

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18071

研究課題名（和文）皮膚創傷治癒におけるTRPA1カチオンチャンネルと一酸化窒素の役割と相互作用

研究課題名（英文）The Role and Interaction of TRPA1 Cation Channels and Nitric Oxide in Skin Wound Healing

研究代表者

村田 鎮優（Murata, Shizumasa）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90838294

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：創傷治癒は重要なプロセスであり、TRPA1というタンパク質がそのメカニズムに深く関わっています。TRPA1を欠損させたマウスでの研究により、創傷治癒の遅延や肉芽組織形成の抑制が確認されました。この発見は、創傷治療の新たなターゲットとしてTRPA1の重要性を示しています。将来的には、治療法の開発により、特に糖尿病や慢性創傷患者の治癒促進に貢献できる可能性があります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、TRPA1カチオンチャンネルが皮膚創傷治癒において重要な役割を果たすことを示しています。TRPA1の欠損が肉芽組織形成や再上皮化を遅延させ、マクロファージの浸潤や線維芽細胞の機能に影響を与えることが明らかになりました。これにより、創傷治癒におけるTRPA1の新たな治療標的としての可能性が示唆されます。社会的には、創傷治癒を促進する新しい治療法の開発につながり、特に糖尿病や慢性創傷を持つ患者に大きな利益をもたらす可能性があります。

研究成果の概要（英文）：This study examined if the loss of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) affects skin wound healing in mice. We evaluated granulation tissue formation by myofibroblasts and macrophages, re-epithelialization, and related gene expression. Using TRPA1-null (KO) and wild-type (WT) C57BL/6 mice, we created two full-thickness excision wounds (5.0 mm diameter) on their dorsal skin. Healing was assessed via macroscopic observation, histology, immunohistochemistry, and RT-PCR at specific intervals. TRPA1 KO delayed granulation tissue formation and re-epithelialization, suppressed myofibroblast appearance, macrophage infiltration, and mRNA expression of SMA, F4/80, and Col-1. These results indicate that TRPA1 is crucial for skin wound healing in mice, as its absence delays macrophage infiltration and subsequent fibrotic tissue formation, impairing fibroblast fibrogenic behavior.

研究分野：整形外科

キーワード：創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷の迅速な治癒は、細菌汚染、水分損失、瘢痕形成を防ぐために重要です。軟部組織の治癒は、褥瘡、糖尿病創傷、開放骨折、広範な軟部組織損傷、および感染症の治療成功率に影響します。皮膚創傷治癒の完全な理解は、創傷治癒障害を克服するための戦略を確立するために必要です。創傷治癒は、炎症期、増殖期、再構築期の三段階に分かれ、各段階で異なる細胞や因子が関与します。特に、TRP チャンネルが感覚伝達を媒介し、多様な刺激に応答することが知られています。その中でも TRPA1 は、局所組織の炎症制御に関与しており、角膜上皮の創傷治癒に関与することが示されています。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TRPA1 が皮膚創傷治癒においても重要な役割を果たすかどうかを明らかにすることです。TRPA1 欠損マウスを用いて、皮膚創傷治癒プロセスへの影響を評価しました。具体的には、円形全層切除創の閉鎖率を定期的に観察し、組織学的解析、免疫組織化学、および mRNA 検出を通じて定量的に評価しました。これにより、TRPA1 の欠損が創傷治癒に及ぼす影響を明らかにし、将来的な治療戦略の基礎を築くことを目指しています。

3. 研究の方法

本研究は、和歌山県立医科大学の動物実験倫理委員会および DNA 組換え実験委員会の承認を受けて実施されました。8~10 週齢の TRPA1 欠損 (KO) および野生型 (WT) の C57BL/6 マウスを使用しました。麻酔はメドミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの混合物を腹腔内注射することで行いました。マウスの背中に直径 5.0mm の全層切除創を無菌生検トレフィンと手術用メスを用いて 2 つ作成しました。手術後、創部には毎日オフロキサシン軟膏を塗布し、痛みや感染症の兆候を監視しました。

