

氏名	ひらいし けいぞう 平石 敬三		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1805 号		
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Daikenchuto (Da-Jian-Zhong-Tang) ameliorates intestinal fibrosis by activating myofibroblast transient receptor potential ankyrin 1 channel （大建中湯は消化管筋線維芽細胞 TRPA1 チャンネルを活性化させることにより消化管線維化を改善する）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	岩本 隆宏
	（副査） 福岡大学	教授	平井 郁仁
	福岡大学	准教授	角田 俊之

内 容 の 要 旨

【目的】

クローン病は、消化管の粘膜に慢性の炎症や潰瘍を引き起こす疾患である。病態の寛解や再燃に伴い、線維芽細胞/筋線維芽細胞の増殖、上皮への浸潤、ストレスファイバーの形成、コラーゲンの放出により線維化が進行し、消化管が閉塞するほどの高度な線維化狭窄に繋がる場合がある。線維化狭窄の治療法として、バルーン拡張術や外科的手術が主に用いられているが、患者の身体への負担が大きく、外科手術のあとのまた再狭窄率の危険性もある。これを代替する薬物治療法の開発が期待されており、その為には消化管線維化を抑制するターゲット分子の探索が必須である。

我々は、ターゲット分子の候補として、様々な物理化学刺激に応答し線維化への関与が知られている Transient receptor potential (TRP) チャンネルファミリーに着目した。これまでの我々の研究で、ヒト消化管筋線維芽細胞 (InMyoFib) において、TRPA1 チャンネルの発現が最も多く観察され、また線維化を促すトランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF-

β1)で刺激すると、TRPA1 チャンネルの発現亢進が認められたが、同時に TRPA1 チャンネルのアゴニストであるアリルイソチオシアネート (AITC) を作用させることで線維化を抑制することを見出している。更に、TRPA1 ノックアウトマウスを用いて TNBS 慢性腸炎モデルを作成した結果、野生型マウスモデルよりも重篤な消化管線維化が認められた。また、クローン病患者由来の消化管狭窄部位の粘膜層・筋層において TRPA1 チャンネルの発現亢進が認められた。これらのことから、消化管線維化を軽減させる分子メカニズムとして TRPA1 チャンネルの活性化が非常に重要であることが示唆された。

我々は、TRPA1 チャンネルを活性化させる成分カンキョウ(乾姜)やサンショウ(山椒)を含むことが知られている漢方薬「大建中湯」に着目した。大建中湯は消化器病分野で広く使用され、消化管運動改善、血行促進、消化管ホルモン分泌促進などの作用がある。大建中湯は外科学分野において術後イレウス低減や癒着防止の目的で使用されるが、消化管抗線維化作用を有するか否かは明らかではない。そこで本研究では、大建中湯の抗線維化作用を検討すると共に、その作用機序に TRPA1 チャンネルの活性化が関わっているか否かについて *in vitro* および *in vivo* 実験で検討した。

【対象と方法】

● *In vitro* 実験

培養下に InMyoFib を TGF-β1 で刺激して線維化を亢進させ、大建中湯やその構成成分であるカンキョウ、サンショウ、そしてニンジンと投与したときの抑制効果を検討した。同時に、TRPA1 チャンネルを介したカルシウムイオン流入をカルシウムイメージング法で測定した。また、ストレスファイバー形成への影響を蛍光免疫染色およびα-平滑筋アクチン(α-SMA)・I型コラーゲンの定量化で評価し、TRPA1 チャンネルの発現を定量 PCR で、TGF 受容体下流の Smad-2、p38MAPK のリン酸化及び TRPA1 チャンネルや I 型コラーゲンの発現に対する影響をウェスタンブロットによりそれぞれ評価した。

- *In vivo* 実験

8~9 週齢の C57BL/6N 野生型マウス (WT マウス) 及び TRPA1 ノックアウトマウス (TRPA1^{-/-}マウス) に、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を週に一回経腸投与し 6 週間で腸炎モデルを作成した。その後、これらに大建中湯を 1 週間経腸投与し、大腸を摘出した。

