

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860571

研究課題名(和文)大腸癌微小環境構築における癌関連線維芽細胞TRPC6の役割

研究課題名(英文)Function of Fibroblast TRPC6 in Colorectal Cancer Microenvironment

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：消化管線維芽細胞・筋線維芽細胞は粘膜上皮下に発現し、消化管の炎症・線維化・癌微小環境構築に関わると知られている。本研究では様々な物理化学刺激に応答するTRPチャンネルをターゲットとして、消化管筋線維芽細胞内のCa<sup>2+</sup>が果たす潜在的な役割について検討を行った。筋線維芽細胞に発現するTRPC6チャンネルは、細胞外マトリックス産生・細胞内ストレスファイバー構築・細胞間接着タンパク発現・サイトカイン放出などに深く関与ことが分かった。これは腸管リモデリングに関わる筋線維芽細胞のシグナル伝達経路の解明に繋がり、消化管炎症由来の線維化・癌化の予防・治療に用いる新しい薬物のスクリーニングへ、重要な情報を提供した。

研究成果の概要(英文)：The crucial role of intestinal fibroblasts/myofibroblasts in inflammation, fibrosis, cancer microenvironment formation is well established. Available evidence suggests that part of fibroblasts/myofibroblasts function may reflect altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis. We focused TRPC6 function in growth factors-mediated signaling associated with tissue remodeling. Our data suggested that myofibroblast TRPC6 channel modulating stress fiber formation, cell-cell adhesion, extracellular matrix synthesis, and cytokine secretion. Growth factors-mediated signaling in intestinal myofibroblasts comprises several phosphorylation events, and forms an intricate network involving TRPC6-mediated signaling pathways. These results suggest that TRPC6-associated myofibroblastic differentiation could be an important process promoting intestinal remodeling, and thus a promising target for future anti-fibrotic and anti-tumorigenesis therapies in the gut.

研究分野：医歯薬学

キーワード：消化管リモデリング 線維化・癌化 線維芽細胞 カルシウム TRPC6 細胞外マトリックス ストレス  
ファイバー

### 1. 研究開始当初の背景

慢性的な炎症によって癌が誘発されることは昔から知られている。慢性炎症と深く関わる癌としては、慢性潰瘍性大腸炎やクローン病によって大腸がんが、C型肝炎ウイルス感染で起こる慢性肝炎によって肝細胞がんが誘発される。慢性炎症による発癌は、「慢性炎症 組織リモデリング 異形成 腫瘍形成」という時系列で誘発されると考えられる。その過程において、Smooth Muscle Actin(-SMA)陽性の線維芽細胞の集積が多くの論文で報告されている。我々の実験結果によるとTRPC6が結腸由来の筋線維芽細胞 SMAの発現維持に不可欠であり、transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) が線維芽細胞膜と細胞骨格を繋げる足場タンパクとして非常に重要であることがわかった。癌関連線維芽細胞は、組織リモデリングに強く関与し、免疫系の細胞の遊走に関与するサイトカインやケモカインを産生し、腫瘍局所の微小環境において、これらの細胞集団が免疫細胞の遊走のみならず炎症の増強などを引き起こすことが報告されている。

### 2. 研究の目的

大腸癌では、増殖因子およびその受容体が過剰に発現し癌の進展に関与することが報告されており、近年分子治療の標的として注目されている。これら増殖因子に反応して病変部へ遊走し「癌微小環境」構築に寄与する細胞の一つに癌関連線維芽細胞がある。臨床的には、癌関連線維芽細胞の過剰増殖の程度と腫瘍化には相関が認められている。本研究では、腸管における種々の物理化学刺激やストレスのセンサー蛋白質と考えられる癌関連線維芽細胞 TRPチャンネルに注目し、増殖因子刺激に反応した増殖・遊走、炎症性サイトカイン・細胞外マトリクス産生の制御に果たす役割の解明を通して、炎症・線維化と発癌を繋げる「癌微小環境」構築における線維芽細胞の潜在的な役割を探索することを目的とする。本研究では様々な物理化学刺激に反応するTRPチャンネルをターゲットとして、消化管筋線維芽細胞内のCa<sup>2+</sup>が線維化・組織リモデリング過程で果たす潜在的な役割について検討を行った。

