

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09476

研究課題名(和文)皮膚・神経相互作用におけるTRPチャンネルとミッドカインの役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of TRP channels and midkine in keratinocyte-neuron interactions.

研究代表者

森 弘樹 (MORI, Hiroki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80345305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚と神経の相互作用のうち、Transient Receptor Potential Vanilloid 4(TRPV4)とミッドカイン(MK)について振盪機を用いた物理的刺激の検討を行い、さらにタミバロテン(Am80)についてMKを介した神経再生を検討した。本研究により、TRPV4は振盪刺激により皮膚細胞での発現が促進される可能性が示唆された。MKは神経細胞、皮膚細胞共培養群で高い発現を認め、その関与が示唆された。MKは振盪刺激によって減少した。Am80(10 μ M)添加は神経細胞の突起伸長・高密度化を促したが、MK濃度への影響は軽微であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚と神経の相互作用、および物理刺激による神経再生について過去の報告の追試、および新知見となりうる結果が得られた。TRPV4については追試の域を出なかったが、MKの所見は新知見になりうる。またAm80についてはMKへの影響は軽微にも関わらず神経突起の伸長が見られ、他の要素の可能性も示唆された。皮膚の知覚再建・再生にはいまだ不明な点が多いが、本研究はケラチノサイト・神経細胞の相互作用、さらに物理刺激を加えた点、またミッドカインおよびAm80の神経再生にケラチノサイト・神経細胞の相互作用と絡めた点で新規性があり、細胞の相互作用と物理刺激を多面的に捉えた研究となった。

研究成果の概要(英文)：Among the skin-nerve interactions, physical stimulation was examined for Transient Receptor Potential Vanilloid 4(TRPV4) and midkine (MK), and MK-mediated nerve regeneration was also examined for Tamibarotene (AM 80). Physical stimulation using a shaker was used to examine the effect. The present study suggests that (1)TRPV4 expression in keratinocyte may be enhanced by shaking stimulation. (2) MK was highly expressed in both neuronal and keratinocyte cultures, suggesting its involvement. (3) MK was decreased by shaking stimulation. (3) MK was decreased by shaking. (4) Addition of Am80 (10 μ M) promoted neurite outgrowth and densification, but the effect on MK concentration was minor.

研究分野：形成外科

キーワード：神経細胞 角化細胞 振盪刺激 ミッドカイン TRPV4 タミバロテン

1. 研究開始当初の背景

知覚神経の再建を伴わない皮弁移植後の知覚回復において、時間経過とともに自然回復が起こることはしばしば報告されてきた。また、腓腹神経などの知覚神経を移植神経として摘出すると一定の領域が知覚鈍麻となるが、その範囲は時間経過とともにかなり縮小する。これらの機序は皮膚皮下組織内の神経ネットワークや神経の再生によるものと推測されているが、明確な機序は分かっていない。

近年、「さする」などの刺激により、神経再生を促すことを示唆する報告がなされた。細胞膜上に物理的な刺激が加わり、これを Transient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2) タンパク質が感知することで、神経の突起をより長く伸ばす。温度感受性分子として発見された TRP チャネルひとつである TRPV2 は感覚神経に発現して、高い熱刺激で活性化すると報告されたが、その後に機械刺激により活性化されると考えられるようになっている。また TRPV4 は浸透圧センサーとして同定され、その後、機会刺激、温度刺激にも反応することが明らかになり、感覚神経よりもケラチノサイトに発現が多い。

物理的刺激の実験的手法として伸展培養や振盪培養がある。脂肪細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、交感神経などの報告があり、交感神経については持続的な伸展刺激で神経の発芽が強まるとされる。

ミッドカイン(MK)は個体発生の研究の過程で発見された成長因子であり、成体では発現部位が限られるが、組織が損傷されると発現が増大、あるいは新たに誘導される。障害を受けた末梢神経の再生、変性いずれにも MK が関与することや、神経細胞の突起伸長作用を持つことが報告されている。さらに MK はケラチノサイトにも存在し、その存在部位は角化領域や炎症部位である。一方で前述の TRP チャネルや物理的刺激との関連を示唆する報告はない。

