

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08978

研究課題名(和文) TRPA1チャネルを標的とした消化管狭窄治療薬のin vivoスクリーニング

研究課題名(英文) In vivo screening for gastrointestinal stricture therapy targeting TRPA1 channel

研究代表者

倉原 琳(海琳)(Kurahara, Lin)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00341438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は様々な物理化学刺激によって活性化されるTRPA1チャネルは消化管線維化狭窄に深く関与することを見出した。TRPA1チャネルは消化管筋線維芽細胞に多く発現しており、線維化狭窄部位でHSP47と共在して増生する。培養細胞やTNBS炎症性腸疾患モデルマウスを用いた実験から、TRPA1を活性化するステロイド・ピルフェニドン・大建中湯の成分(hydroxy-sanshool や 6-shogaol)は、線維化促進因子の活性化を抑制して抗線維化作用を示した。このようにTRPA1は消化管炎症に加え、線維化に対して保護的に働くため、難治性の消化管炎症/リモデリングの新規治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the anti-fibrotic effects of TRPA1 channel agonists in intestinal myofibroblasts. In stenotic intestinal regions of CD patients, TRPA1 expression was increased significantly. TRPA1/heat shock protein 47 double-positive cells accumulated in the stenotic intestinal regions of both CD patients and TNBS-treated mice. In TNBS chronic colitis model mice, the extents of inflammation and fibrotic changes were more prominent in TRPA1<sup>-/-</sup> knockout than in wild-type mice. One-week enema administration of prednisolone suppressed fibrotic lesions in wild-type mice, but not in TRPA1 knockout mice. Steroids, pirfenidone and the active ingredients of DKT, i.e., hydroxy-sanshool and 6-shogaol activate TRPA1 channel and counteracted TGF fibrosis signaling in InMyoFibs. TRPA1, in addition to its anti-inflammatory actions, may protect against intestinal fibrosis, thus being a novel therapeutic target for highly incurable inflammatory/fibrotic disorders.

研究分野：生理学

キーワード：クローン病 線維化狭窄 筋線維芽細胞 TRPA1チャネル

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患の治療薬として、近年開発された抗 TNF- 抗体治療が炎症に対する顕著な治療効果を示すが、線維化による腸狭窄が大きな問題として残る。この消化管線維化狭窄に対する薬物治療法の開発は重要な課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は炎症部位へ分化・遊走する線維芽細胞（筋線維芽細胞）に発現する TRPA1 チャネルを標的として、線維化に関わる細胞内シグナル伝達および転写因子制御機構の解明とともに、食品成分ライブラリーを用いた in vivo スクリーニングによる消化管線維化狭窄の内科的治療法開発を目的とする。

3. 研究の方法

線維化を誘導する in-vitro モデルとして、トランスフォーミング増殖因子- 1(TGF- 1) を用いて消化管筋線維芽細胞株 (InMyoFibs) を刺激した。CRISPR/Cas9 システムを用いて Trpa1-CRISPR ノックアウトマウスを作製した。週 1 回のトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 投与を 6 週間行って、慢性炎症による消化管線維化モデルマウスを作成した。クローン病 (CD) 患者の消化管由来の組織 (非狭窄部位・狭窄部位) を用いて、mRNA 定量・タンパク定量・病理組織染色を行った。漢方薬大建中湯に含まれる TRPA1 チャネル活性化成分や大建中湯の抗線維化の効果について検討を行った。福岡県工業技術センター生物食品研究所から 103 種類の食品抽出成分を提供して頂き、その TRPA1 チャネル活性化作用や抗線維化作用についてスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) クローン病患者大腸・小腸の生検標本では、粘膜固有層の線維芽細胞・筋線維芽細胞に限局した TRPA1 チャネルの発現が見られ、線維化狭窄部位で有意に発現上昇していた。また、線維芽細胞・筋線維芽細胞に発現する HSP47 (コラーゲン産生に必要とされる分子シャペロン) のタンパクと共在して発現が増えることがわかった。

