

様式 R9

整理番号：15-10-04

西暦 2015 年 11 月 25 日

研究開始連絡書

研究責任者 殿

福岡大学病院長（押印省略）

西暦 2015 年 10 月 28 日に「修正の上承認」の通知があった下記の研究について、以下のとおり修正を確認しましたので、研究の開始を通知いたします。

記

臨床研究課題名	消化管組織の線維化・癌化過程における線維芽細胞の機能解析
提出書類	■回答書（様式 R7） ■研究計画書（第 版：作成年月日：西暦 2015 年 11 月 25 日） ■説明文書、同意文書（第 版：作成年月日：西暦 2015 年 11 月 25 日） <input type="checkbox"/> その他（ ）

西暦 2017 年 5 月 9 日

臨床研究計画書

所属・職名： 医学部生理学・講師

氏 名： 倉原 琳

下記の研究計画に従って、臨床研究の実施をたく、申請いたします。

研究課題名	消化管組織の線維化・癌化過程における線維芽細胞の機能解析	
研究分担者氏名	所属・職名	分担業務の内容
小島大望	医学部消化器外科・助教	外科手術由来組織の採集
井上隆司	医学部生理学・教授	病態生理学的評価・実験統括
平石敬三	医学部生理学・研究員	細胞単離、mRNA・タンパク発現定量・ 組織形態観察
研究期間	2015 年病院長許可日～2019 年 3 月 31 日	
研究費	<ul style="list-style-type: none">● 平成 27～29 年度 文部科学省科学研究費補助金・基盤(C) (課題番号 15K08978) 「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」 / 代表者：倉原● 平成 27～28 年度 福岡大学総合科学研究チーム「筋線維芽細胞 TRP チャネルを標的とした腸管狭窄薬物治療法の開発」 / 代表者：倉原● 平成 26～28 年 福岡大学推奨研究プロジェクト「イオンチャネルの分子メカニズムとその病態生理」 / 代表者：倉原● 平成 27 年 福岡県すこやか健康事業団癌研究助成金「スキルス胃癌に多く見られる癌関連線維芽細胞をターゲットとした治療標的分子の探索」 / 代表者：倉原 ※これら研究経費が本研究の計画・実施・報告にいて、試験の結果および結果の解釈に影響を及ぼすことはない。本研究について開示すべき利益相反関係にある企業などはありません。	

