

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15825

研究課題名(和文)メカノセンサーを標的とした新たな口腔粘膜バリア薬開発

研究課題名(英文)Wound healing and mechxnosensitive ion channel

研究代表者

城戸 瑞穂(Kido, Mizuho)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：60253457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚や粘膜への創傷は常に速やかな治癒が望まれている。口腔は常に多様な刺激に暴露され損傷が生じやすい一方で、高い再生力を持ち、皮膚よりも速やかに治癒し癒痕が生じにくいことが知られている。私たちは口腔粘膜に常に加わっている機械刺激に着目し、機械刺激により活性化するカルシウム透過性チャネル(TRPV4)の活性制御という新たな観点から、創傷治癒への影響を調べた。TRPV4の遺伝子欠失マウスを用いた実験から、TRPV4が口腔上皮細胞の細胞移動や細胞間の接着を制御し、創傷治癒を抑制することわかった。TRPV4制御によるアプローチは新たな口腔粘膜バリア薬として期待出来る。

研究成果の概要(英文)：Skin or oral wounding is great burden for patients and faster wound repair is always desired. Oral mucosa is always exposed to various stimuli and at the same time it has high turnover rate and recover faster than the skin wound. We focused mechanosensitive calcium permeable channel, because oral mucosa is always exposed to mechanical stimuli. We focused transient receptor potential channel vanilloid 4, which is activated by warm temperature, mechanical stretch, and hypo-osmolarity. We found out using TRPV4 deficient mice that wound healing is affected by TRPV4 activation. We propose here TRPV4 may one of the candidate for wound healing treatment.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：創傷治癒 上皮細胞 細胞間接着

## 1. 研究開始当初の背景

火傷や外傷、さらには糖尿病患者や、アスピリンなど非ステロイド消炎鎮痛剤の投与による創傷の治癒不全はしばしば生命に関わる重篤な病態につながる。また、超高齢化社会を迎え、寝たきりになることで生じる「褥瘡」が、医療や介護の現場で大きな問題となっていることも考え合わせると軟組織創傷の新たな治療法や薬剤の開発は急務である。

口腔は身体他の部位に比べ、多様な化学・機械・温度刺激に曝されている。ゆえに粘膜が損なわれ、創ができることも少なくない。その一方で、再生能力が高く速やかに治癒し、瘢痕も生じにくいことが知られている。しかし、その理由は明らかとはいえない。

私たちは、口腔上皮や皮膚上皮に TRP (transient receptor potential channel) チャンネルという非特異的な陽イオンを透過するチャンネル群が機能的に発現していることを見いだしてきた。それらは、口腔粘膜の部位により発現様式が異なり、生理的な機能を明らかにしてきた (Kido et al., 2003, Shimohira et al., 2009, Wang et al., 2011)。

TRPV ファミリー分子である TRPV3、TRPV4 は口腔粘膜上皮に豊富に発現している。私たちは、33 以上の温度刺激で活性化する TRPV3 の遺伝子欠失マウスの抜歯後の治癒を調べ、TRPV3 欠損により創傷治癒が遅延することを見出した。さらに TRPV3 チャンネル活性化が上皮成長因子受容体 (EGFR: epidermal growth factor receptor) シグナル経路を促進することで、抜歯後の速やかな創傷治癒を導くことを報告した (Aijima et al., 2015)。この実験の過程で、TRPV4 の遺伝子欠失マウス (V4KO) では、TRPV3 遺伝子欠失マウス (V3KO) とは異なり、細胞増殖が亢進しており、創傷治癒が促進していることを見出した。

近年、機械的な刺激が創傷治癒を促進せよとの報告も蓄積されてきている。

私たちは、口腔粘膜が皮膚よりも柔軟であること、部位により力のかかり方は多様であるが、常に伸展や圧縮などの比較的強い力が懸っていることに着目した。そして、TRPV3 と同等の私たちが温かいと感じる温度で活性化し、伸展刺激や浸透圧刺激により活性化されるメカノセンサー TRPV4 もまた口腔における速やかな創傷治癒に関係すると仮定し、TRPV4 の制御による創傷治癒促進を狙うこととした。

## 2. 研究の目的

マウスの口腔粘膜損傷モデルを用い、創傷治癒促進を目指し、TRPV4 チャンネルを標的として、上皮細胞の挙動や創傷治療を目指した TRPV4 機能の解明を行った。損傷部のカルシウム上昇シグナルの受け手となりうる TRPV4 の創傷治癒への積極的な機能を明らかにする事は、新たな上皮再生メカニズムの解明に繋がる成果を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス C57BL/6 を対象とした。動物実験計画は佐賀大学および九州大学の動物実験委員会の審査・承認を受けた後、実験を実施した。遺伝子組み換え実験についても九州大学および佐賀大学の遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。

