

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860553

研究課題名(和文) 消化管狭窄におけるNox4由来活性酸素シグナルによる線維化機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) The mechanisms of intestinal fibrosis and strictures associated with upregulation of NADPH oxidase 4 and reactive oxygen species

研究代表者

井上 健 (Inoue, Ken)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：10613945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス大腸から単離した筋線維芽細胞と当教室にて管理しているマウス腸管筋繊維芽細胞(LmcMF、SmcMF)において、TGF $\beta$ 1を介したシグナルにより、Nox4とcollagen 1の発現が亢進することを確認した。TGF $\beta$ 1レセプター阻害剤、Nox4のsiRNAを用いることによって、Nox4とcollagen 1の発現が抑制されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In mouse myofibroblast isolated from (C57BL/6), LmcMF and SmcMF, TGF $\beta$ 1 administration induced higher expression of Nox4 and pro-collagen 1. Pretreatment of these cells with TGF $\beta$ 1 inhibitor and Nox4 siRNA significantly inhibited pro-collagen 1 expression.

研究分野：消化器内科

キーワード：消化管線維化 消化管狭窄 筋繊維芽細胞 Nox4

## 1. 研究開始当初の背景

(1)近年、患者数増加の著しい難治性・再発性炎症性腸疾患であるクローン病では、その臨床経過において、その3分の1以上が腸管に線維性狭窄を来していると報告されている(Curr Drug Targets. 2010, 11:242-8)。腸管の線維性狭窄は通過障害を来し、頻回の外科的治療を要することが多く、クローン病患者のQOL低下の一因となっている。内科的治療としては、従来より5-アミノサリチル酸製剤、ステロイド製剤、免疫抑制剤が使用されているが、これらの薬剤は一定の抗炎症作用を示すものの、腸管狭窄に対しての効果は明らかではない。また、強力な抗炎症作用を示す抗腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )抗体製剤がクローン病治療に汎用されており、早期のクローン病患者の線維化を抑制すると報告されている(Digestion. 2007, 75:22-4)。しかし、その効果は抗炎症作用に基づいていることが示唆されており、間接的な線維化抑制効果にとどまる。消化管の線維性狭窄については、外科的治療以外には未だ適切な治療法は存在していない。したがって、クローン病をはじめとする消化管線維化病態の制御は、重要な研究課題であると考えられた。

(2) 最近の基礎的検討を通じて、組織の線維化の過程では TGF (Transforming growth factor)  $\beta$ 、筋線維芽細胞、HSP47(Heat shock protein 47)、Nox (NADPH oxidase)などが重要な役割を果たしていると考えられている。こうした観点から、申請者らはラット腸炎モデルにおける消化管線維化病態に筋線維芽細胞が中心的な役割を果たしており、同細胞に局在する HSP47 を介した経路で線維化を促進し、日本の伝統的な漢方薬である大建中湯が腸管の線維化を抑制することを見いだした(Inoue et al. Biol Pharm Bull. 2011, 34:1659-65)。また、強皮症、腎線維症、間質性肺炎などの線維化を来す疾患に臨床応用されている Pirfenidone も同様に腸管の線維化を抑制することを明らかにしてきた。

(3) さらなる検討で、マウスの腸管筋線維芽細胞において TGF  $\beta$  の刺激により Nox4 の発現が増強するという結果を得た。また、Nox4 の活性化を通じ活性酸素種が生成され、筋線維芽細胞が collagen I の産生を促進するというデータを得つつある。Nox4 は様々な細胞に発現しており、種々の酸化ストレス反応に関わっていると考えられ、近年、注目を集めている。また、肺、腎での線維化においては、筋線維芽細胞における Nox4 を介した活性酸素シグナルが重要な役割を果たしていると報告されている(Nature Medicine. 2009, 15:1077-81)。これらのことから、Nox4 を介した活性酸素シグナルを治療標的分子とした腸管線維化制御の治療戦略は合理的な研究課題と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、腸管筋線維芽細胞における Nox4 を介した活性酸素シグナルを中心とした線維化に関わる分子機構の詳細を明らかにし、消化管の線維性狭窄に対する治療への新規応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、腸管線維化が生じる機序を、マウス腸管から単離した筋線維芽細胞、また山口大学共同獣医学部獣医薬理学教室、大浜剛先生、佐藤晃一先生から供与していただき当教室にて管理している LmcMF と SmcMF における collagen I 産生の経路を調べることによって解析した。

