

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 4 月 24 日現在

機関番号：37111
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790677
 研究課題名（和文）筋線維芽細胞を標的とした腸管狭窄薬物治療法の開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic approaches of intestinal stenosis focused on myofibroblasts

研究代表者

倉原 琳（海 琳）(KURAHARA-HAI-LIN)
 福岡大学・医学部・講師
 研究者番号：00341438

研究成果の概要（和文）：消化管筋線維芽細胞 TRPC4, C6 チャネルは細胞の分化過程において重要な役割を果たし、消化管の線維化を促進する。更に我々の実験結果から、TRPC6 を介する Ca^{2+} 流入は Smad2, Erk1/2, そして p38 MAPK のリン酸化を調節することによってインターロイキンの産生に影響を及ぼすことも明らかになった。TRPC4 や TRPC6 は炎症性腸疾患における線維化・炎症制御の分子ターゲットである。

研究成果の概要（英文）：TRPC4 and C6 channels may play non-trivial roles in myofibroblast transformation/differentiation, thereby promoting fibrogenesis in the colon. Our results also suggested that myofibroblast signaling pathways regulating interleukin production, which seem associated with the phosphorylation of Smad2, Erk1/2, and p38 MAPK as well as TRPC6-mediated Ca^{2+} influx. TRPC4 and TRPC6 could be a promising target in treating fibrotic and inflammatory bowel diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学（小腸、大腸）、組織線維化

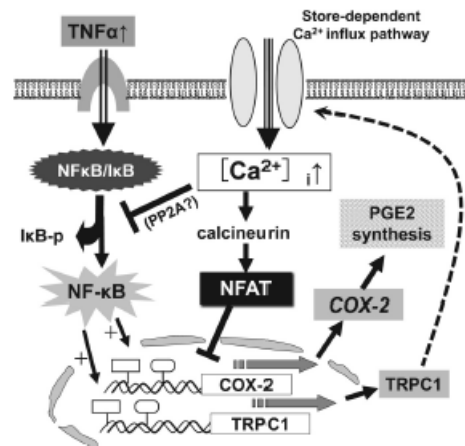
1. 研究開始当初の背景
クローン病 (CD) や潰瘍性大腸炎 (UC) などの

炎症性腸疾患 (IBD) は、自己免疫異常に起因する難治性疾患である。IBD は、若年で発症し

頑固な下痢や便秘を繰り返す経過を辿ることから、長年に亘って生活の質を劣化させる難治性の疾患として問題になっている。抗 TNF α 抗体療法は現在最も注目されている IBD の治療法であり、炎症の抑制に顕著な効果を示すが、線維化による腸狭窄が大きな問題として残る。IBD 急性期の治療は潰瘍治癒を目指しますが、慢性期には狭窄（線維化）に対する治療が必要となり、患者の QOL を低下させる大きな要因となっている。現在は外科切除か内視鏡的バルーン拡張術が主な治療法である。したがって、この線維化に対する薬物治療法の開発は重要な課題と考えられる。

筋線維芽細胞は分布する組織に関わらず、種々のサイトカイン、成長因子、ホルモン受容体を発現して、組織障害・炎症時の創傷治癒や線維化の過程に密接に関与していることが知られている。筋線維芽細胞の活性化の遷延が、心肥大・皮膚の癒痕化・肝硬変・消化管狭窄などの病的な組織リモデリングを引き起こすが、その機序は殆ど明らかでない。

一方、1993 年に同定された TRP チャネルは様々な物理化学刺激に活性化され、消化管においても TRPV1（感覚神経終末）、TRPC5（消化管平滑筋細胞）や TRPC4（カハール間質細胞）の重要性が報告されている。TRP チャネルは消化管筋線維芽細胞において 15 種類のアリソフォームの mRNA の発現が確認され、腸管炎症・線維化に関わる種々の物理化学的プロセスを説明し得る興味深い特徴を有している。我々は消化管筋線維芽細胞 TRPC1 チャネルが炎症性サイトカイン TNF α によって活性化され、TRPC1 依存性の Ca^{2+} 流入は NF- κ B の核移行を抑制し、COX-2 を介した PGE2 産生を抑える働きがあることを明らかにした。（Lin-Hai et al. / Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 301(2): G356-67）論文の概要を次図に示す。



更に我々のもう一つの研究によると、酵素的に単離したヒト子宮内膜間質細胞を 17 β -estradiol (E2) / Progesterone (P4) で分化誘導すると、脱落膜化に特有の形態変化やマーカーの出現と同時に、TRPC1 の発現およびそれを介する Ca^{2+} 流入が著しく促進され、もう一つの重要なセカンドメッセンジャーである cAMP と共同して効果的に脱落膜化を促進していることが明らかになった。（Kawarabayashi et al. / Mol Endocrinol. 2012）

