPV3 は、TRPV1 や TRPV2 と同様、2-APB

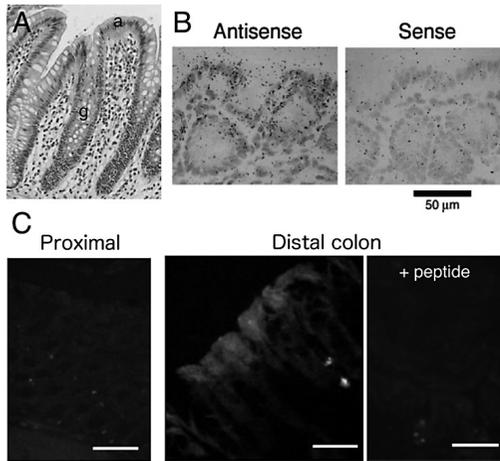


図2 マウス大腸における TRPV3 の発現

(A) マウス結腸の組織構造 (ヘマトキシリン-エオジン染色) a : absorptive cells (吸収上皮細胞), g : goblet cells (杯細胞). 杯細胞が並んでいるこの領域を陰窩 (crypt) という。

(B) マウス遠位結腸における TRPV3 mRNA (メッセージャー RNA) の分布. TRPV3 mRNA と同一の配列をもつ sense プローブではみられず, 相補的な配列をもつ anti-sense プローブで認められる黒色粒子が TRPV3 mRNA.

(C) マウス結腸における TRPV3 タンパクの局在. 間接蛍光抗体法による免疫組織化学写真. 近位結腸 (Proximal) では陽性反応はみられず, 遠位結腸 (Distal colon) の上皮表層に免疫陽性反応が認められる. 観察された陽性反応は, TRPV3 の特異ペプチド抗原による抗体吸収試験 (+peptide) を実施した標本ではみられないことから, この陽性反応が TRPV3 タンパクの局在を示していると考えられる. スケール 50 μ m

(2-aminoethoxydiphenyl borate) に反応するとともに, carvacrol にも応答し, 細胞内カルシウムの上昇を引き起こす. そこで, マウス遠位結腸上皮の初代培養細胞を用いてカルシウムイメージングを行ったところ, 全体の約15%の細胞に2-APB および carvacrol に対する濃度依存的なカルシウム応答が観察された (図3A). しかしながら, 2-APB や carvacrol は TRPA1 という別の TRP チャンネルも活性化することが知られていたため, TRPA1 の関与について TRPA1 の代表的なアゴニストである AITC (allyl isothiocyanate) でも刺激してみた. その結果, カルバクロールに反応し, かつ AITC に

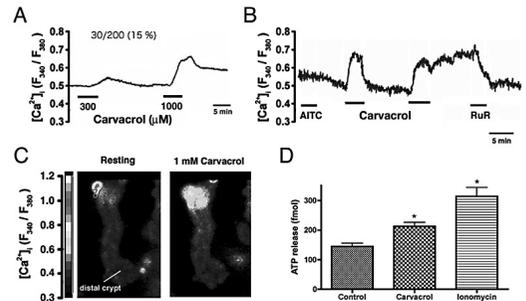


図3 マウス遠位結腸におけるカルシウムイメージング (A~C) と ATP アッセイ (D)

(A, B) マウス遠位結腸の初代培養細胞における fura-2 を用いた二波長励起一波長測光によるカルシウムイメージングの代表的な応答例. AITC : TRPA1 アゴニスト, RuR : ルテニウムレッド (TRPV チャンネルブロッカー). (C) 遠位結腸の陰窩構造を保持した状態でのカルシウムイメージングによる結果の一例. Distal crypt : 陰窩深部. 上皮表層にある細胞が carvacrol に応答し白く光っている. (D) ルシフェリンルシフェラーゼ反応による ATP アッセイの結果 (* $p < 0.01$)

応答する細胞は認められなかった (図3B).

以上より, 遠位結腸上皮の一部の細胞には TRPV3 チャンネルが機能発現していると考えられた.

それでは, TRPV3 を発現している細胞は大腸上皮のどの細胞種であろうか? 我々は, 大腸の陰窩構造を保存した器官培養組織を用いてカルシウムイメージングを行い, carvacrol に応答する細胞は上皮の表層に位置する細胞であることを見いだした (図3C). さらに, これらの細胞は刺激に反応してどんな細胞応答を引き起こすであろうか? ATP は近年注目されている傍分泌メディエーターであり, 腸管機能にも重要であることが示唆されていた. そこで, 同組織を用いて carvacrol に対する ATP の放出を検討した. 図3D に示すように遠位大腸組織は carvacrol の刺激により ATP を放出し, これはカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンの刺激でも観察された. 従って, この ATP 放出にはカルシウムシグナリングが重要であり, TRPV3 はこの機構の一担い手であることが確認された.