本臨床研究は消化管の①線維化狭窄組織②スキルス胃癌の線維化・癌化組織からの線維芽細胞採取・組織形態観察研究を実施する予定

①消化管の線維化狭窄または術後癒痕狭窄における

線維芽細胞・筋線維芽細胞の役割

I：研究の背景

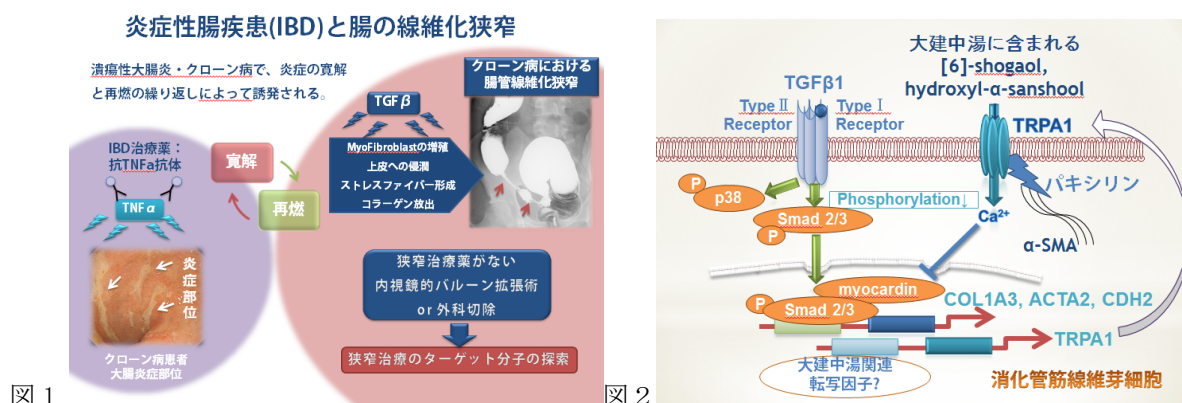
筋線維芽細胞は線維芽細胞の亜種であり、消化管粘膜上皮下の部分に分布し、消化管障害の初期に種々のサイトカインや成長因子に応答して病変部へ遊走し創傷治癒に寄与する。その過剰反応が慢性腸病変の線維化に関わる。組織線維化の過程において間質を占拠した線維芽細胞が細胞外マトリックスの産生に中心的な役割を担う。臨床的にも線維芽細胞の過形成の程度と線維化進行には相関が認められ、このような細胞応答は脱落した実質細胞領域に対する補腔を目指した一種の病的代償(=リモデリング)と考えられる。外科手術の後に見られる間質線維化・癒痕狭窄を予防するためには間質を占拠した線維芽細胞の形質転換を抑制する必要がある。現在、食道などの内視鏡手術後に癒痕狭窄を予防するためにステロイドが投与されるが、その抗線維化の作用機序はほとんど分かっていない。本研究は炎症部位へ分化・遊走する間葉系細胞（線維芽細胞、筋線維芽細胞）に多く発現する TRPA1 チャンネルをターゲットとして、上皮間葉転換、間葉系細胞のストレスファイバー形成、サイトカイン、細胞外マトリックス産生、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、ステロイドによる抗線維化の作用機序を解明し、副作用の少ない消化管術後癒痕狭窄治療薬の可能性を探ることを目的とする。

II：これまでの研究成果・予備実験

我々は種々の物理化学刺激により活性化される新しい Ca^{2+} チャンネル遺伝子群 TRP 蛋白質ファミリーに着目して、筋線維芽細胞における Ca^{2+} シグナル伝達と腸管炎症・線維化における潜在的な役割について検討を行った。筋線維芽細胞において前述の線維化に関わる分子の多くは転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ により発現が制御されることが知られているが、我々の研究結果より、TRPC1 を介する Ca^{2+} 流入には $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の核移行を抑制する働きがあることが明らかとなった (**Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 301(2): G356-67**)。また、消化管筋線維芽細胞に発現する TRPC6 チャンネルは線維化サイトカイン $\text{TGF-}\beta 1$ 、IL-13、IL-17 によって発現が促進され、平滑筋型アクチン ($\alpha\text{-SMA}$) ストレスファイバーの形成に重要であり、筋線維芽細胞からのコラーゲン・IL-10・IL-11 産生にも大きく影響することを報告してきた (**Inflammatory Bowel Diseases 2015**)。これらの研究の過程において、同 TRP ファミリーのメンバーである TRPA1 チャンネルが消化管の筋線維芽細胞および大腸上皮粘膜生検組織には非常に高発現しており、線維化狭窄治療薬である大建中湯によってその発現レベルが増加するばかりでなく、直接活性化されて Ca^{2+} 流入を促進することが分かった。TRPA1 チャンネルは温度感受性を持ち、わさび、ニンニク、マスタード、山椒、生姜などに含まれる成分で活性化される。腸管炎症による腸管狭窄の治療薬である大建中湯エキス（乾姜・人參・山椒）を用いて筋線維芽細胞を刺激すると、TRPA1 チャンネルの発現レベルが上昇する。TRPA1 は TGF 受容体下流のリン酸化シグナルや線維化のマスター転写因子である myocardin (*MYOCD*) の発現を抑制することによって、コラーゲン・ $\alpha\text{-SMA}$ ・N-カドヘリンの発現レベルを有意に減少させることが分かった。また、6-shogaol

(乾姜に含まれる有効成分) や α -Sanshool (山椒に含まれる有効成分) にも直接 TRPA1 チャネルを刺激して Ca^{2+} 流入を惹起し抗線維化を引き起こす作用があることが明らかとなった。(図2)

