

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09856

研究課題名（和文）創傷治癒過程における皮膚創部の酸化ストレス耐性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism for Acquiring Oxidative Stress Resistance during the Skin Wound Healing Process.

研究代表者

河合 建一郎 (Kawai, Kenichiro)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80423177

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）：本研究では酸化ストレスに応答するメカニズムとして、Ca²⁺チャネルの一種であるTRPC3に着目し、皮膚線維芽細胞がTRPC3を介して酸化ストレスに感応して酸化ストレス耐性を獲得するメカニズムを解明することを目標としていたが、CRISPR Cas9システムを用いたTRPC3ノックアウト線維芽細胞がうまくできなかったため、TRPC3関連のパイロット研究で得ていた機械的刺激時における線維芽細胞と表皮細胞との相互作用について調査を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷治癒研究は、外傷後の治癒過程を理解し改善するための重要な分野であり、手術後の回復期間の短縮や糖尿病患者など創傷治癒が困難な慢性創傷の治療改善につながり、社会的な負担の軽減にも繋がる。本研究において創傷治癒過程においてTRPCイオンチャネルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on TRPC3, a type of Ca²⁺ channel, as a mechanism responding to oxidative stress. The goal was to elucidate how skin fibroblasts acquire oxidative stress resistance through TRPC3.

However, since we were unable to successfully create TRPC3 knockout fibroblasts using the CRISPR Cas9 system, we conducted an investigation into the interaction between fibroblasts and epithelial cells during mechanical stimulation based on preliminary studies related to TRPC3.

研究分野：形成外科

キーワード：創傷治癒 TRPC3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TRP チャンネルは、直接的あるいは受容体を介して間接的に種々の生理活性物質や刺激により活性化される“センサー”タンパク質である。さらに様々なタンパク質と相互作用することで、自身のイオン流入を細胞内シグナルとして効率的に伝えるシグナル複合体形成の“足場”としても働く。TRP チャンネルを刺激するものには機械的伸展刺激や酸化ストレスなどさまざまなものがある。

創傷治癒に影響を与える因子の一つとして酸化ストレスがある。酸化ストレスは組織障害を引き起こす“悪玉論”で語られることが多いが、酸化ストレスの主体である ROS はシグナル伝達 (ROS/Redox シグナル) にも利用されており、実は生理的に重要な働きも持つ。創部は酸化ストレスの大きい部位であるが、創部において生体がいかに酸化ストレスを避けつつ ROS/Redox シグナルを利用しているかは不明である。

本研究では酸化ストレスに応答するメカニズムとして、TRPC3 に着目する。皮膚線維芽細胞が TRPC3 を介して組織における酸化ストレスに感応し、酸化ストレス耐性を獲得することで組織修復へ導くメカニズムを解明することを当初の目標とした。

2. 研究の目的

ROS-TRP-シグナルカスケードの活性化-ストレス耐性の獲得という創傷治癒過程における TRP の未知の役割の解明により、慢性創傷 (褥瘡や下腿潰瘍) や肥厚性瘢痕に対する TRPC 作動薬/阻害剤などの治療薬の開発が期待される。また、皮膚創部のみならず、他の臓器での線維性炎症疾患においても同様の機構があるかもしれない。TRP を介した新たな創薬といった多分野での研究応用に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

レトロウィルスを用いた TRPC3 過剰発現細胞およびそのコントロール細胞は作成しストック済みであったため本研究ではこれに加えて CRISPR Cas9 システムを用いて TRPC3 ノックアウト細胞を作成し、各種 assay を行う計画となっていた。

しかしながら TRPC3 遺伝子をノックアウトするような CRISPR Cas9 システムのパッケージをリポフェクション法で NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、その後細胞を限界希釈法を用いてクローニングした。しかしながらこの TRPC3 ノックアウト線維芽細胞が研究最終年度に至るまでどうしてもうまくできなかった。

このため、最終年度に研究の方向性を修正し、これまでに得ていた創傷治癒における TRPC3 の役割についての知見について掘り下げて研究を行い、成果を出すことに目標を変更した。具体的には、TRPC3 関連のパイロット研究で得ていた機械的刺激時における線維芽細胞と表皮細胞との相互作用について調査を行った。