4. 食道における TRPV4^{8,9)}

前項にて EC 細胞が関わる胃腸型の消化管感覚に上皮細胞が関与することが示唆されたので、次に食道型の感覚について検討した。食道は、伸展などの機械刺激により電気的な興奮を引き起こし、この応答には食道の Auerbach 筋間神経叢の IGLE (intraganglionic laminar ending) が関与することが知られている。IGLE には P2X3 受容体 (ATP 受容体の一つ) が発現し¹⁰⁾、このノックアウトマウスで機械刺激に対する電気的興奮が減弱することから¹¹⁾、機械刺激に応答して放出された ATP がこの感知機構に重要であることが示唆されていたが、この ATP の由来は長らく不明であった。そこで我々は、食道において、機械受容器候補であり、かつ、その刺激により ATP を放出する可能性のある thermoTRP の解析を行った。

はじめに、RT-PCR によりマウス食道における thermoTRP の発現解析を行い、TRPV1、TRPV2 ならびに TRPV4 の遺伝子断片の増幅を確認した (図 1)。中でも TRPV4 は、シェアストレスや低浸透圧など、様々な機械刺激により活性化されるとの報告があったので、この分子を中心に解析した。まずマウス食道における TRPV4 mRNA の局在をジゴキシゲニン (DIG) プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法にて検討したところ、陽性反応を示すシグナルが食道上皮の浅層を除く中層から深層に認められた (図 4 A)。特に基底層で強く、抗 TRPV4 抗体を用いた蛍光免疫染色でも同様の結果が得られた (図 4 B)。さらに解析を進めるためにヒトの食道組織および正常ヒト食道上皮細胞の細胞株である HET-1A 細胞でも同様の解析を行ったところ、TRPV4 タンパクはヒト食道上皮の基底層 (図 4 C) および HET-1A 細胞 (図 4 D) にも発現していることが明らかとなった。

次に、マウス食道上皮細胞および HET-1A 細胞を用いて、TRPV4 の機能的な発現をカルシウムイメージングにて解析した。TRPV4 のアゴニストとして知られる 4 α -PDD (4 α -phorbol 12, 13-didecanoate) に対する応答性を観察し

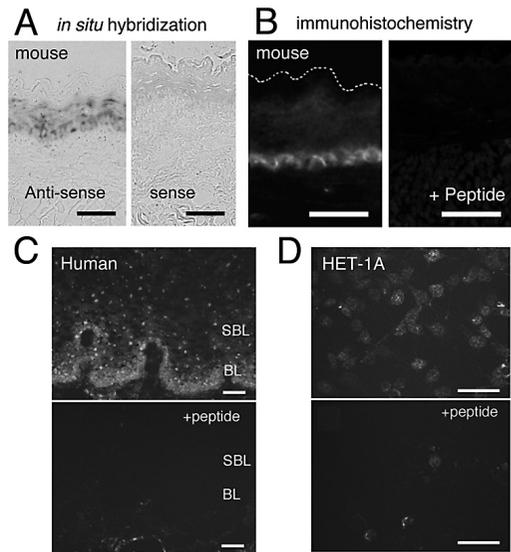


図 4 食道における TRPV4 の発現

(A, B) マウス食道における TRPV4 mRNA (A) およびタンパクの分布 (B)。 (C) ヒト食道における TRPV4 タンパクの分布。 SBL: 上皮基底上層, BL: 上皮基底層。 (D) 正常ヒト食道上皮細胞の細胞株 HET-1A 細胞における TRPV4 タンパクの分布。 +peptide: TRPV4 に特異的なペプチド抗原を用いた抗体吸収試験の染色像。 スケール (A) 12.5 μ m (B, C, D) 50 μ m

たところ、両細胞種ともに 4 α -PDD に対する濃度依存的なカルシウム応答が認められ、これは TRPV チャンネルのプロッカーであるルテニウムレッド (RuR) により有意に抑制された (図 5 A と B)。この 4 α -PDD 誘発性のカルシウム応答は、TRPV4 に特異的な siRNA を導入した HET-1A 細胞ではほとんど観察されないことから、4 α -PDD による活性化には TRPV4 が重要であることが確認された。