(1) TGF  $\beta$  の刺激により collagen I の発現が上昇していることを明らかにする。TGF  $\beta$  での刺激により、collagen I の発現が増強していることを western blotting にて確認した。また、シリウスレッド染色にても同様に collagen I の発現増強を確認した。

(2) TGF  $\beta$  の刺激により Nox4、活性酸素種の発現が上昇していることを明らかにする。TGF  $\beta$  での刺激により、Nox4 が発現していることを real-time PCR にて確認した。活性酸素種の産生は、レドックスセンサーを用い評価する。

(3) TGF  $\beta$  の刺激により Nox4 の発現が上昇する経路を明らかにする。Smad3 のリン酸化を促し、Nox4 の活性化を促進すると考えられている。Western blotting で、Smad3 のリン酸化を評価した。また Smad3 のリン酸化を阻害する SIS3 を用い、Nox4 の発現が抑制されることを確認する。

(4) Nox4 を介して、collagen I の発現が上昇する経路を明らかにする。Nox の阻害剤である DPI、そして NOX4 の siRNA を用い Nox4 の発現を抑制し、またカタラーゼ、マンガン SOD の抗酸化剤を用い、活性酸素種的作用を抑制した。これらにより collagen I の発現が抑制されることを western blotting、シリウスレッド染色にて確認した。

## 4. 研究成果

8 週齢雄性 C57BL/6 マウスを用いて、大腸から筋線維芽細胞を単離した(Am J Physiol. 1997, 273;G1341-8)。Collagenase (type I) と Dispase を用いて、上記マウスの大腸から筋線維芽細胞を単離した。単離した細胞において、免疫染色を施行し、SMA と Vimentin の発現を確認した。また LmcMF と SmcMF においても同様に免疫染色を施行し、SMA と Vimentin の発現を確認した。以上より、上記 3 種類の細胞は、筋線維芽細胞としての性質を備えており、以降の実験における解析に用いることが可能であると考えられた。

(1)上記細胞を  $3 \times 10^5$  個/well にて播種した。メディウムとして Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (FBS 含有)を用いた。約 24 時間後に subconfluent の状態となった。FBS を含有しないメディウムへ交換し、6 時間経過後、TGF (1,2,5,10,20ng/ml) を投与した。48 時間後、細胞を回収した。collagen I の発現の増強を western blotting にて確認することができた。また、シリウスレッド染色にて、TGF 投与の 48 時間後に、collagen の発現が有意に上昇していることを確認した(図 1)。筋繊維芽細胞においては、TGF による刺激にて collagen I の産生が行われることが示唆された。

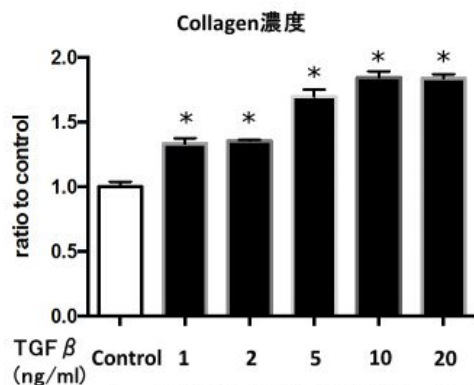


図1、TGFβにて筋繊維芽細胞を刺激すると、濃度依存的にCollagenの濃度が上昇する。\*  $p < 0.05$

(2)(1)と同様のプロトコールにて、Nox4 の発現を real-time PCR にて評価した。TGF 10ng/ml、50ng/ml の投与にて、Nox4 の発現が有意に上昇していた(図 2)。他の Nox family に関しては、有意な上昇は認められなかった。活性酸素種の産生は今後の検討課題とした。筋繊維芽細胞において、TGF による刺激にて Nox4 の発現が増強していた。

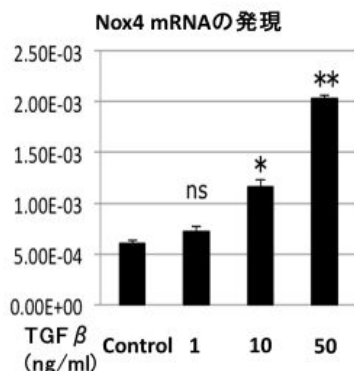


図2、TGFβにて筋繊維芽細胞を刺激すると、濃度依存的にNox4の発現が増強する。\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