消化管線維芽細胞に多く発現する TRPA1 チャネルはわさび、ニンニク、マスタード、山椒、生姜などに含まれる成分で活性化されることから、線維化狭窄予防効果を持つ機能性食品の開発へ繋がる可能性も十分に考えられる。現在進行中のノックアウト動物実験の結果は、筋線維芽細胞 TRPA1 チャネルがもたらす消化管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の解明に繋がり、チャネル活性化成分による線維化・癌化予防機序を解明する重要なステップとなる。



III:研究目的

本研究は腸管組織線維化の制御蛋白質と考えられる筋線維芽細胞 TRP チャネルを標的として、筋線維芽細胞の増殖、遊走、炎症性サイトカイン産生、細胞外マトリックス産生の制御機構の解明とともに、ステロイドによる癒痕狭窄の制御機構を明らかにして、線維化狭窄治療の分子ターゲットを探ることを目的とする。予備的な基礎実験の結果から、消化管筋線維芽細胞において、線維化刺激因子 TGF β 1 の刺激下では TRPA1 の活性化が線維化に関わる細胞機能（コラーゲン産生、遊走、 α -SMA 発現、N-カドヘリン発現、TGF 下流にあるリン酸化シグナル、線維化関連転写調節因子 MYOCD の発現）に大きく影響する結果が得られている。筋線維芽細胞 TRPA1 が果たすこれらの役割をヒトから採取した線維化病変組織で確認し、線維化関連分子群の役割を探索することが今回の臨床研究の最大のテーマである。

- ① 癌範囲診断や術後の癌残留検査などの医療行為として内視鏡を行う患者の食道の生検組織または外科手術採取組織から得られた狭窄部位の粘膜層から筋線維芽細胞を単離し、それを用いて TGF- β 1、TRP チャネルの発現の増減に伴う細胞内 Ca^{2+} 動態を計測する。更に、線維化に関連する遺伝子群の変化を確認すると共に、TRPA1 チャネルの発現量・機能とそれに伴う Ca^{2+} 動員や線維化進行に関わるイベントを精査する。
- ② 食道における癌範囲診断や術後の癌残留検査を内視鏡で行う患者を対象に研究目的の追加採取（組織の大きさは約 1 mm^3 四方とする）の同意を得る。食道における癌切除手術後に癒痕狭窄の予防のためにほとんどの場合はステロイドが投与されるので、ステロイド使用前後の狭窄部位の生検組織で線維化に関わる TRP チャネルや線維化関連分子の mRNA・蛋白質レベルで比較検討する。ステロイドの費用に

については患者が負担し、謝礼金は発生しない。

- ③ 外科手術の際に採取した組織から細胞単離・mRNA 抽出・蛋白抽出・凍結切片作成・ホルマリン固定し、腸管線維化の度合いが、線維化関連分子や筋線維芽細胞の遊走・分布動態にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

IV：研究計画・方法

インフォームド・コンセントを得るために患者（医療行為として診断目的で内視鏡を行う患者それぞれ 10 名を対象）へ丁寧な説明を行い、癌範囲診断や術後の癌残留検査を行う際に研究目的の狭窄部位で追加採取の同意を得る。なお、20 歳未満の患者やまたは主要臓器の機能不全を持つ患者を研究対象から除外する。

内視鏡生検の際に、被験者の消化管粘膜から癒痕狭窄部位の組織を内視鏡で採取し、組織の大きさは約 1 mm³ 四方とする。通常、組織の採取に伴う痛みはない。侵襲性に関しては極めてまれに出血・穿孔が起こる可能性が考えられるが、内視鏡検査による合併症の確率（全国で 0.04%）と同程度であり、非常に低頻度と考えられる。診断目的の内視鏡の際に研究用に 1 個の組織（組織の大きさは約 1 mm³ 四方とする）を追加採取するだけなので、通常範囲内での検査と同等のため、金銭的な補償は設定していない。本研究による健康被害が生じた場合、迅速かつ適切な治療・対応を取る。

