

氏名 すずき のぶひろ  
**鈴木 庸弘**

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 124 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Activated protease-activated receptor-2 up-regulates the  
sensitivity of transient receptor potential vanilloid 4  
function in mouse esophagus**  
**(PAR-2 による食道上皮 TRPV4 感受性の亢進-膵酵素逆流による  
GERD 症状-)**

論文審査委員

(主査)	教授	嶋田 豊
(副査)	教授	服部 裕一
(副査)	教授	稲寺 秀邦
(副査)	教授	木村 友厚
(指導教員)	教授	杉山 敏郎

## 論文内容の要旨

### [目的]

胃食道逆流症(GERD)は胃内容物の食道への逆流によって不快な症状が生じる疾患である。GERDの中でも非びらん性GERD(NERD)は酸分泌抑制薬の奏効率が50%と低く、その病態には膵十二指腸液の逆流の存在や伸展などの機械刺激に対する過敏性が報告されている。Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)は機械刺激によって活性化する陽イオンチャンネルで、伸展刺激によって活性化し、Ca<sup>2+</sup>を細胞内へ流入させ、細胞からATPのエクソサイトシスを引き起こすことが膀胱上皮細胞で報告されている。上皮下にはATP受容体をもつ求心性神経が存在しており、ATPは機械刺激受容と神経伝達の仲介役として働く。さらにGタンパク質共役型受容体Protease-activated receptor-2 (PAR-2)は膵十二指腸液に含まれる膵酵素のトリプシンなどのプロテアーゼによって活性化し、TRPV4のセリン残基をリン酸化させ、TRPV4の感受性を亢進させることが神経細胞で報告されている。今回、我々は食道上皮細胞においてPAR-2およびTRPV4が発現していて、トリプシンの逆流によりPAR-2が活性化することでTRPV4の感受性を亢進させるのではないかと仮説を立て、これを検討した。

### [方法]

6-8週令の雄マウス(C57BL/6NCr SLC)(WT)およびTRPV4ノックアウトマウス(TRPV4KO)の食道上皮細胞を初代培養した。

1. TRPV4およびPAR-2の発現をRT-PCR法、免疫染色、ウェスタンブロットにて解析した。

2. TRPV4 の機能評価として  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入量を Fra-2 蛍光を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  imaging 法で計測した。また、細胞からの ATP 放出量を luciferin- luciferase 反応を用いて測定した。
3. PAR-2 活性化による TRPV4 のセリン残基のリン酸化を免疫沈降法にて解析した。

#### [結果]

1. RT-PCR 法にて WT の食道上皮細胞に TRPV4 および PAR-2 の mRNA の発現が認められた。また、免疫染色およびウエスタンブロットにて同一細胞に TRPV4 および PAR-2 の蛋白の発現が確認された。TRPV4KO の食道上皮細胞では TRPV4 の蛋白発現は消失していたが、PAR-2 の発現は認められた。
2. シリコンチャンバーに培養した WT の食道上皮細胞を伸展すると TRPV4KO と比較して有意に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入量が増加した。また、WT では伸展することで ATP の放出量が増加した。
3. WT の食道上皮細胞では、PAR-2 活性化ペプチドまたはトリプシンを前処置した後に微量の TRPV4 アゴニストを投与すると、同量の TRPV4 アゴニスト単独投与と比較して、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入が有意に増加した。TRPV4KO では PAR-2 活性化ペプチドを前処置した後に TRPV4 アゴニストを投与しても  $\text{Ca}^{2+}$  の流入の増加は認められなかった。
4. WT の食道上皮細胞では、PAR-2 活性化ペプチドまたはトリプシンを前処置した後に微量の TRPV4 アゴニストを投与することより、同量の TRPV4 アゴニスト単独投与と比較して、ATP の放出量が有意に増加することが確認された。
5. PAR-2 活性化ペプチドの投与により TRPV4 のセリン残基のリン酸化が確認された。この反応は protein kinase C(PKC)阻害剤によって阻害された。また、siRNA にて PAR-2 をノックダウンするとトリプシンによる TRPV4 のセリン残基のリン酸化が消失した。

## [考察]

今回の検討からマウスの食道上皮細胞に TRPV4 および PAR-2 の発現が確認された。また、食道上皮細胞においてトリプシンにより PAR-2 が活性化すると、PKC を介して TRPV4 のセリン残基がリン酸化され、TRPV4 への微量な刺激に対して ATP の放出量が増加することが確認された。食道上皮下の迷走神経終末には ATP 受容体が存在し、ATP は機械刺激と迷走神経伝達の仲介役として機能しているとされている。本検討から、食道上皮細胞から放出された ATP の増加は食道の機械刺激に対する異常感覚として伝達されるのではないかと推測される。

トリプシンが食道に逆流し、PAR-2 が活性化することで TRPV4 の感受性が亢進するという一連の反応は、GERD の病態、特に NERD の食道の過敏性に関与していることが示唆された。