### 3. 研究の方法

モデル動物・ヒト結腸筋線維芽細胞(InMyoFib)・線維化狭窄患者由来生検組織を用いた検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 発癌物質 azoxymethane(AOM)を使用して発がんモデル動物を作成した。腫瘍の発生に先立ち、炎症が先行し、Tumor necrosis

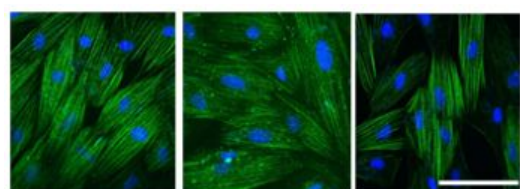
factor alpha (TNF- )や Interleukin-1 alpha (IL-1 )などの炎症性サイトカインや cyclooxygenase-2(COX-2) 次にリモデリングに関わる抗炎症性サイトカイン transforming growth factor-b1 (TGF-b1)が大腸粘膜で上昇し、それに伴って細胞増殖が観察された。癌化組織ではTRPC6チャンネルのmRNA・タンパク発現の有意な上昇が確認された

消化管筋線維芽細胞は炎症病変部の創傷治癒に寄与し、この細胞による組織再構築の際に組織リモデリングへ繋がる。重要な線維化・癌化促進因子である transforming growth factor-b1 (TGF-b1) は狭窄部・癌化部位で増加がみられ、筋線維芽細胞の分化・遊走・接着・細胞外マトリクスの構築に重要な役割を担う。

(2) ヒト培養細胞を用いた検討：1% FBS/SmBM 培地中で TGF- 1(5ng/ml)でヒト結腸筋線維芽細胞株 InMyoFib を刺激すると、-SMA、コラーゲン、などの線維化マーカーの上昇に伴って、カチオンチャンネルTRPC4,C6 の mRNA、タンパク発現が著しく上昇した。この結果を踏まえ RNA 干渉実験を行った、TRPC4,C6 の siRNA は TGF- 1によるコラーゲン、IL-10、IL-11 の mRNA の発現を強く促進した。dominant-negative 体 TRPC6 や受容体活性化型カルシウム流入阻害剤 SK & F96365 を使って同様な検討で、TRPC4,C6 の siRNA と同じ作用が確認された。またその抑制の機序として、TRPC6 を介するカルシウム流入は脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを活性化して、TGF- 1の下流にある Smad-2、p38-MAPK、Erk-1/2 のリン酸化に対して、抑制的に働くことが分かった。

TGF- 1 線維化刺激に反応する筋線維芽細胞 TRPC6 チャンネルは、TGF- 1の下流のリン酸化シグナルに対して抑制的に働き、コラーゲンや抗線維化サイトカイン IL-10、IL-11 の発現に対して抑制的である。三者すべて SMA 発現の抑制因子であるため、TRPC6siRNA による前処理で、SMA 発現への抑制作用が増強して、発現の減少が確認された。また TRPC6 と -SMA、TRPC4 と N-Cadherin が共沈することから、TRPC4/C6 チャンネルは細胞骨格 -SMA や細胞接着分子 N-Cadherin の発現維持に関与している可能性が示唆された。

(下図) -SMA の免疫染色：

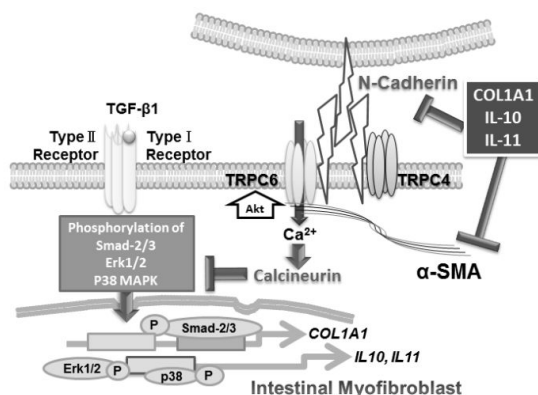


NCsi C4si C6si 100µm  
TGF- 1 刺激による線維化に関わる現象とし

て、TRPC6 と  $\alpha$ -SMA、TRPC4 と N-Cadherin の相互作用が TGF- $\beta$  1 刺激で強くなることが確認され; InMyoFib の遊走能が TRPC6 の機能抑制によって大きく亢進することが分かった。更にこの細胞では、TRPC6 のタンパク発現は Akt inhibitor である LY294002 (10  $\mu$ M) によって有意に抑制された。

