

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18828

研究課題名（和文）温度感受性TRPチャネルの活性調節による口腔粘膜バリア機能の賦活化

研究課題名（英文）Activation of Oral Mucosa Barrier Function by Regulating the Activity of Temperature-Sensitive TRP Channels

研究代表者

加藤 寛子 (Kato, Hiroko)

大阪大学・大学院薬学研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：70749994

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）：温度で発現や活性が変化するタンパクと免疫応答や皮膚のバリア機能の調節への関与が報告されているが、上皮における温度と免疫、バリア機能の関係については不明な点が多い。最終目標を口腔粘膜における温度応答を解明することとし、上皮細胞における温度と免疫制御、バリア機能の関連を明らかにすることを目的に温度刺激下で三次元培養モデルに生体を模した温度グラデーションを付与した培養を用いて解析を行ったところ、細胞増殖や分化に関わる遺伝子や炎症、免疫関連遺伝子、エネルギー代謝に関わる遺伝子の発現変化がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度刺激そのものが免疫機能の調節やバリア機能亢進に有用であった場合は簡易な治療、予防法の開発に研究成果を応用可能である。また既存の薬剤とは全く異なるメカニズムによる抗炎症製品などの開発や、副作用が少ない薬剤やヘルスケア用品の開発も期待できる。温度のグラデーションや薬剤により厚い上皮が形成された場合は、移植後の組織再建や創傷治癒の観点からも有用であるため、再生医療の技術革新にも貢献することが可能である。

研究成果の概要（英文）：Proteins that change expression and activity with temperature and their involvement in immune response and regulation of skin barrier function have been reported, however, the relationship between temperature, immunity, and barrier function in the epithelium is still unclear. We analyzed three-dimensional culture models with temperature gradients to mimic living organisms under temperature stimulation to elucidate the relationship between temperature and immune regulation and barrier function in epithelial cells. The analysis showed changes in the expression of genes related to cell proliferation and differentiation, inflammation, immunity, and energy metabolism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：温度感受性 上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜や皮膚を含む上皮は生体防御の上で非常に重要な役割を担う臓器であり、その表層を構成する上皮細胞は外的刺激に応答してサイトカインを分泌することで免疫細胞の応答を調節したり、上皮そのものが増殖、分化をすることで機械的な防御機構を高めたりすることで、免疫応答の第一関門の役割を果たしている。そのバリア機能が破綻すると、局所的な炎症性疾患だけでなく、細菌やウイルスによる感染症の誘因にもなり、加齢や全身疾患による宿主側の免疫機能低下などの因子も加わるにより命にかかわる全身疾患の原因ともなる。したがって、上皮細胞がもつバリア機能を高めることがこれらの予防や治療に重要で、特に基礎疾患に罹患しており介護が必要な高齢者にとって副作用が少ない薬剤やヘルスケア用品の開発が必要である。

上皮細胞が刺激を感知するメカニズムのひとつとして知られている一過性受容体電位チャネル Transient receptor potential ion channels (TRP チャネル) は機械刺激、浸透圧、痛み、酸・塩基、酸化ストレスや刺激性化学物質など、様々な刺激で活性化され、細胞内外の環境変化を感知し、細胞内シグナルに変換する機能を持つ。TRP チャネル活性調節の一つとして温度刺激が知られており、温度によりマウスの免疫細胞における免疫応答や皮膚のバリア機能が調節されることが報告されているが、上皮における温度と免疫、バリア機能の関係についてヒト組織、細胞を用いた報告は少なく不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は上皮における温度と免疫、バリア機能の関連を明らかにし、それらを高める温度調節アプローチもしくは薬理学的アプローチを探索することである。

3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜 in vitro モデルの作成

実験に用いた口腔粘膜細胞は、新潟大学医歯学総合病院口腔外科外来で、本研究の実施協力の依頼に対して同意を得た患者から小手術時に得られた正常口腔粘膜組織片を使用した。口腔粘膜組織から上皮細胞を酵素処理により単離し、フィーダー細胞、ウシ下垂体抽出物、ウシ血清を含まない培地である Epilife(Thermo Fisher Scientific)を用いて培養を行った。継代数 P1-3 を用いた。

