

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：33936

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19715

研究課題名(和文)高齢者における皮膚潰瘍・褥瘡に対する効果的治療法・予防法の開発

研究課題名(英文)Studies on the Pathophysiological role of TRPV3 in skin wound healing and pressure ulcers

研究代表者

讃井 真理 (Sanai, Mari)

人間環境大学・松山看護学部・教授

研究者番号：20412330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚欠損及び皮膚潰瘍・褥瘡モデルにおいて、TRPV3活性化薬の創傷周囲の皮内投与及び塗布により、新生血管に富む良質な肉芽形成と創面積の縮小の亢進を認め、同時に強い掻痒反応(引掻き・噛付き反応)も惹起された。in vitroスクラッチアッセイにおいても創傷治癒の促進傾向にあった。さらに、皮膚TRPV3は生体皮膚温(～32℃)では十分に活性化されない可能性を示唆した。現在、創傷治癒促進と掻痒を区別するに至っていない。TRPV3の創傷治癒促進作用と掻痒を別々に制御することができれば、難治性潰瘍や難治性褥瘡に対して新しい治療法、医薬品の開発、臨床応用に大きく貢献できることが予測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、TRPV3アゴニストの創傷治癒促進作用と掻痒を区別して制御することが可能となれば、TRPV3アゴニストを低含有量としつつ、十分な血行促進作用・抗炎症作用を発現し、かつその持続時間の延長を可能とする皮膚刺激性の低い治療薬を提供できれば、褥瘡や難治性潰瘍の発生、拡大を防ぐことができる画期的な治療法・予防法の開発が期待できる。加えて、将来的に看護・介護臨床現場に革新的な変化をもたらす新しい技術・素材の製品化・具現化できる可能性を秘めており、産学連携事業への進展も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of TRPV3 on wound healing. Intradermal administration and application of TRPV3 activator to the periwound area in skin defect, skin ulcer, and pressure ulcer models resulted in the formation of high quality granulation rich in neovascularization and accelerated wound atrophy, and at the same time, a strong pruritic reactions (scratching and biting) was also evoked. In vitro scratch assay also showed a tendency to accelerate wound healing. Furthermore, we have obtained data suggesting that skin TRPV3 may not be sufficiently activated at the skin temperature (<32°C) of the living body. We are currently investigating the effective use of TRPV3 activator, but we have not yet been able to distinguish between wound healing and pruritus. If we can control wound healing and pruritus of TRPV3 separately, it will contribute to the development of new therapies, drugs and clinical applications for intractable ulcers and pressure ulcer.

研究分野：高齢者看護学

キーワード：難治性皮膚潰瘍 褥瘡 TRPV3 褥瘡治療薬 予防法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急速に進む高齢社会を背景に在宅医療が推進されるにあたって皮膚障害や褥瘡への対策は重要な課題である。加齢による様々な変化(脂肪・筋肉量の低下, 骨突出, 免疫能低下, 知覚低下, 創傷治癒力低下など)によって高齢者では褥瘡が生じやすく治りにくい。超高齢化社会のわが国においては, 褥瘡患者数は増加し, 褥瘡の予防・治療・管理の重要性が高まっている。

ほとんどの褥瘡治療の臨床試験において治療の有効性に関するエビデンスも示せていないのが現状で, エビデンスに基づいた治療法の開発が求められている。褥瘡を含め, 創傷の治癒がどのように進んで行くかは同じであり, 違うのは傷の成り方や見た目, 傷の治癒を傷害する因子があるかどうかである。一般的な創傷の治癒過程をみると, (1)出血凝固期, (2)炎症期, (3)増殖期, (4)成熟期の4段階に分類される。(1)~(4)の過程すべてが巧みな仕組みでコントロールされ, そのコントロールには様々な成長因子が大きく関与している。慢性創(難治創)では, この流れ(特に(2))が何らかの原因で障害されて治癒が遅延したものと考えられている。全ての難治創では炎症を持続させる要因があり, これらの傷を治すには炎症期をもう一度しっかりと立ち上げ, 終了させることが重要との発想に至った。