### マウス口腔粘膜の損傷モデルの作製

6 週齢の雄マウスを麻酔下で口蓋に直径 1.5mm の粘膜創を作製した。創部形成後 1.3.5 日でマウスをパラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液にて灌流固定を行った。治癒の評価のために、創部を顕微鏡下で観

察し、創部の面積、最大長の部位の直径を測定した。さらに、組織切片を作製し、創部の上皮端の距離を定量した。

#### 初代培養細胞における評価

生後 2-3 日の野生型マウスおよび TRPV4 遺伝子欠失マウスから細胞を採取し、初代培養を行った。その後、増殖能、細胞移動能を調べた。

#### 免疫染色

マウス固定組織より凍結切片を作製し、蛍光抗体法により免疫染色を実施した。

培養細胞は 4 %パラホルムで固定の後リン酸緩衝液にて洗浄した後に、組織と同様に染色を施した。組織切片および細胞は、共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、画像取得を行った。

#### 4. 研究成果

マウス口腔粘膜の免疫染色により口腔上皮の部位により TRP チャンネルの発現分布に差があることが明らかになった。また細胞増殖活性を調べたところ、差が認められた。

初代培養口腔上皮細胞におけるスクラッチアッセイにて、TRPV4 の制御により上皮の移動に差が認められた。

さらに、株化口腔上皮細胞を用い、薬理的にイオンチャンネルの活性化を行ったところ、細胞の増殖が抑制された。一方、チャンネルの活性化を抑制すると細胞の増殖が活発になった。培養細胞の細胞シートへの傷が早期に修復されることがわかった。また、細胞の移動への影響も調べたところ、TRPV4 の抑制は細胞の移動距離を上昇させることが見出された。

これらには、細胞間の接着分子群の関与が免

疫細胞化学により明らかに出来た。とくに、細胞骨格を担う、アクチンと非筋ミオシンが関与していることを示すことができた。TRPV4 遺伝子欠失マウス由来の上皮細胞においても、細胞の増殖や細胞の移動が野生型のマウスからの細胞に比較して活性化していることが明らかになった。

個体レベルの影響を明らかにするために作出したマウス口腔粘膜の創傷モデルにおいて、創部の面積および距離が野生型マウスよりも TRPV4 遺伝子欠失マウスでは有意に小さいことがわかった。

以上のことから、低浸透圧、伸展刺激などで活性化される温度感受性のイオンチャンネル制御が新たな口腔の創の治癒促進の標的となる可能性が示唆される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. The oral mucosal membrane and transient receptor potential channels. Kido MA, Yoshimoto RU, Aijima R, Cao AL, Gao WQ. J Oral Sci. 59(2):189-193 2017 doi: 10.2334/josnusd.16-0862 査読有.

[学会発表] (計 19 件)

1. 温度感受性イオンチャンネル TRPV4 を介した口腔上皮細胞間接着と細胞移動の調節 吉本 怜子, 合島 怜央奈, 西山 めぐみ, 大崎 康吉, 張 旌旗, 清島