合成レチノイドの一つであるタミバロテン(Am80)は急性前骨髄球性白血病再発例に対して用いられるが、皮膚の炎症性・増殖性疾患の治療にも用いられている。Am80 は神経細胞分化誘導薬としても注目され、神経突起伸長作用を示すこと、前述の MK 発現を介して中枢神経再生作用を示すことなどが報告されてきた。

2. 研究の目的

これらの背景のもと、今回、我々は皮膚と神経の相互作用のうち、TRP チャネルと MK に着目し、物理的刺激により MK やその他の神経栄養因子がどのように変化するのか、さらに MK に作用する Am80 の神経再生作用について検討することとした。培養実験において、ケラチノサイト/神経共培養モデルを作成し、単独培養と比較する。物理的刺激については伸展培養もしくは振盪機を用いる。これによりケラチノサイト・神経細胞の相互関係を *in vitro* で評価し、上記因子が発現するかを定量的に評価する。

3. 研究の方法

【伸展培養を用いた物理的刺激による各種因子の検討】

伸展装置(STB-140 ストレックス)及び有効面積 4cm²のシリコンチャンバー(ストレックス)を用いた。チャンバーにはポリ-D-リシン/ラミニンをコーティングした。ヒトから採取した細胞は第 4-5 継代の細胞を用いて実験を行った。ラット由来の神経細胞(R-DRG - ラット後根神経節ニューロン, LONZA)については初代のものを用いた。神経細胞単独、ケラチノサイト単独、ケラチノサイト・神経細胞共培養をそれぞれ伸展とコントロールに分けた。培養液はケラチノサイト用(クラボウ KK-2150S)・神経細胞用(LONZA CC-4461)を1:1で混ぜたものを用いた。神経細胞を先行して培養し、安定した後にケラチノサイトを加える。その後、伸展群に対し0.1Hz、10%の伸展刺激を与え、コントロール群は伸展をしないこととした。

【振盪機を用いた物理的刺激による各種因子の検討 その1】

2018年度で伸展培養が確立できず、2019年度は振盪機(タイテック社 高湿度対応振とう機 CL-LR)での物理刺激に変更した。ポリ-D-リシン/ラミニンがプレコーティングされた 24well dish (CORNING 社)を用いて、インキュベーター内に振盪機を設置し、物理刺激を加えた共培養を行った。細胞が接着した1日目から振盪を開始した。振盪の条件は150回/分とした。

【振盪機を用いた物理的刺激による各種因子の検討 その2】

2020年度は、前年度から振盪の条件を変更し、再度 MK の定量と、TRPV4 の検出を試みた。神経細胞(R-DRG - ラット後根神経節ニューロン, LONZA)・ケラチノサイト(正常ヒト表皮角化細胞新生児由来, クラボウ)共培養を行い、振盪群では安定した day8 からセルシェーカーで振盪開始。振盪の条件は30-50回/分とした。day10、day12に各上清を採取し、MK量をELISA法で評価。day12に細胞を回収し、TRPV4、MKの免疫染色を行った。

【神経細胞培養モデルにおける Am80 添加の検討】

神経細胞単独培養で安定した day5 に Am80 (富士フィルム和光) 添加(10 μM)の有無で 2 群にわけ、振盪群ではセルシェーカーで振盪開始。振盪の条件は 30 回/分とした。day9、day11 に各上清を採取し、MK 量を ELISA 法で評価。day11 に細胞を回収し、MK の免疫染色を行った。

4. 研究成果

【伸展培養を用いた物理的刺激による各種因子の検討】

伸展装置に装着するシリコンチャンバーに対し、ポリ-D-リシン/ラミニンにてコーティングを行い、神経細胞の培養を行った。培養 1 週間程度で神経細胞の接着、神経突起の伸長が認められたものの、複数のチャンバーにおいてコーティング膜の器材からの剥脱が起こり、細胞の観察が困難となったため、継続を断念した。コーティングの器質には伸展性がなく、伸展するとさらに剥脱がすすむものと予想された。実験中止時に試験的にチャンバーを手動的に伸展したが、複数個所で剥脱し、細胞の観察は困難になると予想された。このため振盪器を用いた物理刺激での実験に移行した。

【振盪機を用いた物理的刺激による各種因子の検討 その1】

浸透刺激については、ラミニンコーティング施行した 24well プレート上で、ラット由来神経細胞、ヒト由来ケラチノサイトの共培養を行った。神経細胞を安定培養のち続いて皮膚ケラチノサイトを共培養し、4 日間継続的に振盪(150 回/分)し、1-3 日間に培養液を採取し(1, 2 日目各群 n=2、3 日目各群 n=4)、MK および ATP について ELISA による解析を行った。さらに 3 日目に TRPV4 による免疫染色を行った。