組織創傷は創傷部の細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす。これは創傷治癒の初期に必要なイベントであることが知られている。細胞内 Ca^{2+} シグナルは上皮細胞の遊走・増殖に必要であり, 創傷の閉鎖に重要な役割を果たす(Lansdown, *Wound Repair Regen.* 10, 271-285, 2002)。しかし, 創傷における Ca^{2+} 流入の分子メカニズムは明確になっていない(Yonei and Hadzaejva, *Glycative Stress Research* 6(2):113-125, 2019)。TRPV3は暖かい温度(32~39℃)で活性化される Ca^{2+} 透過性非選択的カチオンチャネルで, 皮膚ケラチノサイトにおいて豊富に発現しており, 皮膚バリア機能, ケラチノサイト増殖, 皮膚ホメオスタシス, および毛髪の形態形成に機能している可能性が示唆されている(Sulk and Steinhoff, *TRP Channels as Therapeutic Targets* 293-323, 2015)。さらに, TRPV3の機能獲得型変異は, 手足および開口部周辺の角質の異常増殖(角皮症), 脱毛, 激しいかゆみや痛みを伴う Olmsted 症候群の原因遺伝子として同定されている(Eytan et al., *J Invest Dermatol.* 134:1752-1754, 2014)。

近年, TRPV3が口腔創傷の治癒に深く関わっていることが遺伝子欠損マウスの研究から明らかにされた(Aijima et al., *FASEB J* 29(1):182-192, 2015)。これらの知見はTRPV3をターゲットとした難治性創傷の治療に新しい治療法開発の可能性を示唆するものである。同様のアプローチを皮膚に対して応用することで褥瘡や火傷, 手術瘡などの創傷や抗がん剤治療や糖尿病の合併症などによる難治性口内炎や創傷後の粘膜治癒不全の改善が期待できる。

TRPV3は温度, 合成小分子化学物質(2-aminoethoxy diphenylborate (2APB)), および植物からの天然化合物(Comphor, Carvacrol, Thymol, Incensoloe acetateなど)によって活性化されることが知られている。その機能は, 細胞外二価陽イオンや細胞内酸性化, 膜電位, メバロン酸経路の中間代謝物である Farnesyl pyrophosphate (FPP) やコレステロール, アラキドン酸(AA)及びその他の不飽和脂肪酸, Gq タンパク共役型 GPCRs の活性化を介した細胞内情報伝達因子などのさまざまな生理学的要因によって調節されている。加えて, TRPV3は熱刺激や活性化刺激により感作され, 繰り返される刺激で徐々に反応が大きくなる特徴を有している。TRPV3の機能を負に調節する物質としては, ω -3 多価脂肪酸に由来する 17(R)-Resolvin D1 や Ruthenium red (RR), diphenyltetrahydrofuran (DPTHF), Isopentenyl pyrophosphate (IPP), Ca^{2+} -Calmodulin, PI(4,5)P2, 細胞内 ATP, Mg^{2+} などが知られている。しかし, これら TRPV3 リガンドには特異性に問題がある(Broad et al., *Pharmaceuticals* 9(3):55, 2016)。

2. 研究の目的

本研究は, TRPV3に焦点を当て, TRPV3アゴニストの創傷治癒効果の実証, 難治性創傷の発症と進展におけるTRPV3の関与, TRPV3の作用様式の詳細な検証, 適切な治療薬の使用法の理解より, 高齢者の皮膚潰瘍・褥瘡治癒に有用な新しい治療法と新規治療薬開発の礎を構築し, 新たな治療戦略の可能性を提供することを目的として企図した。

3. 研究の方法

試験薬物: TRPV3活性を修飾する薬物としては多くの薬物が知られているが, 特異的なアゴニストやアンタゴニストは開発されていない。薬物はすべて市販の試薬グレードの物を使用した。

実験動物: 実験には生後8~15週齢, 35~45gのddY系雄性マウスを用い, 室温 $22 \pm 1^{\circ}C$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 12時間の明暗サイクルの環境下で飼育した。飼料と水は自由に摂取させた。動物実験は「広島大学自然科学研究支援開発センター動物実験施設倫理委員会」の承認を受け(承認済番号 A19-36, A19-38), 「動物実験に関する日本薬理学会指針」並びに「広島大学動物実験等規則」に遵守して実施した。研究は観察者に処置群を判別できない環境下で行った。

創傷治癒実験

マウス背部皮膚全層欠損創モデルの作製:三種混合麻酔薬 (medetomidine 0.3 mg/kg, midazolam 4 mg/kg, butorphanol 5 mg/kg) 麻酔下にマウスの背部をバリカンで剃毛し, さらに除毛クリームを使用して除毛した。翌日, 生検トレビンで背部に直径 4 mm の皮膚全層欠損創を作成した。薬物は毎日 1 回, 創部に滴下投与 (創傷 1 か所あたり 0.05 ml) あるいは皮下投与し, 被覆材 (テガダーム) で保護した。対照は vehicle とした。創面積の縮小率 (創面積治癒率) を比較した。