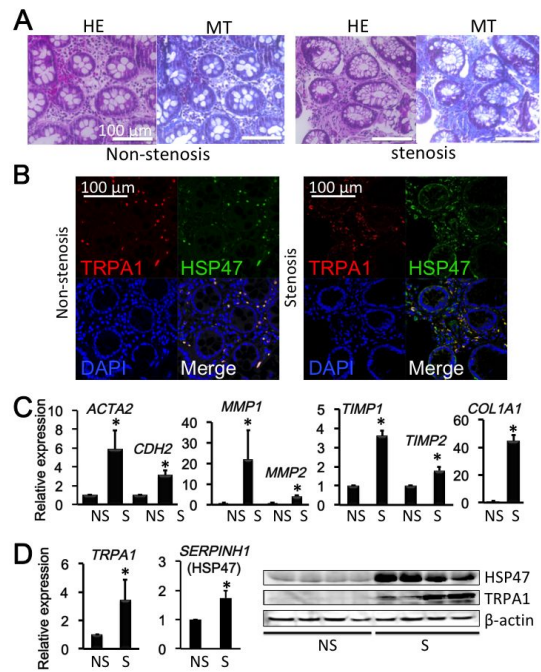
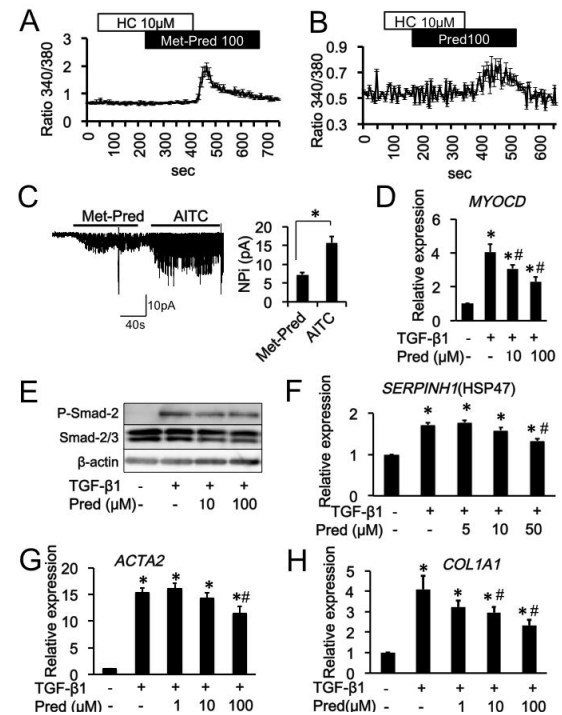
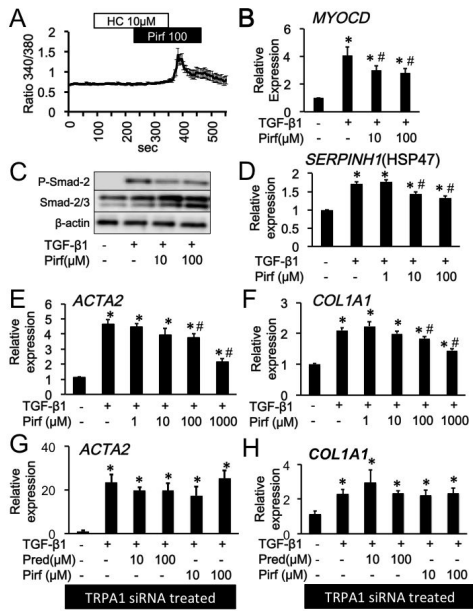
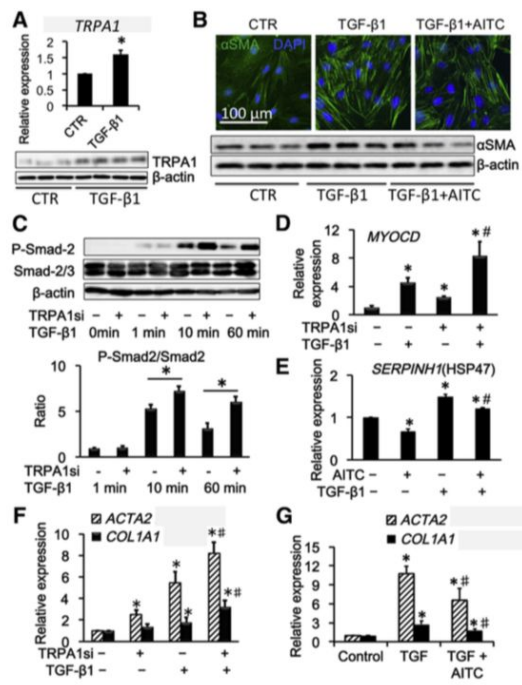


