

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月 1日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580334

研究課題名（和文） 消化管筋線維芽細胞プロテアーゼ活性化受容体の炎症性刺激による発現調節機構

研究課題名（英文） The expression mechanism of protease activated receptors with inflammatory stimulations in intestinal myofibroblasts.

研究代表者

佐藤 晃一 (SATO KOICHI)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90205914

研究成果の概要（和文）：消化管筋線維芽細胞の線維化過程における PAR (protease activated receptor) の役割は明らかとされていない。そこで、本研究では、消化管筋線維芽細胞における PAR の役割と発現調節機構を明らかにすることを目的とした。その結果、炎症性刺激による細胞に発現する PAR 絶対量の時間的変化は認められなかったが、炎症と深く関与する生理活性物質 PGE2 により、細胞膜から細胞質内への空間的変化が観察された。

研究成果の概要（英文）：The roles of PAR (protease activated receptor) in the intestinal myofibroblast do not fully understand. So, we designed this project to clarify the role of PAR and the control mechanisms of the expression of PAR in intestinal myofibroblasts. We found that the expression level of PAR in the whole cell by the stimulation with cytokines was not changed, but PAR was moved from membrane to cytosolic area. We also found that prostaglandin E2-induced cAMP is contributed in this mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：筋線維芽細胞, IMF, SmcMF, LmcMF, プロテアーゼ活性化受容体

1. 研究開始当初の背景：

プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) は、PAR1～4 のサブタイプが報告されている。トロンビンにより活性化される PAR1, 3 および 4 は血小板凝集反応に関わる受容体であり、PAR2 はマスト細胞トリプターゼ、血管凝固因子、トリプシンなどにより活性化される。PAR は神経系、消化器系、循環器系など様々な組織

に分布しており、病態生理における役割の重要性が認識されている。PAR は切断型の受容体であり (図 1)、再活性化には受容体の再発現が必要であるため、PAR 活性化後の受容体脱感作・エンドサイトーシス・アップレギュレーションといった一連の反応が、PAR 発現量を調節している。一方、クローン病等の炎症性腸疾患においては多くの患者で消化管

線維化がみられ、消化管狭窄や腸閉塞を併発するが現在のところ有効な治療法はない。消化管粘膜上皮下に発現する筋線維芽細胞は、細胞外基質を産生し粘膜上皮細胞の分化増殖の足場となるだけでなく、粘膜の微小領域傷害の防御機構の役目を果たしているが、腸炎発症時には、この筋線維芽細胞が活性化され、増殖して線維化を起こすことで消化管狭窄や閉塞をおこすと考えられている。PARの活性化は線維芽細胞の増殖を誘発し線維性疾患に関与する可能性が報告されている。このようにPARは、病態生理における重要性ならびに受容体活性化様式の特異性から、国内外を問わずその病態生理的機能に関し多くの研究がなされているが、消化管筋線維芽細胞におけるPAR受容体の発現調節機構について、炎症性疾患の観点から詳細に研究した報告はない。

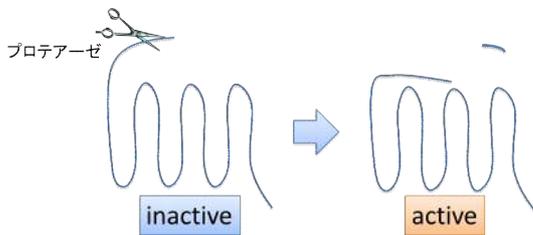


図1. プロテアーゼによるPARの活性化様式
PARはプロテアーゼにより受容体の一部が切断されることで活性化を受ける。

2. 研究の目的：

PARは、トロンビンやトリプシンなどのプロテアーゼによってN末の数個のアミノ酸が切り取られ、これによって受容体自身が持つリガンド部位が露出し、受容体自らのリガンド結合部位に結合して受容体が活性化するという特殊な機能タンパク質である。一方、消化管筋線維芽細胞は、粘膜上皮直下に存在し、粘膜上皮細胞の分化増殖の足場になるとともに、粘膜の機械的損傷に対する防御の役目を果たす。炎症時には消化管筋線維芽細胞は活性化され増殖することにより線維化を起こすが、この線維化の過程におけるPARの役割は明らかとされていない。本研究では、消化管筋線維芽細胞におけるPARの役割と発現調節機構を明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法：