皮膚虚血再灌流による褥瘡性潰瘍マウスモデルの作製:マウスを馴化後に麻酔下にて, バリカンと除毛クリームで除毛を行った。背部正中皮膚を持ち上げて, マグネットプレート (直径 9.5 mm x 厚さ 0.9 mm, 吸着力 0.766 kgf) 2 個で挟み (虚血) 12 時間後に, マグネットを外し, 12 時間再灌流した (装着 8 時; 脱着 20 時)。このサイクルを 3 日間繰り返し, 褥瘡を作成した。褥瘡作製時, 鎮痛薬としてブプレノルフィン (2 mg/kg) を皮下投与した。なお, 褥瘡作製時は個別飼育を行った。褥瘡作製については (Stadler et al., *J. Int. Surg.* 17(4):221-227, 2004) に準拠した。

褥瘡様皮膚潰瘍マウスモデルの作製:Gonul ら (1993) の方法に準拠し, 褥瘡様皮膚潰瘍モデルマウスを作製した。マウスを麻酔下で背部および大腿部を剃毛した。両側の坐骨神経を抽出後, 坐骨神経を大腿中央部よりやや遠位で切断した。切断部より遠位の坐骨神経を約 3mm 切除して神経の連続性を完全に絶った後に, 周辺の筋や結合組織をもとの状態に戻し, 縫合糸で皮膚切開創を縫合した。床敷きを敷かないケージにマウスを個別に飼育し, マウスの踵部位に褥瘡様皮膚潰瘍を発症させた (Gonul et al., *Prostaglandins* 45:153-157, 1993)。

糖尿病マウスの皮膚創傷モデル:Streptozotocin (STZ, 200 mg/kg) を 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.1) に溶解して, マウス尾静脈から静脈内投与した。血液中のグルコース濃度が 400 mg/dl 以上を糖尿病モデルマウスとして使用した。糖尿病マウス背部に皮膚全層欠損を 2 ヶ所作成し, 皮膚潰瘍モデルとした。

創傷部血管新生の測定:マウス創傷部の血管新生量について毛細血管スコープ GOKO Bscan-Z (GOKO 映像機器株式会社) を用いて観察した。

マウスケラチノサイトの単離培養:マウス新生児皮膚を摘出し, PBS で wash 後, Dispase (5 mg/ml) を含む PCT 培地 (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG. #CnT-07) 中で 4°C, 一晚 (15 時間以上) インキュベーションを行った。余分な Dispase を PCT 培地で wash した後, 皮膚組織を PCT 培地中で表皮 (白色・半透明) と真皮 (桃色・不透明) に分離した。表皮を TrypLE Select (Gibco) で 37°C, 10 分間インキュベーションし, セルストレーナーを通して細胞を単離した後, 10 cm dish に播種した。二日ごとに medium を交換し, 継代をする場合はコンフル前 (80% 前後) に行った。

スクラッチアッセイによる *in vitro* 創傷治癒活性の測定:細胞培養用の 6 ウエルプレートに 1 ウエルあたり 250,000 個の細胞を播種し, 1 晩培養した後, 培地を交換し, さらに 2~3 日培養を行った。各ウエルの細胞が単層コンフルエント状態になったことを確認した後, 200 μ l 用のマイクロピペットチップを用いて, スクラッチを適用した。ウエルを PBS で 2 回洗浄し剥れた細胞を除去した後, TRPV3 modulator を添加した培養液に交換し, 1 日, 2 日, 3 日間培養した。培地を除去し, PBS で洗浄後, 3% ホルムアルデヒドで細胞を固定後 0.1% クリスタルバイオレットで染色し, オープンギャップ部分に移行した細胞数を計測した。コンフルエント状態の単層とは細胞密度の異なる, 細胞-細胞間に隙間のあるものを移動細胞とみなした。