- 保、城戸 瑞穂 2017 年度生命科学系学会合同大会 神戸市 2017.12.6-8
2. Oral mucosal membrane protection via temperature sensitive channels. Kido MA. Translational Research Meeting at Fukuoka Dental College 2017.11.24. 【招待講演】
  3. Warm-activated TRPV4 enhances oral epithelial cell-cell adhesion and suppresses migration. Yoshimoto RU, Aijima R, Ohsaki Y, Zhang JQ, Kiyoshima T, Nishimura F, Kido MA. The 65<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017.11.18 Tokyo 【Hatton Award JADR finalist】
  4. Oral barrier formation via temperature-sensitive TRP channels. Kido MA. The 69<sup>th</sup> Annual Meeting of The Korean Physiological Society, Seoul Korea. 2017.11.2【招待講演】
  5. 温度感受性イオンチャンネル TRPV4 による口腔上皮細胞の細胞間接着および細胞移動の制御 吉本怜子、清島保、西村英紀、城戸瑞穂 第 147 回日本歯科保存学会学術大会 盛岡市 2017.10.26-27
  6. 口腔粘膜における温度感受性 TRP チャンネルのダイバーシティ 城戸瑞穂、吉本怜子、合島怜央奈、曹愛琳、張旌旗、大崎康吉 第 59 回歯科基礎医学学会 2017.9.16-18【シンポジウム講演】「受容体研究とリサーチライフダイバーシティ」
  7. 温度感受性イオンチャンネル TRPV4 は口腔上皮細胞の細胞間接着と運動性を制御する 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、張旌旗、曹愛琳、清島保、城戸瑞穂 第 59 回歯科基礎医学学会 塩尻市 2017.9.16-18【モリタ優秀発表賞受賞】
  8. TRP チャンネルを標的とした口腔癌細胞制御 合島怜央奈、曹愛琳、高イキ、吉本 怜子、森 啓輔、檀上 敦、山下佳雄、清島 保、城戸 瑞穂 第 59 回歯科基礎医学学会 塩尻市 2017.9.16-18 【モリタ優秀発表賞受賞】
  9. Temperature sensitive TRP channels in Oral Mucosa. Kido MA, Aijima R, Yoshimoto RU, Kitsuki T, Cao AL, Jing-Qi Z, Ohsaki Y. 9th National Congress of Romanian Society of Cellular Biology with international participation Iasi Romania 2017.6. 7-11 【招待講演】
  10. Epithelial barrier disorganization and oral pain. Yoshimoto RU, Aijima R, Ohya Y, Yoshizumi J, Kiyoshima T, Kido MA. Gender Summit 10 satellite symposium Okinawa 2017.5.28-30
  11. ヒト口腔扁平上皮癌における温度感受性 TRP チャンネルの役割 合島怜央奈、森 啓輔、下平大治、檀上 敦、山下佳雄、清島 保、城戸瑞穂 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、福岡 2017.1.26-2
  12. Temperature changes affect intercellular adhesion of oral epithelial cells. Reiko U. Yoshimoto, Reona Aijima, Yasuyoshi Ohsaki, Jing-Qi Zhang, Ailin Cao, Tamotsu Kiyoshima, Mizuho A. Kido The 15th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP2016fall: in conjunction with YR Umami Forum 2016, AISCRIB 2016), Fukuoka, December 3-4, 2016
  13. 顎顔面の痛みとイオンチャンネル 城戸瑞穂 日本顕微鏡学会第 58 回九州支部学術講演会、北九州市、2016. 12.3 【特別講演】

14. 温度感受性イオンチャネルによる口腔粘膜上皮の維持 城戸瑞穂 日本解剖学会 第 72 回九州支部学術集会、長崎、2016. 10.29 【特別講演】
15. 口腔粘膜の痛みと TRPV1 チャネル 城戸瑞穂、吉住潤子、高尾知佳、吉本怜子、大山順子、合島怜央奈、高岡裕、豊福明 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会、札幌、2016. 8. 24-26 【シンポジウム講演】
16. ヒト口腔癌細胞株における TRP チャネルの機能解析 合島怜央奈、吉本怜子、曹愛琳、森 啓輔、張 旌旗、大崎康吉、檀上 敦、山下佳雄、清島 保、城戸瑞穂。第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会、札幌、2016. 8. 24-26
17. Disorganization of adherens junction of labial epithelia in xerostomia patients. Reiko Yoshimoto, Reona Aijima, Yukiko Ohyama, Junko Yoshizumi, Tomoko Kitsuki, Atsushi Danjo, Yoshio Yamashita, Tamotsu Kiyoshima, Mizuho A. Kido. 9th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientist Seoul, Korea, July 21-22, 2016.
18. Hypomaturation of dental enamel in thermosensitive TRP channel deleted mice. Jing-Qi Zhang, Reiko Yoshimoto, Reona Aijima, Tomoko Kitsuki, Yasuyoshi Ohsaki, Cao Ailin, Mizuho A. Kido. TMD 2016 Porvoo, Helsinki, 2016.6.8-13
19. 口腔粘膜バリアに関わる温度感受性 TRPV4 チャネル 城戸瑞穂、木附智子、合島怜央奈、吉本怜子、張旌旗、大崎康吉 第 121 回日本解剖学会 郡山、2016.3.28-30
- 〔図書〕(計 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
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
城戸 瑞穂 ( Kido Mizuho )  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：60253457
- 研究者番号：
- (2) 研究分担者  
合島 怜央奈 ( Reona Aijima )  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号：30756143
- (3) 連携研究者  
( )  
研究者番号：
- (4) 研究協力者  
( )