摘出した組織はヘマトキシリン-エオジン (HE 染色) やマッソントリクローム (MT 染色) で染色すると共に、TRPA1 チャネルの発現や線維芽細胞 (筋線維芽細胞) のコラーゲンシヤペロン分子 HSP47 の発現を蛍光免疫染色で確認した。また、摘出した組織よりタンパク質を抽出し、I 型コラーゲンの発現をウェスタンブロット法で評価した。以上について、WT TNBS マウスと TRPA1^{-/-} TNBS マウスとの比較を行い、またそれぞれに対する大建中湯の効果を検討した。

【結果】

- *In vitro* 実験

InMyoFib を TGF- β 1 で刺激するとストレスファイバーの形成が認められた。大建中湯はこれに抑制効果を示した。また、TGF- β 1 刺激時の α -SMA 及び I 型コラーゲンの mRNA の発現亢進が、大建中湯により有意に抑制された。

InMyoFib における TRPA1 チャネルを介したカルシウム流入は、大建中湯のエタノール抽出成分で活性化された。更に、大建中湯の構成成分の中でもカンキョウやこれの主成分である [6]-shogaol、サンショウやこれの主成分である Hydroxy- α -sanshool が TRPA1 チャネルを介したカルシウム流入を促進することが明らかとなった。またこれらの物質は TGF- β 1 刺激による α -SMA、I 型コラーゲンの発現亢進を抑制した。

大建中湯やサンショウを作用させた InMyoFib では、TRPA1 チャネルの発現が亢進し Smad2 や p38MAPK のリン酸化が抑制された。

● *In vivo* 実験

TRPA1 ノックアウト (TRPA1^{-/-}) マウスでは、WT マウスに比較し、TNBS 投与によってより多く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 の TNBS 投与群では膠原線維が粘膜固有層のみに増生しているのに対し、TRPA1^{-/-} TNBS 投与群では粘膜固有層や粘膜下層、筋層まで広く膠原線維が増生していた。大建中湯の注腸によって WT マウスの線維化は改善されたが、TRPA1^{-/-} マウスでは有意な効果が認められなかった。また摘出した消化管を用いたウェスタンブロットの結果において、WT マウスでは TNBS 投与による I 型コラーゲンの発現亢進が大建中湯の投与によって抑制されるのに対し、TRPA1^{-/-} マウスでは大建中湯による I 型コラーゲンの発現抑制が認められなかった。

【結論】

- 消化管筋線維芽細胞に多く発現する TRPA1 チャンネルは、大建中湯に含まれるカンキョウおよびその主成分である [6]-shogaol、サンショウおよびその主成分である Hydroxy- α -sanshool により活性化され、TGF- β 1 刺激による線維化を改善した。
- TRPA1^{-/-} マウスでは、TNBS で腸炎を誘発すると、WT マウスに比し、炎症細胞の粘膜下層浸潤が亢進していた。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^{-/-} マウスの TNBS 投与群では粘膜固有層や粘膜下層、筋層まで広く膠原線維が増生していた。
- 大建中湯の注腸によって WT マウスの線維化は改善されたが、TRPA1^{-/-} マウスでは有意な効果が認められなかった。
- 以上の結果から、TRPA1 チャンネルは消化管筋線維芽細胞に強く発現しており、炎症やそれに伴う線維化に対して抑制的に働き、大建中湯による抗線維化作用に関わる主要な機能性分子であることが示唆された。

審査の結果の要旨

炎症性腸疾患の一つであるクローン病では、消化管炎症の寛解と再燃の繰り返しにより線維化狭窄が生じるが、これに対する有効な治療法は確立されていない。申請者のグループは、先行研究において、TRPA1 ノックアウトマウスの腸炎モデルやヒトクローン病患者標本を用い、消化管筋線維芽細胞に多く発現している Transient Receptor Potential Ankyrin1 (TRPA1) チャンネルが線維化に対して抑制的に働いていることを報告した。本研究では、消化管の炎症や運動低下に対して改善効果を持つことが知られる漢方薬「大建中湯」が、慢性腸炎モデルの線維化に対しても改善効果を示すのか、またその作用は TRPA1 チャンネルの活性化を介するののかについて *in vitro*、*in vivo* の実験系で検討した。