(3)上記細胞を  $3 \times 10^5$  個/well にて播種した。メディウムとして DMEM (FBS 含有)を用いた。約 24 時間後に subconfluent の状態となった。FBS を含有しないメディウムへ交換し、6 時

間経過後、TGF (10ng/ml)を投与した。TGF 投与、5分、15分、30分、60分後に Smad2/3 のリン酸化を western blotting にて評価した。15分、30分にて Smad2/3 のリン酸化の増強を認めた。60分では増強は認められなかった。筋繊維芽細胞において、TGF による刺激にて、刺激後、15分から30分にて Smad2/3 のリン酸化が確認できた。

(4)上記細胞を  $3 \times 10^5$  個/well にて播種した。メディウムとして DMEM (FBS 含有)を用いた。約 24 時間後に subconfluent の状態となった。FBS を含有しないメディウムへ交換し、同時に Nox4 siRNA を投与した。24 時間後、TGF (10ng/ml)を投与した。Nox4 siRNA を投与から 48 時間後にシリウスレッド染色にて collagen I 発現の評価を行った。TGF 投与のみの群においては、collagen I の発現が有意に増強していた。TGF、Nox4 siRNA 投与の群においては、collagen I の発現増強が抑制されていた(図 3)。筋繊維芽細胞において、Nox4 を介して、collagen I の発現が上昇する可能性が示唆された。

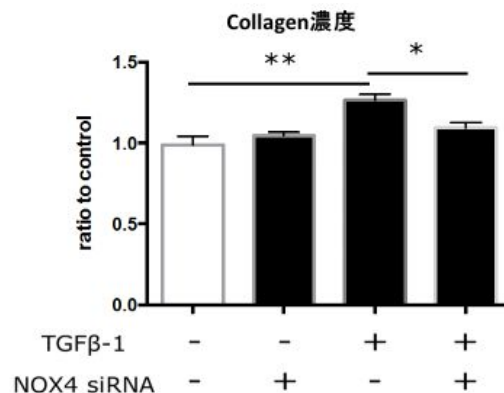


図3、Nox4のsiRNAにて、TGFβによる筋繊維芽細胞からのコラーゲン発現が抑制される。\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

以上の結果より、マウスの腸管筋繊維芽細胞においては、TGF を投与すると、Nox4 を介したシグナルにより collagen I の発現が増強する可能性が示唆された。本研究の課題として、活性酸素種の産生を検出することができなかったこと、Smad2/3 のリン酸化は検出できたが、リン酸化阻害薬を用いた評価を行っていないこと、Nox 阻害薬である DPI を用いた評価を行っていないこと、カタラーゼ、マンガン SOD の抗酸化剤を用いた評価を行っていないことがある。上記の課題があるものの、今後、*in vivo* におけるモデルでの分子標的治療実験として、DPI、Nox4 の siRNA、カタラーゼ、マンガン SOD 等を投与し、Nox4 を介した活性酸素シグナル阻害効果の研究へと発展する可能性がある。

## 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)

[学会発表](計3件)

岸本俊輔、Nox4 modulates collagen production in murine colonic myofibroblasts、Society for Free Radical Research Asia, 2013年10月18日、台湾

内藤裕二、シンポジウム 「臨床現場が求める薬と企業が開発する薬の融合」筋線維芽細胞を標的にした腸管線維化を治療する薬剤の開発、第42回日本潰瘍学会、2014年11月1日：東京。

堀田祐馬、The role of NADPH oxidase (NOX) 4 expressed in pericryptal myofibroblasts for intestinal fibrosis、Digestive Disease Week 2015、2015年5月18日、Washington, DC, USA.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井上 健 (INOUE, Ken)

京都府立医科大学、消化器内科、助教

研究者番号：10613945

### (2)研究協力者

内藤裕二 (NAITO, Yuji)

京都府立医科大学、消化器内科、准教授

岸本俊輔 (KISHIMOTO, Shunsuke)

京都府立医科大学、消化器内科、大学院生

堀田祐馬 (HOTTA, Yuma)

京都府立医科大学、消化器内科、大学院生