FIGURE 12  
(2) TGF- 1 で惹起した培養筋線維芽細胞における線維化マーカーの増加は、TRPA1 を活性化する AITC、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、グリチルリチン、グリチルレチン酸などのステロイド系薬物や抗線維化薬ピルフェニドンによって抑制された。





(3) 培養消化管筋線維芽細胞を siRNA 処置で TRPA1 の発現を抑制すると、TGF- $\beta$ 1 受容体下流の線維化シグナルが増強した。



(4) TRPA1<sup>-/-</sup>-マウスでは、WT マウスに比し、TNBS 投与によってより多くの炎症細胞の粘膜下層浸潤や局所的な単核球の集簇を認めた。WT マウスの TNBS 投与群では、膠原線維が粘膜固有層に増生しているのに対し、TRPA1<sup>-/-</sup>の TNBS 投与群では粘膜固有層や粘膜下層まで広く膠原線維が増生していた。

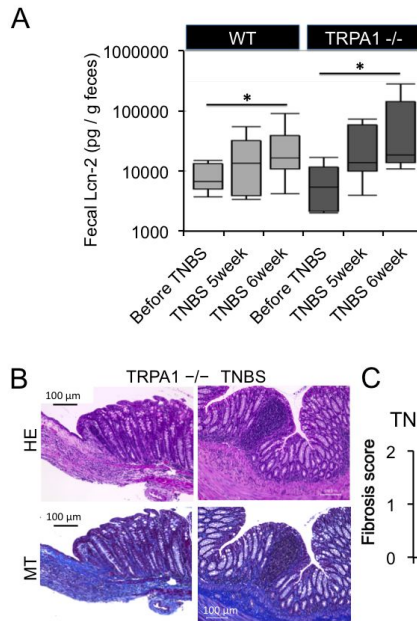
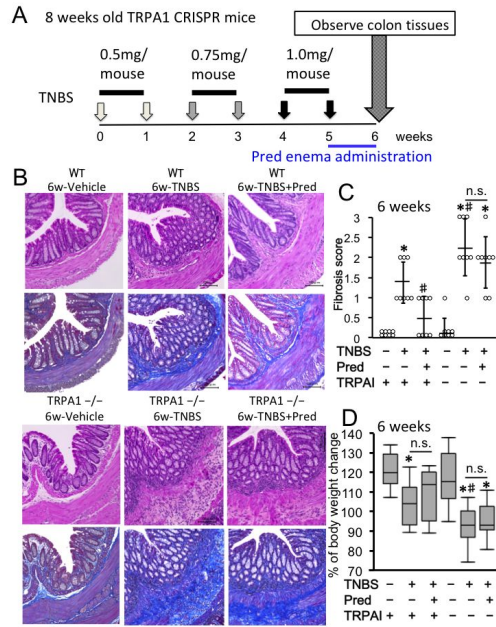
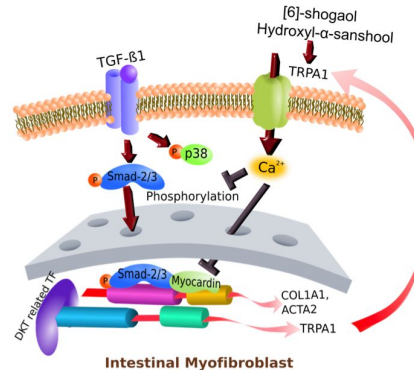


FIGURE 6

(5) 消化器分野で広く使用されている漢方薬大建中湯は、TRPA1 チャネルを活性化する成分 hydroxy -sanshool や 6-shogaol を含有し、筋線維芽細胞や TNBS モデルマウスで抗線維化作用を示した。(論文投稿中)



(6) 福岡県工業技術センター生物食品研究所から提供された食品から検出された他の TRPA1 チャンネル活性化食品成分を用いた副作用のない消化管線維化狭窄治療薬の創薬(特許出願中)が期待される。