まず、消化管の線維化に影響する筋線維芽細胞の種々の機能（炎症部位への遊走・沈着、サイトカイン・ケモカイン放出、コラーゲン・MMP・TIMP 産生等）を、患者の生検組織から酵素的に単離した筋線維芽細胞を用いて測定する。次に、これらの細胞機能と TRPA1 チャネルを介する Ca²⁺動態との関係について検討し、相関が認められたものに関して、その下流にある細胞内シグナル伝達を Ca²⁺依存性転写因子系を中心に精査する。更に、筋線維芽細胞の分化・遊走・炎症性サイトカイン産生・細胞外マトリックス産生の抑制効果を検討する。最後に、検出された線維化を増悪させる因子について、特異的 in vivo 機能抑制の動物実験を行い、腸管炎症・狭窄の進行に及ぼす効果を確認する。

- ① 炎症性腸疾患患者から得られた腸管炎症粘膜の狭窄部位と非狭窄部位の、サイトカイン・ケモカイン放出量、コラーゲン・MMP・TIMP-1 産生量を測定する。生検組織から筋線維芽細胞を単離する。この細胞では、TRPA1 チャネルを介する Ca²⁺流入が TGF 下流の線維化シグナル・線維化転写調節因子の核移行を抑える働きがあることが予備実験の結果から判明している。また、線維化に関わる分子の多くは Ca²⁺により発現が制御されることが知られている。そこでこれらの知見に基づき、標準的な方法に従って mRNA・蛋白質を抽出し、RT-PCR・ウェスタンブロット法により、Ca²⁺を介するシグナル伝達系によって転写制御を受ける内因性活性物質 COX-2、MMP、TIMP-1、IL-1、IL-8、IL-10、IL-17、TNF α を中心に評価を行う。
- ② 筋線維芽細胞の狭窄部位への遊走・沈着に対して、各炎症メディエーターがどのような効果を示すかを検討するため、Wound-Healing Migration Assay を用いて筋線維芽細胞の遊走能の変化を計測する。筋線維芽細胞の創傷部への遊走を司る炎症メディエーターが細胞内 Ca²⁺動態に及ぼす影響について

も Ca^{2+} イメージング法で検討を行う。数秒から数十時間に亘って $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta 1$ 、LPS で培養筋線維芽細胞を刺激した後、TRP チャネルなどの線維化に関連する遺伝子群の発現量の変化を定量 PCR や免疫ブロットで比較する。発現の増加が認められた TRP について siRNA サイレンシングを行い、 $\text{TNF } \alpha$ などの刺激後に見られる Ca^{2+} の上昇が抑制されるかどうかを Ca^{2+} イメージング法やパッチクランプ法で検討を行う。受容体刺激や機械刺激で活性化される電流や Ca^{2+} 応答や細胞機能（増殖能・遊走能・細胞外マトリックス産生）にどのような変化が生じるかを観察する。

② スキルス胃がんの癌微小循環構築における筋線維芽細胞の役割

I 研究背景：

スキルス胃癌は早期診断が困難で、急速に線維化を伴いつつ胃壁に浸潤し、比較的早期より播種性腹膜転移を伴うことが多く極めて予後不良な癌として知られている。スキルス胃癌の癌組織において線維芽細胞が大半を占め、胃壁全層にわたる顕著なコラーゲン線維の増加によって、胃全体は平板状に線維性の肥厚と硬化をきたすことから「硬（スキルス）癌」とよばれる。

スキルス胃癌において、EGF, TGF, PDGF, VEGF, FGF といった様々な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。これら増殖因子に応答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 CAF (cancer-associated fibroblast)** 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癌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 チャネルなどの線維化に関連する遺伝子群** に注目し、増殖因子刺激に応答した増殖・遊走、炎症性サイトカイン・細胞外マトリックス産生の制御に果たす役割の解明を通して、線維化と癌化を繋ぐ「癌微小環境」構築における癌関連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。