2. 研究の目的

本研究は炎症部位へ分化・遊走する筋線維芽細胞およびそれより産生される炎症性サイトカイン、extracellular matrix を標的として、腸管組織の線維化に関わる筋線維芽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、腸狭窄の内科的治療法開発を目的とする。

重要な線維化促進因子である TGF- β 1 は狭窄部位で増加がみられ、筋線維芽細胞の分化・遊走・接着・細胞外マトリックスの構築に重要な役割を担う。本研究では TGF- β 1 刺激に応答する TRP チャネルをターゲットとして、消化管筋線維芽細胞内の Ca^{2+} が線維化過程で果たす潜在的な役割について検討を行う。

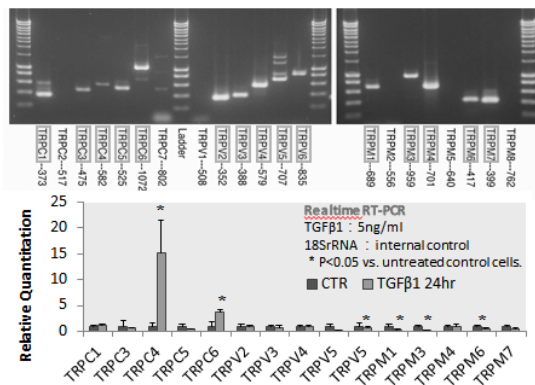
3. 研究の方法

RT-PCR、Western Blot、免疫沈降、免疫染色、遺伝子導入、Stealth RNAi silencing、 Ca^{2+}

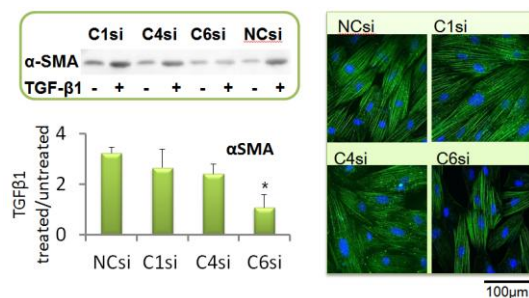
イメージング、マイクロアレイ、Migration assay

4. 研究成果

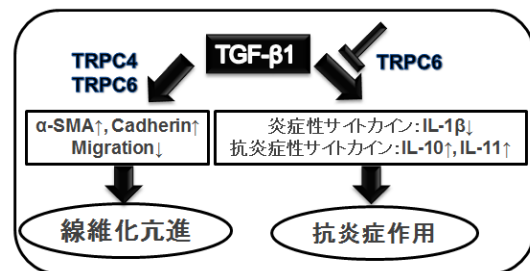
1%FBS/SmBM 培地中で TGF- β 1 (5ng/ml) で筋線維芽細胞株 InMyoFib を刺激すると、 α -smooth muscle actin(α -SMA)、コラーゲン I, III などの線維化マーカーの上昇に伴って、15 種類の TRP チャネルの中 TRPC4, C6 の mRNA 発現量 (次図)、およびそのタンパク発現量が著しく上昇した。



この結果を踏まえ TRPC4, C6 の機能抑制実験を行うと、線維化に関わる現象として α SMA の発現は TRPC6si や Dominant negative TRPC6 によって有意に抑制され (次図)、細胞の遊走能が亢進した。また細胞間接着因子の一つである Cadherin の発現も TGF β 1 刺激によって促進するが、TRPC4si/TRPC6si 前処理によって増加が抑制され、TRPC6 と α SMA、TRPC4 と Cadherin がそれぞれ共沈して、その interaction が TGF- β 1 刺激で強くなることが確認された。コラーゲン産生については TRPC チャネルの関与は認められなかった。



一方 RNA マイクロアレイの予備実験から TGF β 1 は約 20 種類のサイトカイン・ケモカインの mRNA レベルを大きく左右するので、その 20 種類について Realtime-RT-PCR を行った。その結果 TRPC6 の siRNA 前処理は TGF β 1 による IL-1 β 、IL-10、IL-11 の mRNA の発現を強く影響した。Dominant-negative TRPC6 や受容体活性化型カルシウム流入阻害剤 SK&F96365 を使った同様な検討で、TRPC4, C6 の siRNA と同じ作用が確認された。シグナル伝達についても検討した結果、TRPC6 は TGF- β 1 の下流にある Smad2、p38-MAPK、Erk1/2 のリン酸化に対して、抑制的に働くことが分かった。更にこの細胞では、TGF β 1 による TRPC6 のタンパク発現促進は Akt inhibitor である LY294002 (10 μ M) によって有意に抑制された。TGF- β 1 線維化刺激にตอบสนองする筋線維芽細胞 TRPC6 チャネルは、Ca²⁺流入を介して TGF- β 1 の下流のリン酸化シグナルに対して抑制的に働き、TGF β 1 の抗炎症作用に対して抑制的である。また TRPC4、TRPC6 チャネルは細胞骨格 α SMA や細胞接着分子 Cadherin の発現維持に関与している可能性が示唆され、線維化進行に対して促進的に働く。これらの現象から、消化管筋線維芽細胞による新しい炎症性腸疾患の制御機構の可能性が示唆された (次図)。