肉眼観察

14 匹のマウス (KO 7 匹、WT 7 匹) の創部を特定の間隔 (0、1、3、6、8、11、14 日後) で撮影し、残存創面積の割合を Photoshop で計算しました。

組織学的評価

56 匹のマウス (KO 28 匹、WT 28 匹) を特定の時間間隔 (3、6、8、11 日後) で安楽死させ、創傷組織を収集しました。収集した組織は 4.0%パラホルムアルデヒドに固定し、パラフィンに埋め込みました。組織切片 (厚さ 5 μ m) はヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・ゴールドナー三重染色で染色し、肉芽組織の厚さと再上皮化を評価しました。

免疫組織化学分析

再生組織の細胞成分を評価するため、6 日および 8 日後に免疫組織化学分析を行いました。マクロファージを評価するために F4/80 抗体、筋線維芽細胞を評価するために SMA 抗体を使用しました。創傷の縁と中央からそれぞれ 5 つの視野を選び、KO および WT マウス間で平均値を比較しました。

mRNA 発現の評価

mRNA 発現は創傷後 6 日に評価しました。再生組織から抽出した RNA を逆転写し、リアルタイム RT-PCR で分析しました。GAPDH、TGF- β 1、SMA、F4/80、Col-1 α 2 の発現レベルを KO および WT マウス間で比較しました。

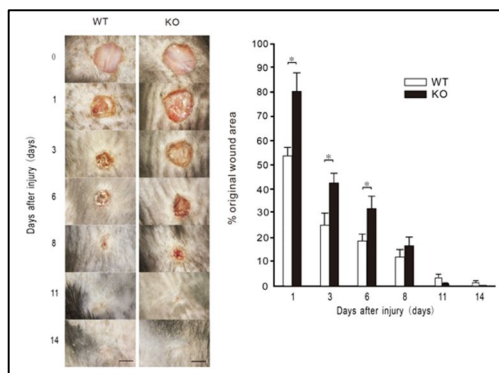
統計解析

ブラインド評価を行い、KO または WT マウスのラベルを知らない人物が各種測定を担当しました。得られたデータは JMP Pro バージョン 16 を用いて統計解析し、有意水準は $p < 0.05$ に設定しました。

4. 研究成果

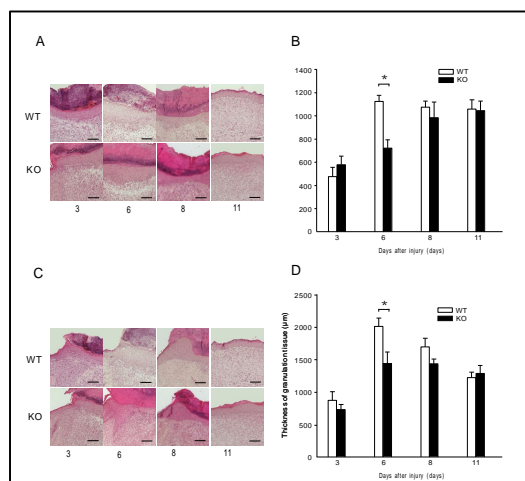
TRPA1 KO マウスにおける皮膚創傷治癒の遅延 (図1)

1、3、6 日目の評価時に残存する創傷面積は、KO マウスと WT マウスで有意に異なりました (それぞれ $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、および $p = 0.048$)。KO マウスでは創傷面積が WT マウスよりも有意に大きく、6 日目には WT マウスの残存創傷面積が元の 19.0% に対し、KO マウスでは約 32.1% でした。8 日目以降、両グループ間に有意な差はなく、11 日目にはほぼ完全に治癒していました。これらの観察結果は、TRPA1 の欠如が初期の創傷治癒プロセスを遅延させることを示しています。