それでは、この TRPV4 の活性化が ATP 放出を引き起こすのか? またそうだとすると、どのような経路を介して起こるのだろうか? 我々はマウス食道上皮細胞および HET-1A 細胞を用いて ATP アッセイを行うとともに、HET-1A 細胞を用いて ATP が放出される経路についても検討した。その結果、両細胞種ともに 4 α -PDD 刺激により ATP の放出が引き起こされること、この放出は RuR の同時処理により有意に抑制され (図 5 C と D)、さらに TRPV4 に

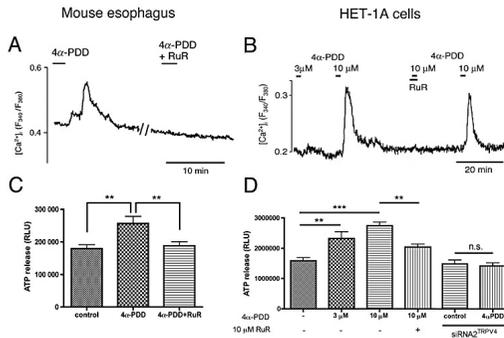


図5 マウス食道上皮ならびに HET-1A 細胞におけるカルシウムイメージングと ATP アッセイ

(A, B) マウス食道上皮細胞 (A) および HET-1A 細胞 (B) における fura-2 を用いた二波長励起一波長測光によるカルシウムイメージングの代表的な応答例。(C, D) マウス食道上皮細胞 (C) および HET-1A 細胞 (D) におけるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による ATP アッセイの結果。siRNA2^{TRPV4}: ヒト TRPV4 に特異的な siRNA のうち、効果のあった siRNA2 を導入した細胞。RLU; 相対的発光単位。(** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. not significant)

特異的な siRNA を導入した HET-1A 細胞では、ATP 放出がほとんど起こらないことが明らかとなった (図 5D)。加えて、RT-PCR の解析や種々のブロッカーを使った薬理学的な実験により、pannexin 1 と呼ばれるギャップ結合ヘミチャネルがこの ATP 放出に関与していることが確認された⁸⁾。以上より、マウスおよびヒト食道上皮細胞には機能的な TRPV4 が発現し、その刺激により ATP が放出されることが明らかとなった。従って、食道における機械刺激応答は、一部、上皮細胞に発現している TRPV4 によっても伝達されている可能性がある。

5. 考 察

二種の消化管感覚系 (胃腸型と食道型) の両者において、一般的な上皮細胞 (結腸では吸収上皮細胞, 食道ではケラチノサイト) に感覚センサー分子 (それぞれ TRPV3 と TRPV4) が発現し、その活性化により ATP が放出されることを証明した。これら ATP が関与する感覚

センサーの役割は今後さらに解析を行い明確にする必要があるが、現在は 3 つの可能性が考えられる。

1) 上皮細胞への関与

遠位結腸において、管腔内 ATP は上皮細胞の K^+ の分泌を促す効果に加え¹²⁾, Na^+ 吸収を抑制しているとの報告があり¹³⁾, TRPV3 チャネル活性化は、上皮細胞の分泌ならびに吸収機能をオートクラインに修飾している可能性がある。加えて、ATP は上皮細胞の分化や増殖に関わっているとの報告もある¹⁴⁾。実際、我々も TRPV4 が HET-1A 細胞の増殖を制御している可能性を見だしている⁸⁾。

2) 免疫応答への関与

呼吸器系や消化器系で細胞外 ATP の免疫応答への関与が近年報告されている。呼吸器系では、細胞外 ATP は樹状細胞を活性化することによりぜんそく性の炎症の惹起や維持に関わっているとの指摘がある¹⁵⁾。一方、消化器系では、Atarashi らが、細胞外の ATP が粘膜固有層の T_H17 細胞の分化を駆動し、腸管の炎症性疾患に関わっていることを報告している¹⁶⁾。興味深いことに、マウスでは自然発症性の皮膚炎を引き起こす DS-*Nh* マウスが存在し、これは皮膚表皮のケラチノサイトにも発現している TRPV3 の 573 番目のグリシンがセリンに置換することによる TRPV3 の過活動が原因であることが分かっている^{17, 18)}。今後 TRPV3 と潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患との関連を調査する必要がある。