細胞増殖, 細胞毒性の測定:細胞培養用の 96 ウエルプレートに 1 穴あたり 10,000 個の細胞を播種し, 一晚培養した後, 培地を交換し, もう一晚培養を行った。3 日目に各ウエルの細胞が単層サブコンフルエント状態であることを確認した後, TRPV3 の modulator を添加した培養液に交換し, さらに 1 日~2 日培養した。各ウエルに 10 μ l の cell counting kit-8 (同人化学研究所) を添加し, 37°C で 3 時間インキュベーションを行った。生存細胞が生産する可溶性ホルマゼン色素をマイクロプレートリーダー (波長 450 nm) で吸光度測定し, 生存する細胞数の相対値を求めた。さらに, トリパンブルー染色により死細胞の数をカウントした。

RNA 干渉による皮膚 TRPV3 ノックダウンマウスの作製:RNA 干渉は標的遺伝子の特異配列から 3 種類の siRNA (siRNA#1, siRNA#2, siRNA#3) を作成した。siRNA の非選択的な作用を調べるため 3 塩基の変異を導入した non-targeting siRNA (siRNA#4) を作成した。siRNA のデリバリーは, HVJ-Envelope Vector (Ishihara Sangyo) に封入, およびアテロコラーゲン (KOKEN, Co.Ltd., Tokyo, Japan)・siRNA 複合体をレシピレント動物の患部に局所投与及び貼付した。対照群は, 同一量の non-targeting siRNA および HVJ-Envelope Vector, アテロコラーゲンのみを投与した。

RT-PCR:TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて acid phenol 法によって total RNA を抽出した。逆転写酵素 PrimeSript II RTase (Takara) により, oligo dT primer を用いて相補 cDNA を合成し, これを鋳型に polymerase chain reaction (PCR) を行った。PCR 反応はプライマー (TRPV3_F:ACGGTGGAGAACGTCTCC; R:TGTCCGTCTTATGGGTCC) および Taq polymerase (Takara) を用いて 94°C 30 秒, 58°C 30 秒, 72°C 45 秒を 35 サイクル行った。PCR 増幅物は 2.0% アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色し, 解析した。増幅産物は制限酵素による切断パターンより確認した。

4. 研究成果

創傷治癒における TRPV3 アゴニストの効果:背部皮膚全層欠損創モデルにおいて, 2-APB,

Cpmphor, FPP, AA などの既知の TRPV3 アゴニストおよびモジュレーター適用または同時適用に応じて、肉芽形成および創面積縮小の促進を認めた。TRPV3 アゴニスト適用 3-4 日後から強い引掻き行動、噛み付き行動が見られ、創面の観察が難しくなった。この、引掻き行動、噛み付き行動は TRPV3 活性化による搔痒の発現の可能性が示唆された。

難治性皮膚潰瘍モデルである糖尿病マウス皮膚欠損創モデル、および虚血再灌流による褥瘡性潰瘍モデルにおいても TRPV3 アゴニストは皮膚欠損創モデルと同様の作用が観察された。褥瘡様皮膚潰瘍モデルでは、アゴニスト適用による創傷部位への噛み付き行動がより早期に出現し、創面治癒の観察が困難であった。

創傷部血管新生に対する TRPV3 アゴニストの効果：TRPV3 アゴニストにより肉芽形成の促進を認めた。創傷治癒では、肉芽形成、血管新生および上皮形成がバランスよく行われることが必要とされる。そこで毛細血管スコープを用いて血管新生について検証した。TRPV3 アゴニストを適用した創部では血流も十分確保された毛細血管が明らかに増加していた。新生毛細血管の血流動態についての解析はできなかった。加えて、TRPV3 アゴニストによる肉芽形成と血管新生の亢進は、ATPE-01 (ADAM17 阻害薬, Calbiochem) により抑制されることより、ADAM17 により ectodomain shedding をうける膜型細胞増殖因子や膜型サイトカインの関与を示唆する知見も得ている。

In vitro スクラッチアッセイにおける TRPV3 アゴニストの効果：マウス初代培養ケラチノサイトをを用いた *in vitro* スクラッチアッセイにおいても TRPV3 活性化に依存して創傷治癒が促進される傾向にあった。加えて、TRPV3 アゴニストは *in vivo* 創傷治癒実験で使用した濃度では、培養ケラチノサイトの増殖および細胞死に影響しなかった。

一連の創傷治癒アッセイにより得られた結果から、TRPV3 活性化は新生血管に富んだ良好な肉芽形成を促進し、TRPV3 活性化したケラチノサイトでは細胞遊走が促進されることが明らかになり、組織損傷修復能を向上させる可能性があることが示された。