他、TGF- $\beta$  1  $\cdot$  IL-13  $\cdot$  IL-17 は最も重要な消化管リモデリング促進因子であると報告されているので、これらのサイトカインで筋線維芽細胞を刺激する実験を行った結果、3 者とも TRPC6 や TRPM7 の発現を増加させることが分かった。

これらの現象から、成長因子 TGF 刺激下において消化管筋線維芽細胞 TRPC6 が組織リモデリングを強力に制御機構の可能性が示唆された。(下図: 模式図)



(3) 線維化狭窄患者の生検組織を用いた検討: 本研究では消化器内科との共同研究により消化管線維化狭窄を持つ患者の腸管狭窄形態を観察し、炎症粘膜の狭窄部位と非狭窄部位の二か所ずつから生検組織を採取し、線維化に関わる現象について実験検討を行った。6 名の患者の計 12 対の狭窄部位生検組織において mRNA を抽出して線維化に関わる分子の発現量を比較した結果、コラーゲン、 $\alpha$ -SMA、IL-1、IL-6、IL-10、IL-11 の発現の上昇が確認され、TNF は狭窄部位と非狭窄部位で同程度であることが確認された。培養細胞では TGF- $\beta$  1 刺激により TRPC4、C6 の発現上昇が確認されたが、線維化狭窄患者の狭窄部位の生検組織では TRPC6 のみ発現の上昇が認められた。ほか、組織リモデリングに大きく関わる細胞外マトリックス構成成分の MMP  $\cdot$  TIMP の mRNA 発現も線維化部位で上昇していることが確認された。

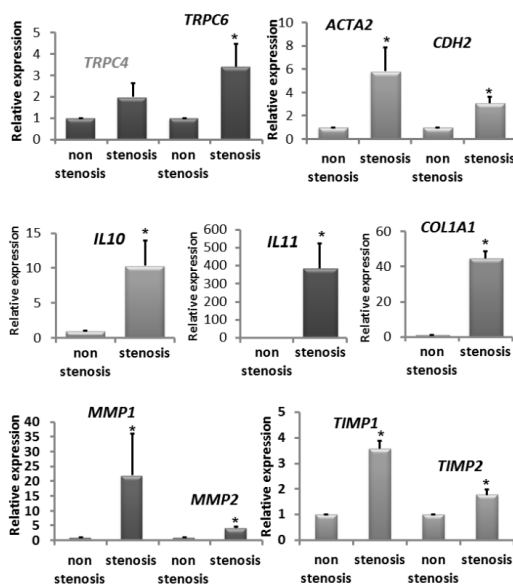
(下図: 培養細胞と生検組織の比較)

TABLE 1. Comparison of Gene Expression in InMyoFibs and Biopsies Obtained from Patients with CD

mRNA Probe	InMyoFibs (n = 5)	Biopsies (n = 6)
	TGF- $\beta$ 1 (+) versus TGF- $\beta$ (-)	Stenosis (+) versus Stenosis (-)
ACTA2	2.22 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	5.82 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>
CDH2	5.03 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	3.07 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>
TRPC4	15.23 $\pm$ 6.16 <sup>a</sup>	1.61 $\pm$ 0.42
TRPC6	3.83 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	3.28 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>
TNFA	1.06 $\pm$ 0.29	2.86 $\pm$ 1.59
IL-6	0.86 $\pm$ 0.20	48.65 $\pm$ 22.82 <sup>a</sup>
IL-10	24.71 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>	10.33 $\pm$ 3.59 <sup>a</sup>
IL-11	1.91 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	385.43 $\pm$ 139.74 <sup>a</sup>
COL1A1	2.09 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	44.75 $\pm$ 16.32 <sup>a</sup>
COL3A1	0.99 $\pm$ 0.17	12.45 $\pm$ 3.53 <sup>a</sup>
MMP-1	4.26 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>	22.01 $\pm$ 14.01 <sup>a</sup>
MMP-2	2.15 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	4.17 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
TIMP-1	2.11 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	3.59 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>
TIMP-2	0.68 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>