3) 神経伝達物質としての役割

ATP が神経伝達物質として働いている可能性が指摘されている。後根神経節 (DRG) 細胞とケラチノサイトの *in vitro* 共培養系では、TRPV3 のアゴニスト刺激によりケラチノサイトから ATP が放出され、それが DRG 細胞を活性化することが既に報告されている¹⁹⁾。一方、腸管の伸展標本にて管腔面に ATP を投与すると、腸管内神経活動が認められる²⁰⁾。しかしながら、*in vivo* の環境に近い実験が少なく、今後、TRP チャネル刺激 → ATP 放出 → ニューロンの活性化を同一組織内で一連の反応として

捉えられるような実験が不可欠である。

6. おわりに

本研究により、消化管上皮細胞はその部位により異なった TRP チャンネルを発現していることが明らかとなった。近年、別の研究グループから、TRPV2が腸管の筋間神経叢のニューロンに発現し、NOを介した腸管運動抑制に関わっていること²¹⁾が報告された。一方、消化管のEC細胞にはTRPA1が発現し、セロトニンの分泌を調節していることも示されていることから²²⁾、TRPチャンネルは全体として消化管機能に重要な役割を演じていることが予想される。今後さらに詳細な解析がなされ、TRPチャンネルの消化管における役割や疾患との関連についての理解が深まることが期待される。

文 献

- 1) Furness JB, Kunze WA, Bertrand PP, et al.: Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol.*, 54: 1-18, 1998. Review.
- 2) Raybould HE.: Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. *Auton Neurosci.*, 153: 41-46, 2010. Review.
- 3) Arai T, Kino I.: Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa. Comparison between the proximal and the distal large intestine. *Acta Pathol Jpn.*, 38: 725-730, 1989.
- 4) Lee H, Caterina MJ.: TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflugers Arch.*, 451: 160-167, 2005. Review.
- 5) Tominaga M.: Capsaicin receptor TRPV1. *Brain Nerve.*, 60: 493-501, 2008. Review.
- 6) Xu H, Delling M, Jun JC, et al.: Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.*, 9: 628-635, 2006.
- 7) Ueda T, Yamada T, Ugawa S, et al.: TRPV3, a thermosensitive channel is expressed in mouse distal colon epithelium. *Biochem Biophys Res Commun.*, 383: 130-134, 2009.
- 8) Ueda T, Shikano M, Kamiya T, et al.: The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 301: G138-147, 2011.
- 9) Shikano M, Ueda T, Kamiya T, et al.: Acid inhibits TRPV4-mediated Ca²⁺ influx in mouse esophageal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil.*, 23: 1020-1028 e497, 2011.
- 10) Kestler C, Neuhuber WL, Raab M.: Distribution of P2X(3) receptor immunoreactivity in myenteric ganglia of the mouse esophagus. *Histochem Cell Biol.*, 131: 13-27, 2009.
- 11) McIlwrath SL, Davis BM, Bielefeldt K.: Deletion of P2X3 receptors blunts gastro-oesophageal sensation in mice. *Neurogastroenterol Motil.*, 21: 890-e66, 2009.
- 12) Kerstan D, Gordjani N, Nitschke R, et al.: Luminal ATP induces K⁺ secretion via a P2Y2 receptor in rat distal colonic mucosa. *Pflugers Arch.*, 436: 712-716, 1998.
- 13) Matos JE, Sorensen MV, Geyti CS, et al.: Distal colonic Na(+) absorption inhibited by luminal P2Y(2) receptors. *Pflugers Arch.*, 454: 977-987, 2007.
- 14) Yamada T, Ueda T, Ugawa S, et al.: Functional expression of transient receptor potential vanilloid3 (TRPV3) in corneal epithelial cells: involvement in thermosensation and wound healing. *Exp Eye Res.*, 90: 121-129, 2010.
- 15) Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, et al.: Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med.*, 13: 913-919, 2007.
- 16) Atarashi K, Nishimura J, Shima T, et al.: ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature.*, 455: 808-812, 2008.
- 17) Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, et al.: Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol.*, 126: 2664-2672, 2006.

- 18) Yoshioka T, Imura K, Asakawa M, et al.: Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice. *J Invest Dermatol.*, 129: 714-722, 2009.
- 19) Mandadi S, Sokabe T, Shibasaki K, et al.: TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflugers Arch.*, 458: 1093-1102, 2009.
- 20) Wynn G, Burnstock G. : Adenosine 5' - triphosphate and its relationship with other mediators that activate pelvic nerve afferent neurons in the rat colorectum. *Purinergic Signal.*, 2: 517-526, 2006.
- 21) Mihara H, Boudaka A, Shibasaki K, et al.: Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through nitric oxide production in mice. *J Neurosci.*, 30: 16536-16544, 2010.
- 22) Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, et al.: TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 106: 3408-3413, 2009.