Kato et al. (2015)の方法を参考にヒト培養口腔粘膜上皮細胞を transwell plate(Corning)に播種し、11日間培養し口腔粘膜 in vitro モデルを作成した。モデルを 25、37、表皮側が 25 度、基底膜側が 37 になる温度勾配モデルをそれぞれの温度で 24 時間培養することで作成した。培養終了後はモデルを 4%パラホルムアルデヒドで固定した。

(2) 皮膚 in vitro モデルの作成

皮膚モデルは J-tec 社のラボサイトエピモデル 12 を購入し、モデルを 25、37、表皮側が 25 度、基底膜側が 37 になる温度勾配モデルをそれぞれの温度で 24 時間培養することで作成した。培養終了後はモデルを 4%パラホルムアルデヒドで固定、もしくは RNA 抽出を行った。

(3) 組織学的評価

固定した組織を通常に従ってパラフィンブロックを作成し、5 μm の厚さの切片を作成することでプレパラートを作成した。

プレパラートを通常に従って HE 染色を行い、顕微鏡下で観察を行った。

(4) マイクロアレイ解析

皮膚 in vitro モデルを NucleoSpin® RNA Plus (MACHERY-NAGEL、740984) を用いて RNA サンプルを得た。これらの RNA サンプルの cRNA 合成、ラベリング、断片化、ハイブリダイゼーションは、GeneChip™ 3' IVT PLUS Reagent Kit(Thermo Fisher Scientific、902416)を用いた。データ解析は、Transcriptome Analysis Console software(Thermo Fisher Scientific)を用いた。

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜と皮膚の in vitro モデルの組織学的解析

口腔粘膜の in vitro モデルはどの実験群においても非常に薄く、温度変化による組織学的変化を観察することは困難であった。皮膚の in vitro モデルにおいては 25、37 培養下では組織や細胞の大きな形態変化はみられなかったが、温度勾配モデルでは組織の厚みが薄くなり、扁平化した細胞が認められた。

(2)皮膚 in vitro モデルの網羅的遺伝子解析

コントロール vs 温度勾配で

変化があるが、コントロール vs 低温では変化がなかった群について検索をすすめた。コントロール vs 温度勾配のみで変化がある 1894 遺伝子とコントロール vs 温度勾配と温度勾配 vs 低温で共通して変化があった 3353 遺伝子を解析対象とした(図 1)。

図 1 の対象遺伝子からコントロールと比較し発現比 2 以上の変化のあった遺伝子の GO 解析を示す(図 2)。Biological process では positive もしくは negative regulation of transcription by RNA polymerase が上位にあり、転写の制御が変化していることが示唆された。Cell migration, regulation of cell shape, actin cytoskeleton organization などの細胞移動や骨格変化などが変化していることが示唆された(図 2(a))。また、cellular component では細胞質や接着斑に局在するタンパクに関する遺伝子が多く検出された(図 2(b))。Molecular function では protein binding, cadherin binding, actin binding などの結合タンパクに関連する遺伝子の発現が増加していた(図 2(c))。また、KEGG pathway では MAPK signaling、HIF-1 signaling、TNF signaling などの経路が変化していることが示された(図 2(d))。

図 1 の対象遺伝子からコントロールと比較し発現比-2 以下の変化のあった遺伝子の GO 解析を示す(図 3)。

Biological process では ribosomal biogenesis, rRNA processing, cell cycle や cell division など細胞の成長や分裂に関連する遺伝子に変化がみられた(図 3(a))。Cellular component では mitochondrion, mitochondrial inner membrane, mitochondrial matrix などミトコンドリアに局在しているタンパクに関する遺伝子に変化が見られた(図 3(b))。Molecular function では RNA binding, protein binding, nucleic acid binding などの結合タンパクに関連する遺伝子の発現が変化していた(図 3(c))。また、KEGG pathway では Metabolic pathway などの経路が変化していることが示された(図 3(d))。

今後はこれらの結果を詳細に解析し、TRP チャネルを含む温度感受性のタンパクの発現や機能と免疫、バリア機能の関連を明らかにし、それらをも高める温度調節アプローチもしくは薬理的アプローチを探索していきたい。