本研究では、炎症による線維性疾患の発症機構と新たな治療法開発の基盤研究として、組織線維化におけるPARの役割ならびに発現調節機構を分子レベルで解明することにある。この最終目標のため、下記の具体的な目的に従って実験を行う。炎症性刺激による筋線維芽細胞のPAR発現の時間的・空間的変化

とその機構を明らかにする。線維芽細胞のPAR活性化によるPAR発現自己調節機構を解明する。常在型マクロファージのPAR刺激を介する筋線維芽細胞活性化機構を明らかにする。実験ではラットまたはマウス消化管の培養筋線維芽細胞を用い、共焦点顕微鏡、フローサイトメトリーおよびウェスタンブロットングの手法を用いて研究を進める。筋線維芽細胞の活性化は、炎症性サイトカインおよび選択的PAR作動薬を使用する。また、筋線維芽細胞活性化の指標として、細胞増殖活性、細胞遊走能、ERK1/2やp38などのMAPキナーゼ活性化を指標として検討する。さらに、実験効率を上げるために、消化管筋線維芽細胞の株化細胞を樹立する。

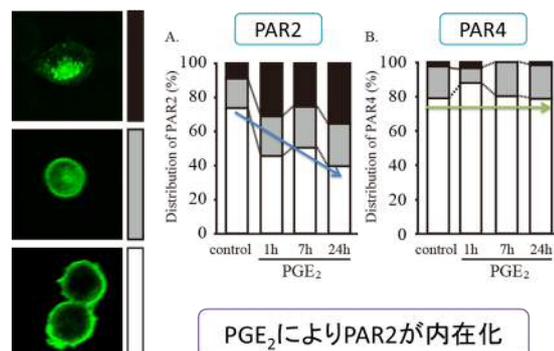
4. 研究成果：

(1) 炎症性刺激によるPAR発現の時間的変化

炎症に伴い増加するprostaglandin E2の処置により、PAR2のタンパク質発現量をwestern blotting方により検討したが、PAR2発現量の変化は認められなかった。

(2) 炎症性刺激によるPAR発現の空間的変化

炎症に伴い増加するprostaglandin E2の処置により、PAR2の細胞内局在を、Flag-PAR2-HAを導入した細胞を用いて検討したところ、PGE2の刺激時間に応じて、細胞膜のPAR2発現量が減少し細胞内発現量が増加した。この結果より、PGE2によりPAR2がinternalization起こすことが示唆された(図2)。また、これはEP2またはEP4受容体の活性化を介するcAMP増加により起こるこ



とが示唆された。

図2. PGE2は細胞表面PAR2発現量を低下させる

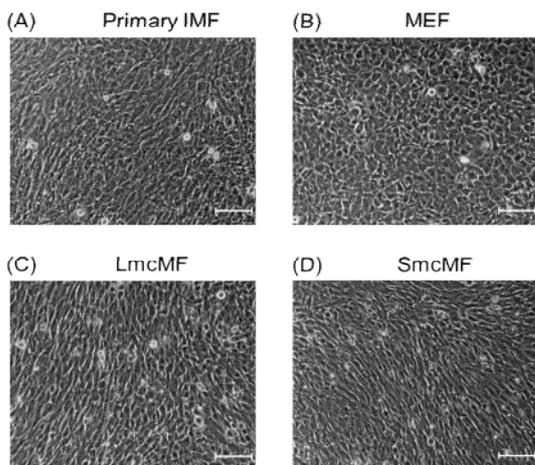
図左:PGE2刺激によるPAR内在化の様子。PGE2により内在化するPAR2の割合が増加するが(A), PAR4は変化しない(B)