## 学位論文審査の要旨

### 【目的】

胃食道逆流症(GERD)は、胃内容物の食道への逆流によって不快な症状が生ずる疾患である。GERDの中でも非びらん性GERD(NERD)は酸分泌抑制薬の奏効率が50%と低く、その病態には膵十二指腸液の逆流の存在や伸展などの機械刺激に対する過敏性が報告されている。一方、一過性受容器電位V型(transient receptor potential vanilloid; TRPV)の一つTRPV4は機械刺激によって活性化する陽イオンチャンネルで、伸展刺激によって活性化し、Ca<sup>2+</sup>を細胞内へ流入させ、細胞からATPのエクソサイトシスを引き起こすことが膀胱上皮細胞で報告されている。上皮下にはATP受容体をもつ求心性神経が存在しており、ATPは機械刺激受容と神経伝達の仲介役として働くと考えられている。さらにGタンパク質共役型受容体protease-activated receptor-2 (PAR-2)は膵十二指腸液に含まれる膵酵素のトリプシンなどのプロテアーゼによって活性化し、TRPV4のセリン残基をリン酸化させ、TRPV4の感受性を亢進させることが神経細胞で報告されている。

そこで、鈴木庸弘氏は、食道上皮細胞においてPAR-2およびTRPV4が発現しており、トリプシンの逆流によりPAR-2が活性化することでTRPV4の感受性を亢進させるのではないかと仮説を立て、これを検証すべく研究を行った。

### 【方法】

6-8週齢の雄性マウス(C57BL/6NCrSLC)(WT)およびTRPV4ノックアウトマウス(TRPV4KO)の食道上皮細胞を初代培養した。

1. TRPV4およびPAR-2の発現をRT-PCR法、免疫染色、ウェスタンブロットにて解析した。

2. TRPV4 の機能評価として  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入量を, Fura-2 蛍光を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  imaging 法で測定した。また, 細胞からの ATP 放出量を luciferin-luciferase 反応を用いて測定した。

3. PAR-2 活性化による TRPV4 のセリン残基のリン酸化を免疫沈降法にて解析した。

## 【結果】

1. RT-PCR 法にて WT の食道上皮細胞に TRPV4 および PAR-2 の mRNA の発現が認められた。また, 免疫染色およびウェスタンブロットにて同細胞に TRPV4 および PAR-2 のタンパク発現が確認された。TRPV4KO の食道上皮細胞では TRPV4 のタンパク発現はみられなかったが, PAR-2 発現は認められた。

2. シリコンチャンバーに培養した WT の食道上皮細胞を伸展すると TRPV4KO と比較して有意に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入量が増加した。また, WT では伸展することで ATP の放出量の増加が確認された。

3. WT の食道上皮細胞では, PAR-2 活性化ペプチドまたはトリプシンを前処置した後に微量の TRPV4 アゴニストを投与すると, 同量の TRPV4 アゴニスト単独投与と比較して,  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が有意に増加した。TRPV4KO では PAR-2 活性化ペプチドを前処置した後に TRPV4 アゴニストを投与しても  $\text{Ca}^{2+}$  の流入の増加は認められなかった。

4. WT の食道上皮細胞では, PAR-2 活性化ペプチドまたはトリプシンを前処置した後に微量の TRPV4 アゴニストを投与することにより, 同量の TRPV4 アゴニスト単独投与と比較して, ATP の放出量が有意に増加することが確認された。

5. PAR-2 活性化ペプチドの投与により TRPV4 のセリン残基のリン酸化が確認された。この反応は protein kinase C(PKC)阻害剤によって阻害された。また, siRNA にて PAR-2 をノックダウンするとトリプシンによる TRPV4 のセリン残基のリン酸化が消失した。

## 【総括】

鈴木氏は本研究によって、マウスの食道上皮細胞に TRPV4 および PAR-2 が発現すること、また、食道上皮細胞においてトリプシンにより PAR-2 が活性化すると PKC を介して TRPV4 のセリン残基がリン酸化され TRPV4 への微量な刺激に応じて ATP の放出量が増加することを明らかにした。

食道上皮下の迷走神経終末には ATP 受容体が存在し、ATP は機械刺激と迷走神経伝達の仲介役として機能するとされている。従って、トリプシンが食道に逆流し PAR-2 が活性化することで TRPV4 の感受性が亢進し食道上皮細胞から放出される ATP が増加するという一連の反応が、食道の機械刺激に対する異常感覚として伝達され、GERD の病態、とりわけ NERD の食道の過敏性に関与する可能性が推測される。

本研究は、GERD(特に NERD)の病態における膵酵素トリプシンの関与の可能性を示唆した点において新規性に優れており、医学における学術的意義も大きく、さらには、今後 PAR-2 や TRPV4 を標的とした GERD(NERD)の新規治療法の開発にも繋がる点が高く評価される。よって、本審査委員会は本論文を博士(医学)の学位に十分値するものと判定した。