4. 研究成果

(1) 伸展刺激を加えた HaCaT 細胞からの調整培養液は FPCL の収縮を促進する

皮膚創傷に対する周期的な伸縮は瘢痕収縮を引き起こすことが知られており、線維芽細胞と角化細胞が相互作用して創傷治癒プロセスを調整すると考えられている。皮膚創傷の微小環境を模倣するために、分離されたヒト皮膚線維芽細胞をタイプ I コラーゲンマトリックスに埋め込み、線維芽細胞集合コラーゲン格子 (FPCL) を作成した。その後、24 時間の反復的な伸展負荷を受けた角化細胞からの調整培養液で FPCL を培養した。調整培養液で調整された FPCL は、コントロールの FPCL よりも顕著に収縮が増加した (図 1)。

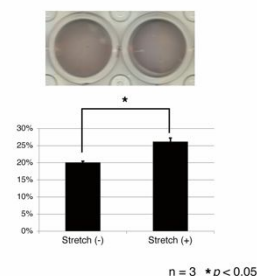


図 1

(2) エンドセリン-1 は TRPC3 過剰発現 FPCL の収縮を促進する

角化細胞は周期的な伸縮に反応してエンドセリン-1 を生成します¹。TRPC チャンネルがエンドセリン受容体と結合し、外部からのエンドセリンによる刺激でカルシウム流入を誘発するため、エンドセリン-1 は TRPC3 チャンネルを介して線維芽細胞に影響を与える可能性があると考えられた。以前作成された TRPC3 過剰発現線維芽細胞² とコントロール線維芽細胞にエンドセリン-1 を添加すると、TRPC3 過剰発現線維芽細胞の FPCL の収縮率が増加した。さらに、この収縮効果は TRPC3 特異的阻害剤 (Pyr3) とエンドセリン拮抗剤 (PD142893) の添加によって減少した (図 2)。

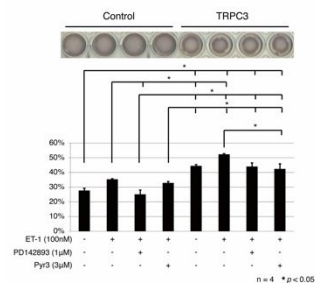


図 2

(3) 人間の肥厚性瘢痕組織における TRPC3 およびエンドセリン受容体 B の発現が増加する

以前の研究²では、人間の肥厚性瘢痕組織における TRPC3 の発現が通常の皮膚と比べて増加していた。肥厚性瘢痕組織におけるエンドセリン受容体の発現レベルも増加しているかどうかを調べるために、手術で切除されたヒトの肥厚性瘢痕サンプルを調査した。人間の肥厚性瘢痕および隣接する正常皮膚組織を切除し、エンドセリン受容体 A (EDNRA) および B (EDNRB) の発現レベルを免疫組織化学を用いて調査した。EDNRB の発現レベルは人間の肥厚性瘢痕組織で増加していたが、EDNRA の発現は通常の皮膚とほとんど変化はなかった (図 3)。

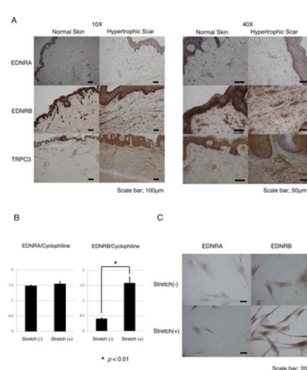


図 3

(4) ヒト線維芽細胞では周期的な伸縮により TRPC3 および EDNRB の発現が増加する

肥厚性瘢痕は、創傷が繰り返し伸縮されるエリアで発生する傾向がある。以前の研究²では、線維芽細胞の周期的な伸縮が TRPC3 の発現を増加させていた。今回、線維芽細胞の周期的な伸縮がエンドセリン受容体の発現も増加させるかどうかを調査した。ヒト初代培養線維芽細胞を、24 時間にわたって 1 分間に 10 サイクルの頻度で繰り返し伸縮し、その後リアルタイム PCR および免疫組織化学分析を行った。細胞の周期的な伸縮は EDNRB の mRNA 発現を増加させたが、EDNRA の発現には顕著な効果がなかった。この結果は、反 EDNRA および EDNRB 抗体を使用した免疫組織化学によっても確認した (図 3)。

(5) TRPC3 過剰発現線維芽細胞における周期的な伸縮は NFATc4 を活性化する

TRPC3 は calcineurin/NFATc 経路を通じて機械的ストレス変換因子として機能すると考えられている。したがって、TRPC3 過剰発現線維芽細胞において伸縮刺激が NFATc をより活性化するかどうかを分析した。Western Blot 分析によって周期的な伸縮が TRPC3 過剰発現線維芽細胞において NFATc4 の産生を引き起こすことを示した (図 4)。