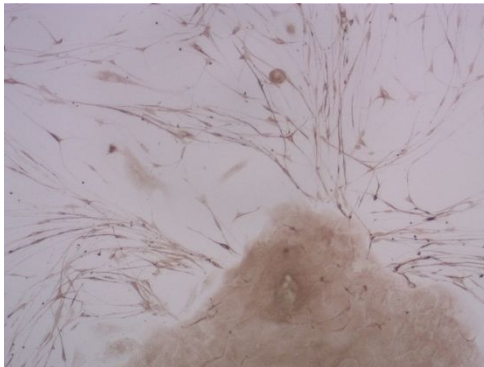


Fig1a

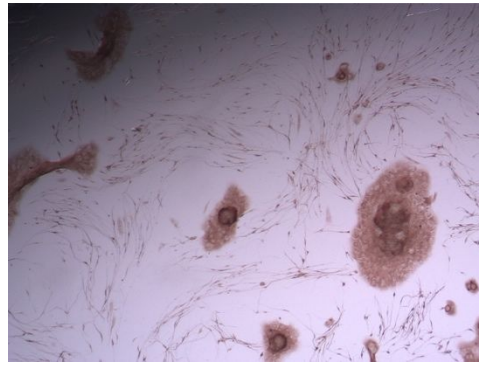


Fig1b

TRPV4 は皮膚細胞および神経細胞双方において陽性所見を認めたが、振盪群においては皮膚細胞により強く認められた。また、振盪群においては well の中央部に皮膚ケラチノサイトの一部剥脱が認められた。

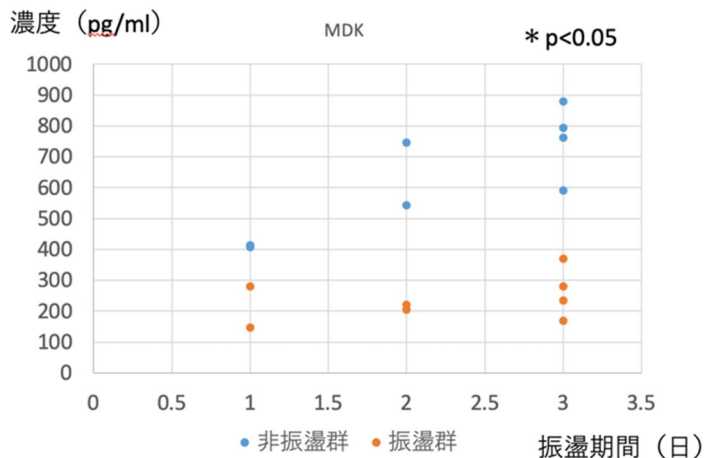


Fig2a

MK の培地内の濃度は振盪 3 日目において非振盪群が振盪群より有意に高かった。

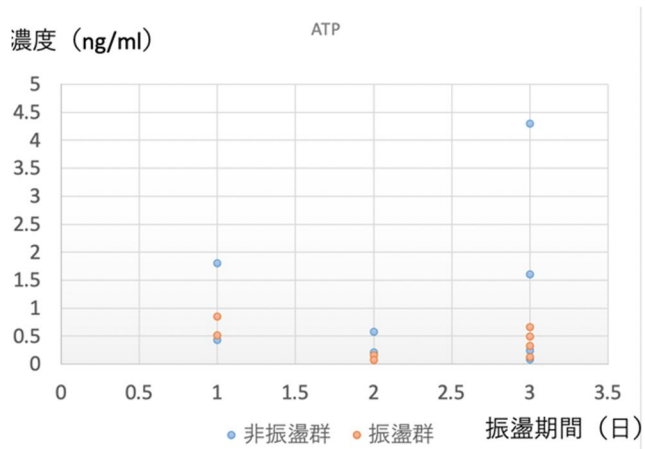


Fig2b
ATP については有意差が認められなかった。

以上の結果から振盪刺激により皮膚細胞の TRPV4 の発現が促進される可能性が示唆された。またモデル内で想定した神経皮膚細胞間の伝達物質のうち、ATP は振盪刺激による影響を受けず、MK の分泌は振盪により減少することが示唆された。