The averaged relative mRNA expression in TGF- $\beta$ 1-treated/untreated InMyoFibs cells, and stenotic/nonstenotic biopsy tissue was examined. Data represent mean  $\pm$  SEM. <sup>a</sup>P < 0.05 (12 paired biopsy samples from 6 patients).

(下図: 狭窄部位と非狭窄部位の比較)



本研究の研究結果から、消化管線維芽細胞 TRPC6 は細胞外マトリックス産生・細胞内ストレスファイバー構築・細胞間接着タンパク発現・サイトカイン放出などに深く関与することが分かった。これらの情報は腸管リモデリングに関わる筋線維芽細胞のシグナル伝達経路の解明に繋がり、消化管炎症由来の線維化・癌化の予防・治療に用いる新しい薬物のスクリーニングへ、重要な情報を提供した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

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 (査読有り)

〔学会発表〕(計 9 件)

倉原(海)琳、平石敬三、住吉美保、青柳邦彦、井上隆司：第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会 合同大会 [公募シンポジウム] / クロウン病線維化狭窄における筋線維芽細胞 TRP チャネルの治療標的としての可能性 / 2015 年 3 月 21 日 / 神戸国際会議場(兵庫県・神戸)

倉原(海)琳、住吉美保、青柳邦彦、平石敬三、井上隆司：クロウン病線維化狭窄における筋線維芽細胞 TRPC6 の役割 / 第 88 回日本薬理学会年会 [公募シンポジウム] / 2015 年 3 月 20 日 / 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋)

倉原(海)琳、住吉美保、青柳邦彦、平石敬三、井上隆司：大建中湯の抗線維化・抗狭窄作用における消化管筋線維芽細胞 TRPA1 の役割 / 第 67 回日本薬理学会西部会 / 2014 年 11 月 23 日 / 産業医科大学(福岡県・北九州)

倉原(海)琳、住吉美保、青柳邦彦、平石敬三、井上隆司：大建中湯の抗線維化狭窄作用に関わる消化管筋線維芽細胞 TRPA1 の分子機序 / 第 56 回日本平滑筋学会総会 / 2014 年 8 月 8 日 / 新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜)

倉原(海)琳、住吉美保、青柳邦彦、平石敬三、井上隆司：クロウ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 10 回 TRP 研究会 / 2014 年 6 月 5 日 / 生理学研究所(愛知県・岡崎)

Kurahra Lin-Hai, Sumiyoshi M, Hung H, Aoyagi K, Inoue R : Significant contribution of TRPC6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx to the pathogenesis of Crohn's disease fibrotic stenosis / 第 91 回日本生理学会大会 / 2014 年 3 月 / 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島)

倉原 琳、住吉美保、青柳邦彦、井上隆司：大建中湯が消化管筋線維芽細胞 TRPA1 の発現・機能に及ぼす影響 / 第 64 回西日本生理学会 / 2013 年 10 月 19 日 / 産業医科大学(福岡県・北九州)

倉原 琳、住吉美保、青柳邦彦、井上隆司：消化管筋線維芽細胞 TRPC チャネルによる炎症・線維化狭窄の制御機構 / 第 55 回日本平滑筋学会総会：若手の会 設立記念シンポジウム / 2013 年 8 月 8 日 / 旭川医科大学(北海道・旭川)

Kurahara Lin-Hai, Sumiyoshi M, Inoue R : Involvement of TRPC channel in

fibrogenic stenosis and inflammation in human intestinal myofibroblast. / The 37th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2013) / 2013 年 7 月 24 日 / Birmingham International Convention Centre (イギリス・バーミンガム)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/physiol/study4.html>

## 6. 研究組織

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