消化管筋線維芽細胞 TRPC チャネルの機能解析は腸管炎症・線維化の増悪や治癒の両方向におけるシグナル伝達経路に繋がり、線維化狭窄治療に用いる新しい薬物のスクリーニングのターゲット分子の一つである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Kawarabayashi Y★, Hai L★, Honda A, Horiuchi S, Tsujioka H, Ichikawa J, Inoue R. / Critical Role of TRPC1-Mediated Ca²⁺ Entry in Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. (★ contributed equally) (Mol Endocrinol. 査読有 2012 May; 26(5):846-58) doi: 10.1210/me.2011-1259.
- ② Hai L, Kawarabayashi Y, Imai Y, Honda A, Inoue R. / Counteracting effect of TRPC1-associated Ca²⁺ influx on TNF α induced COX-2-dependent prostaglandin E2 production in human colonic myofibroblasts. (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有 2011 301(2): G356-67) doi: 10.1152/ajpgi.00354.2010

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① Lin-Hai Kurahara, Miho Sumiyoshi, Ryuji Inoue / Involvement of TRPC6 channel in fibrogenic stenosis in human intestinal myofibroblast / 第 86 回日本薬理学会大会 / 2013 年 3 月 22 日 / 福岡
- ② Lin-Hai Kurahara, Miho Sumiyoshi, Ryuji Inoue / Intestinal myofibroblast TRPC4, C6 channels confer fibrogenic potential for human stenosis / 第 90 回日本生理学会大会 / 2013 年 3 月 29 日 / 東京
- ③ Miho Sumiyoshi, Rin Kurahara, Ryuji Inoue / Involvement of TRPC6 channel in TGF β 1/SMAD/MAPK/PI3K signaling in human intestinal myofibroblast / 第 90 回日本生理学会大会 / 2013 年 3 月 29 日 / 東京
- ④ Lin-Hai Kurahara, Miho Sumiyoshi, Ryuji Inoue / 線維化促進因子 TGF- β 1 下流における消化管筋線維芽細胞 TRPC4, C6 チャネルの役割 / 第 63 回西日本生理学会 / 2012 年 10 月 19 日 / 大分

- ⑤ Lin-Hai Kurahara, Miho Sumiyoshi, Ryuji Inoue / 炎症性腸疾患線維化狭窄における消化管筋線維芽細胞 TRPC4, C6 チャネルの役割 / 第 54 回日本平滑筋学会総会 / 2012 年 8 月 3 日 / 東京
- ⑥ 瓦林靖広、倉原 (海) 琳、本田啓、市川純、井上隆司 / ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程における TRPC1 の役割 / 第 8 回 TRP 研究会 / 2012 年 6 月 15 日 / 岡崎
- ⑦ Lin-Hai Kurahara, Ryuji Inoue / Intestinal myofibroblast TRPC channels confer fibrogenic potential for human stenosis / 第 89 回日本生理学会大会 / 2012 年 3 月 29 日 / 松本
- ⑧ Lin-Hai Kurahara, Yasuhiro Kawarabayashi, Akira Honda, Ryuji Inoue / Counteracting effect of TRPC1 mediated store-operated Ca²⁺ influx on TNF α -induced COX-2-dependent prostaglandin E2 production in human colonic myofibroblasts / 第 10 回日韓シンポジウム / 2012 年 2 月 18 日 / 韓国慶州
- ⑨ Hai Lin, Ryuji Inoue / 腸管狭窄線維化の進行における消化管筋線維芽細胞 TRP チャネルの役割 / 第 62 回西日本生理学会 / 2011 年 10 月 14 日 / 佐賀
- ⑩ Hai Lin, Yasuhiro Kawarabayashi, Akira Honda, Ryuji Inoue / 消化管筋線維芽細胞における TRPC1/SOC/NF- κ B シグナル伝達を介した COX-2 発現の制御 / 第 87 回日本生理学会大会・シンポジウム / 2010 年 5 月 21 日 / 盛岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉原 琳 (海 琳) (KURAHARA-HAI-LIN)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号: 00341438