癌微小環境・・・癌の浸潤、転移、増殖などの特性は、癌の遺伝子異常のみで決定されるものではなく、癌細胞のおかれた微小環境や間質細胞との相互作用の強い影響下にあると考えられる。癌細胞が微小環境や間質細胞によってどのように制御されているのか分子レベルで明らかにすれば、近い将来、その知見は癌の分子診断や分子標的治療に応用できると期待される。癌の組織中にみられる線維芽細胞は、 α -平滑筋アクチン (α SMA) を発現しており筋線維芽細胞の性質をもっていることが報告され、CAF と呼ばれる。CAF は均一な細胞集団のように思われてきたが、それにおける特定のバイオマーカーの発現が予後因子になることが、多くの癌で報告されている。

線維化と癌化・・・慢性的な線維化によって癌が誘発されることは昔から知られている。その過程において、 α 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。我々の最新の論文報告によると TRPC6 が結腸由来の筋線維芽細胞 α SMA の発現維持に不可欠であり、TRPC6 が筋線維芽細胞膜と細胞骨格を繋ぐ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、CXCL-1 や CCL-5、MMP-9、IL-6、SDF-1、 $\text{TGF-}\beta$ など、線維化を促進し、がん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癌の浸潤のみ

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。スキルス胃癌に関しても、TGF- β シグナルの制御が分子標的治療の重要戦略として位置づけられている。スキルス胃癌に多く発現している CAF は癌細胞の増殖を直接促進するだけでなく、内皮前駆細胞を動員し血管新生を亢進させることにより、間接的に癌細胞へ影響を与えることも報告されている。我々の実験結果や幾つかの論文報告から、心血管系・呼吸器系・消化器系の線維芽細胞や筋線維芽細胞に発現する TRP チャネルは、細胞の遊走能の促進や TGF 刺激下の SMAD2、Erk1/2、MAPK のリン酸化シグナルを強く制御し、細胞外マトリックスやコラーゲン産生に強く影響を及ぼすことが分かっている。我々の消化管線維化研究において、最も注目している TRP ファミリーの一員として、TRPA1 チャネルが挙げられ、様々な香辛料に含まれている成分で刺激され、その活性化が TGF シグナルの抑制につながる事が明らかとなっている。

II 研究目的

スキルス胃癌の癌関連線維芽細胞 CAF に発現する線維化関連分子から治療標的分子の探索・・・
癌局所の間質細胞集団が癌の増殖のみならず癌そのものの浸潤転移など癌の悪性度を増強させることが報告されており、癌間質を制御することが今後の重篤な線維化を伴う癌研究において重要であると考えられる。この間質細胞に発現する TRP チャネルは様々な物理化学刺激に応答し、増殖刺激因子に対しても抑制的に働くことから、スキルス胃癌を制御する重要な治療標的分子であると考えられる。正常組織の筋線維芽細胞では TRPA1 チャネル刺激によって TGF シグナルが抑制されることが明らかとなっているので、この現象が CAF 細胞でも見られるかどうか、外科手術由来のスキルス胃癌組織から細胞を単離して確認する。また、スキルス胃癌の重篤な線維化と高い浸潤性を抑制できる予防・治療戦略を線維芽細胞における研究を通じて確立することを目的とする。

III 方法

インフォームド・コンセントを得るために患者（医療行為として内視鏡を行う 20 歳以上の 10 名患者を対象とする）へ丁寧な説明を行う。外科手術の終了後に、事前に同意を得た被験者の胃癌摘出組織から実験用試料（癌化組織・非癌化組織）を採取し、一つの組織の大きさは約 1 cm³ 四方とする。組織の採取に伴う患者の不利益は無く、金銭的な補償は設定していない。