(7) 生体内で TRPA1 チャンネルの機能は温度による調節機構のみ知られているが、ステロイドホルモンによる TRPA1 チャンネル活性化機構は重要な生理機能である可能性が高いので、今後検討を進めたい。

筋線維芽細胞 TRPA1 チャンネルの活性化は、消化管の炎症やそれに伴う線維化に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。本研究の知見はステロイドやピルフェニドンの抗線維化作用を理解する上でも重要な鍵となる可能性がある。

#### 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)

[雑誌論文](計 6 件)

Kurahara LH\*, Hiraishi K, Hu Y, Koga K, Onitsuka M, Doi M, Aoyagi K, Takedatsu H, Kojima D, Fujihara Y, Jian Y, Inoue R : Activation of myofibroblast TRPA1 by steroids and pirfenidone ameliorates fibrosis in experimental Crohn's disease model / Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2017 Dec 21;5(3):299-318. \*責任著者 [原著論文] 査読あり

土居二人、土居麻友美、倉原琳\*、井上隆司 : 月刊「臨床栄養」臨時増刊号 経腸栄養の基礎「経腸栄養と消化管免疫」2017 年 Vol.131 No.4 402-409 \*責任著者 査読なし [総説]

Hu Y, Duan Y, Takeuchi A, Kurahara HL, Ichikawa J, Hiraishi K, Numata T, Ohara H, Iribe G, Nakaya M, Mori MX, Matsuoka S, Ma G, Inoue R : Uncovering the arrhythmogenic potential of TRPM4 activation in atrial-derived HL-1 cells using novel recording and numerical approaches (Cardiovascular Research 2017 Cardiovasc Res. 2017 Aug 1;113(10):1243-1255.) [原著論文] 査読あり

Kurahara LH, Hiraishi K, Sumiyoshi M, Doi M, Hu Y, Aoyagi K, Jian Y, Inoue R : Significant contribution of TRPC6 channel-mediated Ca<sup>2+</sup> influx to the pathogenesis of Crohn's disease fibrotic stenosis (J Smooth Muscle Res. 2016; 52(0):78-92.) \*責任著者[総説]査読あり

Radosinska J, Kurahara LH, Hiraishi K, Viczenczova C, Egan Benova T, Szeiffova Bacova B, Dosenko V, Navarova J, Obsitnik B, Imanaga I, Soukup T, Tribulova N : Modulation of cardiac connexin-43 by omega-3 fatty acid ethyl-ester supplementation demonstrated in spontaneously diabetic rats (Physiological Research, 2015 (64) no. 6, pp. 795-806. ) [原著論文]査読あり

Kurahara LH\*, Sumiyoshi M, Aoyagi K, Hiraishi K, Nakajima K, Nakagawa M, Hu Y, Inoue R : Intestinal myofibroblast TRPC6 channel may contribute to stenotic fibrosis in Crohn's disease. Inflammatory Bowel Diseases, 21(3):496-506, 2015 \*責任著者 [原著論文] 査読あり

[学会発表](計 14 件)

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、土居麻友美、古賀佳織、鬼塚美樹、井上隆司 : TRPA1 チャンネルの活性化物質は消化管炎症や線維化を抑制する / 第 95 回日本生理学会大会 [シンポジウム] / 2018 年 3 月 / 高松

Kurahara H-L : Significant contribution of intestinal myofibroblast TRPA1 channel to the pathogenesis of Crohn's disease fibrotic stenosis / BIT's 2nd Annual World Congress of Digestive Disease - 2017 / 2017 年 12 月 / Fukuoka

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、古賀佳織、鬼塚美樹、竹田津英稔、小島大望、井上隆司 : 大建中湯による消化管筋線維芽細胞 TRPA1 チャンネル活性化は抗炎症・抗線維化をもたらし / 第 59 回日本平滑筋学会総会 / 2017 年 8 月 / 福岡

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、古賀佳織、鬼塚美樹、竹田津英稔、小島大望、井上隆司 : クロウン病における腸狭窄線維化の抑制機序 : 筋線維芽細胞 TRPA1 チャンネルの役割 / 生理学研究所 TRP 研究会 2017 / 2017 年 6 月 / 岡崎