創傷治癒における TRPV3 アンタゴニストおよび TRPV3 ノックダウンの影響：TRPV3 活性化を阻害する RR, FPP, Iricin などの薬物および創部の TRPV3 ノックダウンにより、TRPV3 アゴニストの作用は抑制された。TRPV3 アゴニストが創傷治癒作用を有することが示唆された。TYRPV3 アンタゴニストおよび TRPV3 ノックダウン単独では、創傷治癒の遅延は認められなかった。Aijima ら (2015) は口腔内の創傷治癒の研究で、TRPV3 ノックアウト動物では野生型に比べ治癒速度が明らかに遅延していることを報告している。これらの知見は、生体での口腔温は平均して 37.2~37.3°C で TRPV3 が十分に活性化されるのに対して、皮膚温 (~32°C) では十分に活性化されない可能性が考えられる。

創傷部位での TRPV3 発現動態：RT-PCR により創傷部位での TRPV3 mRNA 発現動態について検証した。皮膚損傷や褥瘡モデルにおいて、TRPV3 mRNA の発現は創の発生とそれに続く治癒過程で有意に変化しなかった。このことより、創傷の治癒過程に TRPV3 の発現は関与せず、TRPV3 の活性化が必要なが示唆される。

TRPV3 アゴニストの有効な使用法の検証：搔痒に関しては、アトピー性皮膚炎患者の TRPV3 の皮膚レベルは非病変部に比べ、病変部で高く、TRPV3 のレベルがアトピー性皮膚炎の発症に重要であるという報告 (Yamamoto-Kasai et al., *Exp Dermatol.* 22:820-824, 2013)、および本研究で TRPV3 アゴニストにより惹起される搔痒は潜時が 3-4 日必要なことから、アゴニストの反復刺激による感作 (過剰な活性化) が関係する可能性が示唆される。ケラチノサイトは慢性的な痒みの条件下では histamine, TSLP (thymic stromal lymphopoietin), chemokines, cytokines などの多くの炎症性分子を放出し、痒み受容体の感度が高まる。TSLP はアレルギー性炎症のマスタースイッチとされ、喘息やアレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、全身性強皮症などのアレルギー疾患に関与している (Liu, *J Exp Med.* 203:269-273, 2006)。ケラチノサイト由来の TSLP が感覚神経終末の TSLP 受容体を介して直接搔痒を誘発することが明らかになった。Park ら (2017) は熱傷後癒痕のある癒痕では正常組織と比較して TRPV3 と TSLP の発現が高いこと、TRPV3 の活性化は正常及び癒痕ケラチノサイトで TSLP 発現の増加を誘導したことから、TRPV3 は TSLP を介して熱傷癒痕のコントロール不良難治性搔痒に寄与する可能性を示唆している (Park et al., *Int J Mol Sci.* 18(11):2425, 2017)。最近、TSLP に特異的に結合するヒト IgG₂ モノクローナル抗体 Tezepelumab が開発され、コントロール不良重症アトピー性喘息の治療薬として、本邦でも承認申請されている。以上の事実から、TRPV3 の創傷治癒に対する作用と搔痒を区別して制御できる可能性が推察された。

現在、TRPV3 アゴニストの有効な使用法について、アゴニストの量や適用のタイミング、TRPV3 が機能しやすい環境を整える、即ち、創部局所の循環改善薬 (処置) および炎症の終結が期待できる薬物 (白血球の遊走を抑制するような薬物) との併用などについて検討しているが、創傷治癒促進と搔痒を区別するに至っていない。

本研究によって TRPV3 の創傷治癒促進作用と搔痒を区別して制御することが可能となり、そのメカニズムを詳細に解明することができれば、将来、難治性潰瘍や難治性褥瘡に対して新しい治療法、医薬品の開発、臨床応用に大きく貢献できることが予測される。

利益相反：開示すべき利益相反はない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	土肥 敏博 (Dohi Toshihiro) (00034182)	広島文化学園大学・看護学部・教授 (35412)	
研究分担者	森田 克也 (Morita Katsuya) (10116684)	広島文化学園大学・看護学部・教授 (35412)	
研究分担者	新川 雅子 (Shinkawa Masako) (10711236)	広島文化学園大学・看護学部・講師 (35412)	
研究分担者	鈴木 茂樹 (Suzuki Shigeki) (30549762)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	本山 直世 (Motoyama Naoyo) (70509661)	広島大学・医系科学研究科(歯)・専門研究員 (15401)	
研究分担者	酒井 規雄 (Sakai Norio) (70263407)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

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
---------	---------