- ① 外科手術により摘出した正常部位、癌化部位のそれぞれの組織から癌関連線維芽細胞の一次培養系を樹立し、それぞれの線維芽細胞の性質を比較検討する。線維化関連遺伝子群の発現の変化をデジタルリアルタイム PCR（福岡大学総合研究室保有）や免疫ブロットで評価する。更に、組織内癌関連線維芽細胞の形態変化・局在の変化を免疫染色法で精査する。
- ② 正常部位と癌化部位の癌関連線維芽細胞を用いて、DNA マイクロアレイにより種々の遺伝子の発現パターンとそれを制御するマイクロ RNA の増減を網羅的に解析し、癌化の悪性度に関係するマイクロ RNA の同定を行う。更にその機能解析を進めて、マイクロ RNA 創薬へと繋げる。①の組織から単離した癌関連線維芽細胞の Ca²⁺動態や膜電流の変化について、Ca²⁺イメージング法やパッチクランプ法による比較検討を行い、スキルス胃癌組織の線維化・浸潤の変化の病態生理学的意義を探る。また、腸管の組織レベルでの応答性の変化（腸管収縮および細胞の遊走性）についても、癌組織と正常組織間で比較検討する。

胃癌由来組織の電子顕微鏡観察により、癌組織の癌関連線維芽細胞と癌細胞、他の免疫担当細胞（消化管上皮細胞・マクロファージ・樹状細胞）との関わり合いについて3次元培養により形態的な比較検討を行う。

※資料の保存および使用方法について・検体保管・情報公開について

研究責任者は、研究などの実施に係わる重要な文書（申請文書の控え、病院長からの通知文書、各種申請書・報告書、調査票などの控え、同意書、匿名化するための患者識別コードリスト（連結表）、その他データの信頼性を保証するのに必要な書類や記録など）を、福岡大学医学部生理学に保管する。研究対象患者の検査結果などのデータはパスワードの設定がなされたコンピューターに、研究終了後5年が経過した日までの期間保存し、そのあとは破棄する。紙媒体でのデータの保存期間は研究終了後1年間とし、その後は個人情報に注意して破棄する。採取された試料（組織標本・細胞標本）は福岡大学医学部生理学教室で保管する。試料保管期間は5年とする。

本研究に関する実施状況・研究結果などの情報は UMIN（大学病院医療情報ネットワーク）で開示しており、進捗状況について随時公開する。

その他（本計画の重要性について）

本研究では、線維化・癌化進行過程における重要性が注目されている筋線維芽細胞の遊走・沈着や、筋線維芽細胞からの線維化・癌化調節因子の放出の分子機序を明らかにすることを目的としている。特に、線維化制御分子として可能性が高い TRP チャネルによる Ca^{2+} 流入を介した転写因子 (calcineurin/NFAT 系、CaMK/CREB 系など) 制御が、線維化関連分子の発現、線維化・癌化の進行や改善にどのように関わっているのか、分子生物学・免疫組織化学・生理学的手法を用いて探索する。既に、予備的な実験データを取得しており設定目標は達成できる見込みである。この実験系の確立は、筋線維芽細胞がもたらす腸管炎症の増悪や治癒の両方向におけるシグナル伝達経路の解明に繋がり、線維化・癌化治療に用いる新しい薬物のスクリーニングを行うにあたって重要なステップとなる。本研究の提案は、研究代表者独自の研究から生み出された独創的なプロジェクトであり、本研究の成果から極めて大きな社会的な波及効果が得られることが期待される。更に、消化管線維化・癌化を予防・緩和できる治療薬や機能性食品の開発による地域経済の活性化にも発展する可能性もあり、社会への重要な還元効果も期待される。

研究対象者及び関係者からの相談窓口

（研究内容に関する情報提供担当）研究実施責任者：

福岡大学医学部・生理学講師・倉原琳

〒814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1

Tel：092-801-1011（内線 3236）

Fax：092-865-6032

（外科手術に関する情報提供担当）臨床研究分担者：

福岡大学医学部・消化器外科助教・小島大望

〒814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1

TEL：092-801-1011（内線 3425）

FAX：092-863-9759