【振盪機を用いた物理的刺激による各種因子の検討 その2】
神経細胞単独と神経細胞・ケラチノサイト共培養の振盪あり・なしを比較。

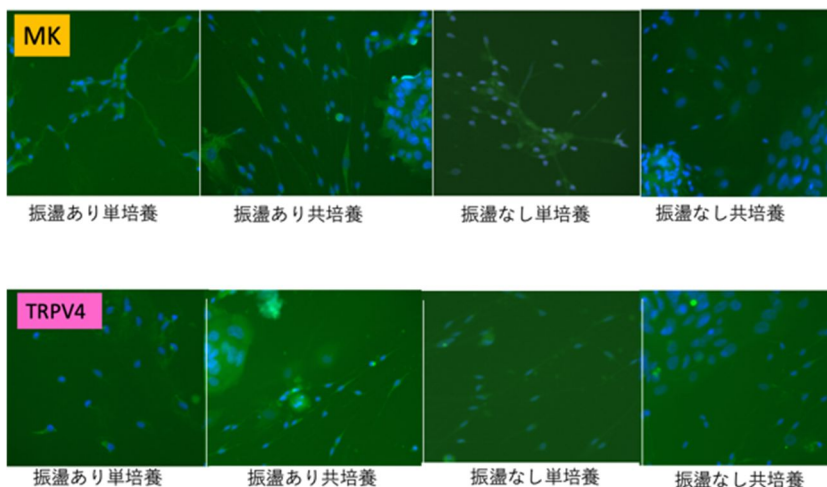


Fig3a MK, TRPV4 の蛍光免疫染色
MK の発現は共培養群でより強く認めた。また非振盪群では神経細胞で染色が弱かった。TRPV4 の発現は振盪群で強く認めた。

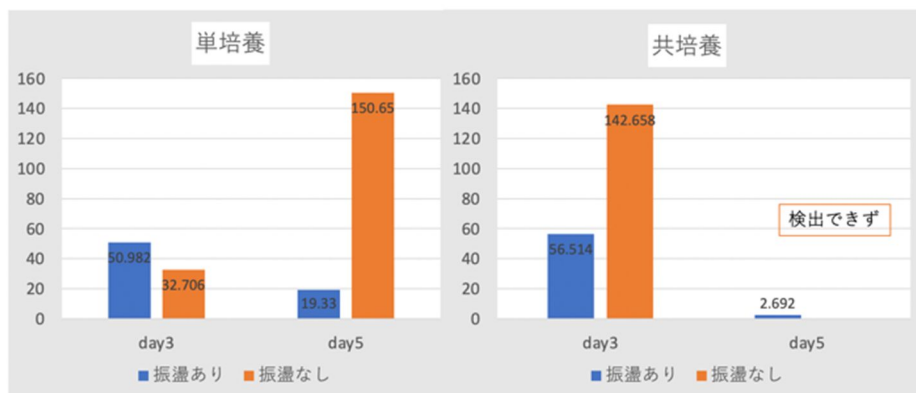
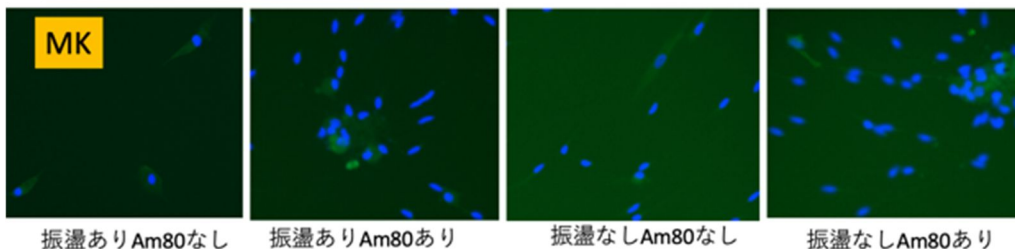