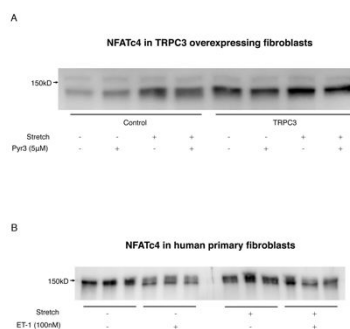


図 4

(6) 伸縮された線維芽細胞における NFATc4 はエンドセリン-1 を介して活性化される

エンドセリン-1 の効果が TRPC3 を介して媒介されるかどうかをテストするために、人間の初代

線維芽細胞を伸ばし、エンドセリン-1を添加した。エンドセリン-1の添加により、伸ばされた線維芽細胞においてNFATc4がアップレギュレートされることが示された(図4)。

(7) TRPC3 過剰発現線維芽細胞の移植は創傷収縮を加速する

TRPC3の創傷治癒における効果を、マウス皮膚創傷モデルを使用して調査した。TRPC3 過剰発現線維芽細胞をマウスの背部皮下に移植した。移植後10日目、6mmパンチバイオプシーを使用して皮膚全層欠損創を作成した。最初の24時間後の創傷閉鎖率は、TRPC3 過剰発現線維芽細胞を移植されたマウスでは、コントロールマウスおよび生理食塩水で移植されたマウスに比べて著しく速く、7日目までに、TRPC3 過剰発現線維芽細胞で移植されたマウスはコントロールよりも早く治癒した(図5)。

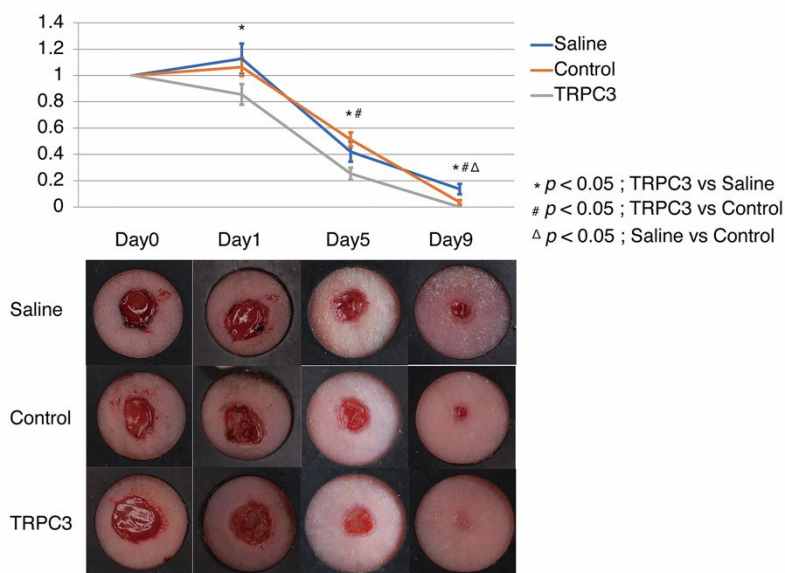


図 5

引用文献

M. Kurita, M. Okazaki, T. Fujino, A. Takushima, K. Harii, Cyclic stretch induces upregulation of endothelin-1 with keratinocytes in vitro: possible role in mechanical stress-induced hyperpigmentation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 409 (2011) 103-107.

H. Ishise, B. Larson, Y. Hirata, T. Fujiwara, S. Nishimoto, T. Kubo, et al., Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFκB activation, *Scientific Reports*. (2015) 1-15.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawai K, Ishise H, Kubo T, Larson B, Fujiwara T, Nishimoto S, Kakibuchi M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Stretching Promotes Wound Contraction Through Enhanced Expression of Endothelin Receptor B and TRPC3 in Fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery Global Open	6. 最初と最後の頁 e4954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/GOX.0000000000004954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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	久保 盾貴 (Kubo Tateki) (00362707)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	藤原 敏宏 (Fujiwara Toshihiro) (00423179)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	西本 聡 (Nishimoto Soh) (30281124)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	石瀬 久子 (Isihise Hisako) (30567194)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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	垣淵 正男 (Kakibuchi Masao) (50252664)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

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