(3) 消化管筋線維芽細胞の機能に関する研究

消化管筋線維芽細胞に対する PAR2 発現とその活性化の影響はこれまで検討されていなかった。我々は、単離初代培養筋線維芽細胞標本を用いてこの点について検討し、PAR1, 2, 3, 4 が発現していること、また、PAR2 刺激によりこの遊走能が活性化されることを見出した。また、筋線維芽細胞の病態生理機能解析のために、スフィンゴシンによる遊走能変化についても検討し、スフィンゴシン受容体 2 を介して遊走能が抑制されていることを明らかとした。

(4) 不死化筋線維芽細胞株の作成

消化管筋線維芽細胞を用いた研究の発展を妨げてきた主要因の一つに、株化消化管筋線維芽細胞やその特異的抗体が存在しないことが考えられる。そこで申請者は、ウイルスベクターを用いて不死化した消化管筋線維芽細胞 (LmcMF) と自然発生的不死化消化管筋線維芽細胞 (SmcMF) の 2 種類の株化細胞をマウス結腸より樹立し (図 3)、単離消化管筋線維芽細胞 (Primary IMF) と細胞性状を検討した。その結果、 α -SMA 等のタンパク質発現、LPS に対する反応性などにおいて、3 種の細胞で違いは認められず、株化細胞の性



状が等しいことを明らかとした。

図 3. 各種細胞の形態学的検討

単離消化管筋線維芽細胞 (A:PrimaryIMF) と株化筋線維芽細胞 (C:LmcMF, D:SmcMF) および胎児由来線維芽細胞 (D:MEF) の形態比較により、株化筋線維芽細胞は Primary IMF と同一形態を示すことが明らかとなった。

(5) 消化管筋線維芽細胞の PAR を介する情報伝達系に関する研究

IMF および LmcMF と SmcMF を用いて、PAR 受容体サブタイプの発現を遺伝子レベルで検討した。その結果、いずれの細胞も PAR1, 2, 3, 4 が発現していることが明らかとなった。また、PAR 刺激により遊走能が活性化

され、その刺激は PAR1 と 4 を介した Rac 系に依存しており、PAR2 刺激では遊走が起こらないことを明らかとした。また、PAR1 と 4 の活性化により、p38 や ERK 等の MAP キナーゼ系が活性化されることも明らかとした。

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 3 件)

①Komatsu H, Enjouji S, Ito A, Ohama T, Sato K., Prostaglandin E2 inhibits proteinase-activated receptor 2-signal transduction through regulation of receptor internalization. J Vet Med Sci, 2013. 75(3): 255-261. 査読あり

②Kawasaki H, Ohama T, Hori M, Sato K., Establishment of Mouse Intestinal Myofibroblast Cell Lines. World J Gastroenterol. 2013, 2013 May 7;19(17):2629-37. 査読あり

③Komatsu, H., A. Shimose, T. Shimizu, Y. Mukai, J. Kobayashi, T. Ohama, and K. Sato, Trypsin inhibits lipopolysaccharide signaling in macrophages via toll-like receptor 4 accessory molecules. Life Sci, 2012. 91(3-4): p. 143-50. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

①小松浩之、円城寺秀平、大浜剛、佐藤晃一：PGE2 は PAR2 の内在化により PAR2 機能を阻害する：第 65 回日本薬理学会西南部会：2012. 11. 23：熊本大学 (熊本)

②川崎 秀吉、大浜 剛、佐藤 晃一：マウス結腸筋線維芽細胞株の樹立とその有用性に関する検討：第 154 回日本獣医学会学術集会：2012. 9. 16：岩手大学 (岩手)

③小松浩之、円城寺秀平、大浜剛、佐藤晃一：Trypsin は CD14 の分解を介してマクロファージにおける LPS シグナルを阻害する：第 64 回日本薬理学会西南部会：2011. 11. 20：KKR 博多 (福岡)

④川崎 秀吉、大浜 剛、佐藤 晃一：マウス結腸筋線維芽細胞の遊走に対する Sphingosine-1-Phosphate の影響：第 152 回日本獣医学会学術集会：2011. 9. 20：大阪府立大学 (大阪)

[その他]

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vetpharm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 晃一 (SATO KOICHI)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90205914

(2) 研究分担者

大浜 剛 (OHAMA TAKASHI)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：50579018

(3) 連携研究者

()

研究者番号：