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、古賀佳織、鬼塚美樹、井上隆司 : 消化管 TRPA1 チャンネルによる抗炎症・抗線維化作用 / 第 94 回日本生理学会大会 / 2017 年 3 月 / 浜松

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、井上隆司 : TRPA1 ノックアウトマウスにおける消化管炎症・線維化の亢進 / 第 67 回西日本生理学会 / 2016 年 10 月 / 鹿児島



島

Kurahara L-H : Daikenchuto (大建中湯 : DaJianZhongTang) ameliorates colitis-associated fibrosis by activating the intestinal myofibroblast TRPA1 channel. / 2016 International Conference of Physiological Sciences (ICPS) / 2016年9月 / Beijing, China

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、青柳邦彦、井上隆司 : 「大建中湯」は消化管筋線維芽細胞 TRPA1 チャネルを活性化して抗線維化作用を示す / 第 93 回日本生理学会大会 [シンポジウム] / 2016年3月 / 札幌

Kurahara-Hai L, Hiraishi K, Hu Y, Aoyagi K, Inoue R : Daikenchuto, a traditional herbal medicine, ameliorates intestinal fibrotic stenosis by activating the myofibroblast TRPA1 channel. / Biophysical Society 60th Annual Meeting / 2016年3月 / California (U.S.A.)

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、青柳邦彦、井上隆司 : 消化管筋線維芽細胞における TRPA1 チャネルを介したステロイド抗線維化作用の分子機序 / 第 68 回日本薬理学会西南部会 / 2015年11月 / 下関

倉原 琳、平石敬三、胡 耀鵬、青柳邦彦、井上隆司 : 消化管筋線維芽細胞における TRPA1 チャネルを介したステロイド抗線維化作用の分子機序 / 第 66 回西日本生理学会 / 2015年10月 / 久留米

倉原 琳、住吉美保、青柳邦彦、平石敬三、井上隆司 : クローン病線維化狭窄の病態形成における TRP チャネルの役割 / 第 57 回日本平滑筋学会総会 [白鳥常男賞受賞講演] / 2015年8月 / 山口

倉原 琳、平石敬三、青柳邦彦、井上隆司 : 消化管筋線維芽細胞 TRPA1 チャネルを介する抗線維化作用の分子機序 / 第 57 回日本平滑筋学会総会 / 2015年8月 / 山口

Kurahara-Hai L, Hiraishi K, Aoyagi K, Inoue R : Anti-fibrotic effects of Daikenchuto (TU-100) are associated with intestinal myofibroblast TRPA1 channel / 生理学研究所 国際研究集会 NIPS International Workshop

TRPs and SOCs ~Unconventional Ca<sup>2+</sup> Physiology~ / 2015年6月 / 岡崎

[図書](計 1 件)

Kurahara LH\*, Hiraishi K, Aoyagi K, Hu Y, Sumiyoshi M, Inoue R : Chapter: Intestinal Fibroblast/myofibroblast TRP Channels in Inflammatory Bowel Disease "Inflammatory Bowel Disease" ISBN 978-953-51-4726-8, 2016 published online \*責任著者 [著書]

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称:組織線維化スクリーニング方法および

抗組織線維化薬剤ならびに機能性食品

発明者:倉原 琳

権利者:倉原 琳

種類:

番号:特願 2015-229481

出願年月日:2015/11/25

国内外の別:国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://www.fukuoka-u.ac.jp/press/upload/pr20180214.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉原琳 (Kurahara Lin)

福岡大学医学部生理学・講師

研究者番号:00341438

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者

平石敬三 (HIRAISHI, Keizo)

胡耀鵬 (HU, Yaopeng)

古賀佳織 (KOGA, Kaori)

鬼塚美樹 (ONITSUKA, Miki)

土居麻友美 (DOI, Mayumi)

青柳邦彦 (AOYAGI, Kunihiko)

竹田津英稔 (TAKEDATSU, Hidetoshi)

小島大望 (KOJIMA, Daibo)

藤原祥高 (FUJIHARA, Yoshitaka)

菅昱雯 (JIAN, Yuwen)

井上隆司 (INOUE, Ryuji)