

論文内容の要旨

論文提出者氏名 堀田 祐馬

論文題目

Transforming growth factor β 1-induced collagen production in myofibroblasts is mediated by reactive oxygen species derived from NADPH oxidase 4

論文内容の要旨

クローン病において、腸管の線維化にともなう狭窄は、非常に重要かつ重篤な合併症である。腸管線維化の抑制、あるいはその治療が望まれているが、腸管の線維化の基礎的な理解が未だ不十分である現状がある。

著者は、フリーラジカルを産生する蛋白であり、肺や腎の線維化への関与が証明されている NADPH oxidase 4 (NOX4) に着目し、腸管での線維化機構においても NOX4 が主要な役割を果たしている可能性を考えた。

一般に筋線維芽細胞に対して TGF- β 刺激を行うことで線維化 (コラーゲン産生増加) することが知られており、腸管における線維化機構への NOX4 の関与を証明することを目的とした。

マウスの腸管筋線維芽細胞株である LmcMF を用いて、TGF- β 1 を 1-50ng/ml の濃度で刺激し、コラーゲン産生の程度を Sirius Red 染色によって定量化したところ、TGF- β 1 5ng/ml 以上で濃度依存的に有意なコラーゲン産生の増加が認められた。

また、collagen I に対する蛍光抗体を用い、TGF- β 1 10ng/ml での刺激によって細胞内のコラーゲン蓄積が増加することを確認した。TGF- β 受容体の分子 SMAD2/3 の阻害剤である SB525334 を用い、TGF- β 1 との共投与を行ったところ、TGF- β 1 刺激によるコラーゲン産生の増加は、有意に抑制された。

次に LmcMF を TGF- β 1 10ng/ml で刺激し、NADPH oxidase family である NOX 1、2、3、4、DUOX1、2 の遺伝子発現をそれぞれ RT-PCR で解析したところ、NOX4 の発現のみが、有意に誘導される結果であった。また、LmcMF における TGF- β 1 刺激による NOX4 mRNA の誘導は、濃度依存的に上昇した。

LmcMF の TGF- β 刺激によるフリーラジカル (ROS) の産生について、5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein を用いて蛍光顕微鏡で H₂O₂ を可視化、定量化したところ、TGF- β 1 10ng/ml での刺激によって ROS の産生が増加した。かつ NOX の阻害剤である diphenyleneiodonium (DPI)、NOX4 の発現を特異的に阻害する NOX4 siRNA を用い、

それぞれ TGF- β 1 との共投与を行ったところ、いずれにおいても ROS の産生増加がキャンセルされた。

最後に、LmcMF の TGF- β 1 刺激によるコラーゲン産生について、DPI ならびに NOX4 siRNA を用い、それぞれの TGF- β 1 との共投与を行ったところ、collagen I の産生増加はいずれにおいても阻害された。

これらの結果より、腸筋線維芽細胞株である LmcMF を用いた腸管線維化モデルにおいて、TGF- β 1 刺激によるコラーゲン産生誘導は、NOX4 の誘導と ROS の産生を介していることが証明された。

NOX4 は、腸管線維化をきたす病態の治療ターゲットとなり得ることが示唆された。