その結果、大建中湯やその含有生薬であるサンショウやカンキョウには、①消化管筋線維芽細胞の TRPA1 チャンネルを活性化し、Smad2 及び p38-MAPK のリン酸化抑制を介して TGF- β 1 刺激による α -平滑筋アクチン (α -SMA) および I 型コラーゲンの発現亢進を抑制する作用があること、更には、②TNBS 誘発マウス慢性腸炎の線維化過程を有意に抑制するが、その作用は TRPA1 のノックアウトによって著しく減弱することを見出した。

これらの結果より、大建中湯は消化管筋線維芽細胞に発現している TRPA1 チャンネルに作用して慢性炎症に伴う消化管の線維化を改善する効果があることが明らかとなった。

1. 斬新さ

伝統的な漢方薬である大建中湯に消化管線維化の抑制効果があることを示した点、およびその効果の発現に消化管線維芽細胞の TRPA1 チャンネルの活性化が関与していることを初めて明らかにした点が斬新である。

2. 重要性

重篤なクローン病に見られる高度な線維化狭窄は、外科手術やバルーン拡張術を行っても繰り返し再狭窄をおこす。本研究では、その新しい治療標的として TRPA1 チャンネルの重要性を示し、更にはその活性化薬として大建中湯の有用性を示唆した点が重要である。

3. 実験方法の正確性

本研究では、研究方法やプロトコールが事前に綿密に検討されており、ヒト培養消化管筋線維芽細胞を用いた詳細な *in vitro* 実験と、TRPA1 ノックアウトマウスを用いた TNBS 誘発性腸炎モデルによる *in vivo* 実験において整合的な結果が得られている。このことから、十分な正確性が担保されていると考えられる。

4. 表現の明瞭性

本研究結果が掲載された WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY は、消化器関連の基礎及び臨床分野でインパクトファクター3.4(5年平均)の英文雑誌であり、論文内容の記述における正確さ、論理性や分かり易さに関して厳しい査読が行われおり、表現の明瞭性は十分に担保されている。

5. 主な質疑応答

Q: TRPA1 は、消化管のどのような部位に発現しているのか？筋線維芽細胞(粘膜下層)にも発現しているのか？

A: 消化管上皮や筋線維芽細胞に発現している。どちらの発現が多いかは評価していないが、粘膜下層においては、 α -SMA と共存することから筋線維芽細胞に多く発現していると考えられる。また、狭窄部位の TRPA1 抗体染色の結果から、線維化部位では粘膜層～筋層まで広く分布すると推察される。

Q: 細胞内カルシウム動態が線維化に影響すると考えてよいのか？そうであれば、その位置づけは？

A: 本研究では、線維化に対する細胞内カルシウム濃度の影響について直接は評価していない。しかし、カルシウムなどの陽イオンが Smad2 や p38 のリン酸化を抑制する可能性があると考えている。

Q: Figure3 に示したカルシウムイメージングは何を示しているのか？

A: 大建中湯による TRPA1 を介した細胞内カルシウム流入を評価している。TRPA1 チャネルの機能(活性)変化を評価するためにこの方法を用いた。

Q: カルシウムがセカンドメッセンジャーとして働くわけではないのか？

A: 一つの可能性として考えているが、その下流にどのような情報伝達分子が関わるのか、今後の検討が必要であると考えている。

Q: 大建中湯は臨床で用いられているのか？

A: 昔より患者に使用されており、消化管通過速度を上げるなどの効能がある。

Q: 大建中湯はクローン病で用いられているのか？

A: 調べた限りではなかったと思う。

Q: インディゴは潰瘍性大腸炎患者に投与している病院もあるが、ほかの既存で使われている天然物との比較もあるとよかったと思う。

A: そう思う。

Q：大建中湯とは天然物のミクスチャーであるが、その中でもっとも活性が高い物質はわかっているのか？またその部分を同定して抽出するのは難しいか？大建中湯がいいのかそれとも各成分で評価したほうがいいのか？