Fig3b MK の ELISA 分析
共培養群では単独培養群と比較して MK 濃度が高い傾向にあった。振盪あり群では日数を経るにつれ、濃度が下がった。

【神経細胞培養モデルにおける Am80 添加の検討】

結果：②Am80添加培養 MK染色



結果：②Am80添加培養 Am80添加の有無における神経突起伸長の比較

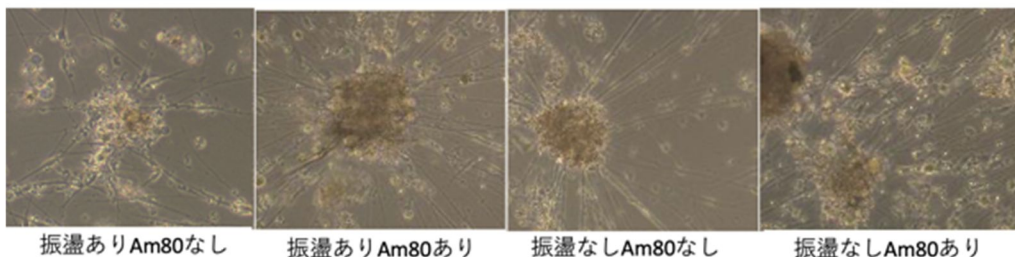


Fig4a
Am80 添加群で、より密度の高い神経細胞の突起伸長を認めた。

結果：②Am80添加培養 MK濃度

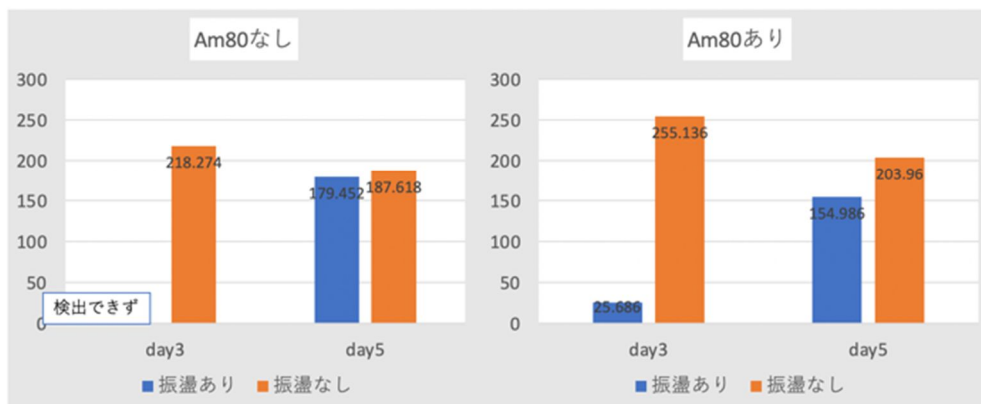


Fig4b
振盪なし群は日数を経るにつれ、MK 濃度が下がり、MK の発現は Am80 添加群でやや高くなった。

結語

皮膚と神経の相互作用のうち、TRPV4 と MK について振盪機を用いた物理的刺激の検討を行い、さらに Am80 について MK を介した神経再生を検討した。本研究により TRPV4 は振盪刺激により皮膚細胞での発現が促進される可能性が示唆された。MK は神経細胞、皮膚細胞共培養群で高い発現を認め、その関与が示唆された。MK は振盪刺激によって減少した。Am80 (10 μM) 添加は神経細胞の突起伸長・高密度化を促したが、MK 濃度への影響は軽微であった。

これらは過去の報告の追試、および新知見となりうる結果であった。TRPV4 については追試の域を出なかったが、MK の所見は新知見になりうる。また Am80 については MK への影響は軽微にも関わらず神経突起の伸長が見られ、他の要素の可能性も示唆された。皮膚の知覚再建・再生にはいまだ不明な点が多いが、本研究はケラチノサイト・神経細胞の相互作用、さらに物理刺激を加えた点、またミッドカインおよび Am80 の神経再生にケラチノサイト・神経細胞の相互作用と絡めた点で新規性があり、細胞の相互作用と物理刺激を多面的に捉えた研究となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上牧子、森 弘樹、ほか
2. 発表標題 皮膚・神経相互作用における TRP チャンネルとミッドカインの役割の解明(第 1 報)
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤小百合, 森 弘樹, ほか
2. 発表標題 皮膚・神経相互作用におけるTRPチャンネルとミッドカインの役割の解明～第2報～
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会総会.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植村 法子 (UEMURA Noriko) (10568017)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教 (12602)	
研究分担者	田中 顕太郎 (TANAKA Kentaro) (20569503)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------