新しい肉芽組織の形成に対する TRPA1 KO の影響 (図2)

HE 染色を用いた組織学的観察により、6 日目に KO マウスの中心部および周縁部の肉芽組織の厚さが WT マウスよりも有意に小さいことが確認されました (中心部: KO 720 μm 、WT 1123 μm 、 $p = 0.001$ 、周縁部: KO 1437 μm 、WT 2007 μm 、 $p = 0.023$)。これらの結果は、TRPA1 が皮膚創傷治癒の初期段階で重要な役割を果たしていることを示しています。



TRPA1 の欠如によるケラチノサイトの再上皮化遅延

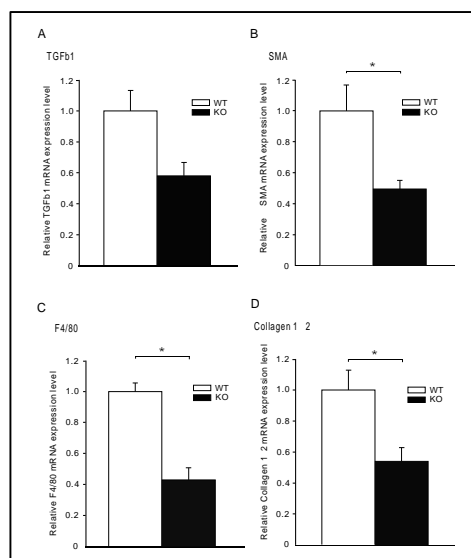
1 日目には再生上皮が観察されず、3 日目には再上皮化が見られたものの、KO マウスと WT マウスで有意差はありませんでした。しかし、6 日目には KO マウスでの再上皮化が WT マウスよりも有意に遅延していました (59.7% vs. 74.5%; $p = 0.013$)。8 日目以降、両グループ間の再上皮化に有意差はなく、11 日目には両グループで完全に再上皮化が完了していました。これらの結果は、TRPA1 の欠如が皮膚創傷治癒中のケラチノサイトによる再上皮化を遅延させることを示唆しています。

TRPA1 の欠如によるマクロファージ浸潤と筋線維芽細胞形成の抑制

免疫組織化学的評価により、8 日目の F4/80 標識マクロファージの浸潤が KO マウスで有意に減少していることが確認されました ($p = 0.017$)。また、6 日目と 8 日目の筋線維芽細胞の SMA 発現も KO マウスで有意に減少していました ($p < 0.0001$)。これらの結果は、TRPA1 の欠如が創傷治癒プロセス中のマクロファージ浸潤と筋線維芽細胞形成を抑制し、肉芽組織の形成と上皮再生を阻害することを示唆しています。

創傷治癒関連遺伝子の発現変化 (図3)

リアルタイム RT-PCR を用いて、6 日目に再生組織での TGF- β 1、SMA、F4/80、およびコラーゲン 1、2 の mRNA 発現を評価しました。TGF- β 1 の mRNA 発現は統計的に有意差はありませんでしたが、KO マウスで減少傾向が見られました ($p = 0.060$)。SMA の mRNA 発現は KO マウスで有意に低く ($p = 0.049$)。F4/80 およびコラーゲン 1、2 の mRNA 発現も KO マウスで有意に抑制されていました (それぞれ $p = 0.003$ および $p = 0.043$)。これらの結果は、TRPA1 の欠如が創傷治癒に与える遺伝子の発現を変化させ、治癒プロセスを遅延させることを示しています。



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 Murata Shizumasa, Yamanaka Manabu, Taniguchi Wataru, Kajioka Daiki, Suzuki Kentaro, Yamada Gen, Okada Yuka, Saika Shizuya, Yamada Hiroshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Lack of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) retards cutaneous wound healing in mice: A preliminary study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101322 ~ 101322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101322	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
---------------------------	-----------------------	----

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