A：大建中湯の有効抽出成分のうち、ショウガオールやサンショールは消化管に対する機能改善効果を示すことが報告されている。本研究でもこの2つの成分に線維化改善効果が見られた。しかし、どの成分がもっとも高い活性を持つのかは現時点ではわからない。

Q：今回発表した内容以外に、線維化による狭窄はどのようなメカニズムが関与しているのか？

A：JAK-STAT 経路などが関与する報告もある。STAT3 と Smad2 との相互作用により線維化を亢進することも考えられる。

Q：腸内細菌のことも考えて、消化管線維化に対して検討したほうが良いと思うがどうか？

A：重要であるので、ぜひともやりたいと考えている。実際、現在大腸癌モデルで検討を進めている。

Q：ニンジンの有効成分はステロイド骨格を持つが、炎症に効果を持つのか？

A：線維化に対する効果は分からないが、少なくとも抗炎症効果を持つと考えている。

Q：TRPA1 は免疫細胞にも発現しているのか？

A：免疫細胞における TRPA1 チャンネルの機能に関する実験は行っていないが、サンショウやカンキョウなどが抗炎症作用を示すことが報告されているので、免疫細胞でも何らかの役割を果たしている可能性がある。

Q：TRPA1 ノックアウトマウスは CRISPR/Cas9 で作成されているが、どのようにオフターゲット検索が行われているのか？

A：オフターゲットの評価は、適切なソフトウェアにより評価している。使用したガイド RNA は、オフターゲット数の少ないものを使用している。

Q：TRPA1 ノックアウトマウスについて、腸炎モデル以外のフェノタイプは見つっていないか？

A：他のフェノタイプの検討は行っていない。

Q：本研究では経腸投与を行っているのですが、有効成分がダイレクトに消化管に効くと考えられる。今回の動物実験などで経口投与を行ったことがあるか？

A：経口投与は行っていない。

Q : TNF- α 抗体製剤により消化管線維化が促進し、狭窄を引き起こすが、それを若干緩和させるために併用するといふと考へるか？

A : 抗炎症薬と大建中湯を併用することで相加的な効果が期待できると考へている。

Q : 消化管線維化に対しては大建中湯の投与が考へられるといふことか？

A : そう思ふ。

Q : TNF- α が大建中湯による線維化抑制効果の作用機序に関与している可能性はあるか？

A : あると思ふ。

Q : TNF- α 刺激による TRPA1 チャネル発現亢進に対する大建中湯の効果は評価しているか？

A : 行っていないが、TNF α にも TRPA1 チャネルの発現を促進する効果がある。

Q : TRPA1 アンタゴニストである HC030031 はどのような経緯で開発されたのか？実際に使われているのか？

A : 呼吸器疾患に使用するとの情報を見たことがあるが、実際に臨床で使用されているかはわからない。

Q : TRPA1 のアゴニストを作れば理想的な治療法につながると思われるが、それを検討する方法としてどのようなことが考へられるか？例えば、TRPA1 と結合部位に作用して効果を示す、リン酸化に影響を与える、カルシウム流入に作用する等。

A : 線維化に着目するのであれば、TRPA1 チャネルを介したカルシウムの影響、各種シグナル伝達物質のリン酸化などに着目するのも面白いのではないかと思ふ。個人的にはシグナル伝達経路の解明に興味がある。

Q : JAK-STAT 経路のうちどの経路を遮断すると効果があると思へられるのか？

A : 現時点ではよくわからない。

本論文は、大建中湯やその含有成分が消化管筋線維芽細胞に発現する TRPA1 チャネルを活性化し、消化管線維化を抑制することを見出し、創薬に繋がるメカニズムを明らかにした研究である。申請者は、指導教員の指導の下で全ての実験を行い、得られた複雑な現象をまとめ論文として報告しており、また学位審査でも、主査や副査との質疑応答で適切に対応していた。このことから、学位論文に値すると評価された。