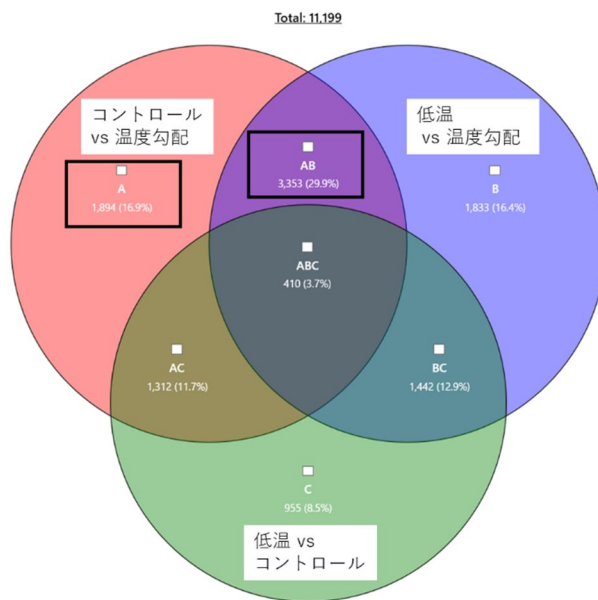


図 1 コントロール、低温、温度勾配条件での遺伝子変化をベン図で示す。黒枠で囲んだ遺伝子を GO 解析対象とした。

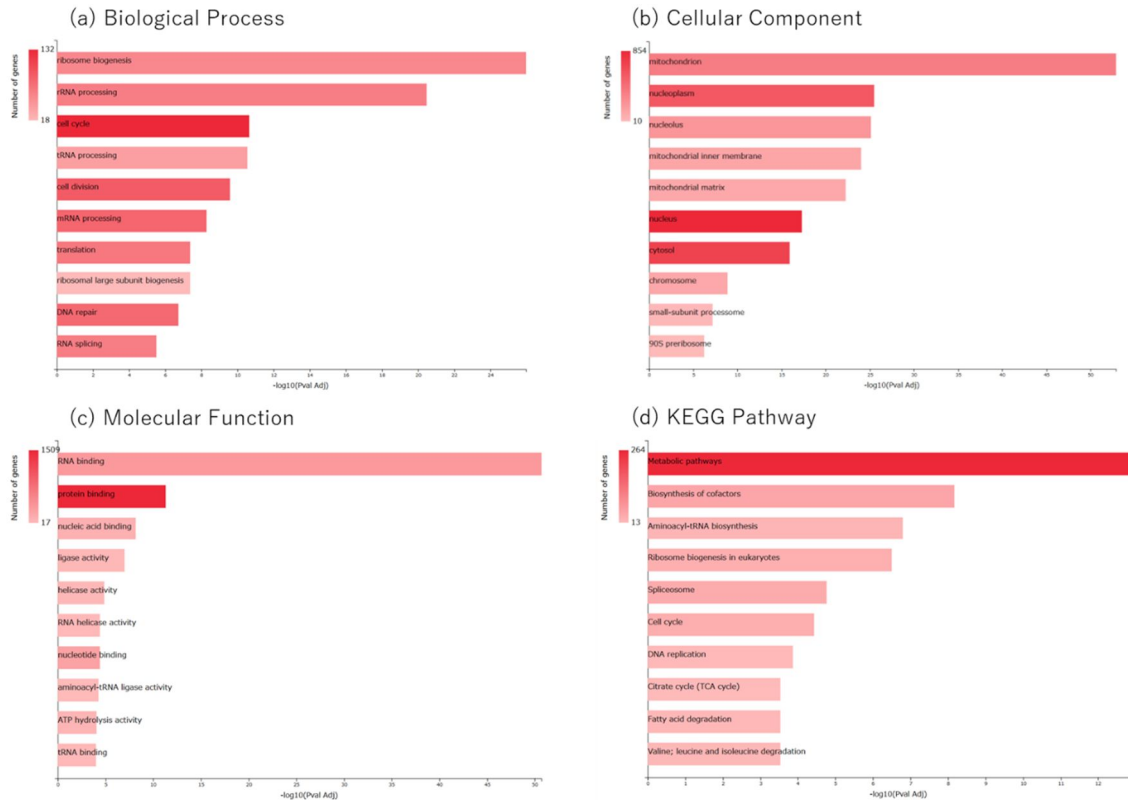


図2 図1の対象遺伝子からコントロールと比較し発現比2以上の変化のあった遺伝子のGO解析を示す。(a)biological process、(b)cellular component、(c)cellular component、(d)KEGG pathway

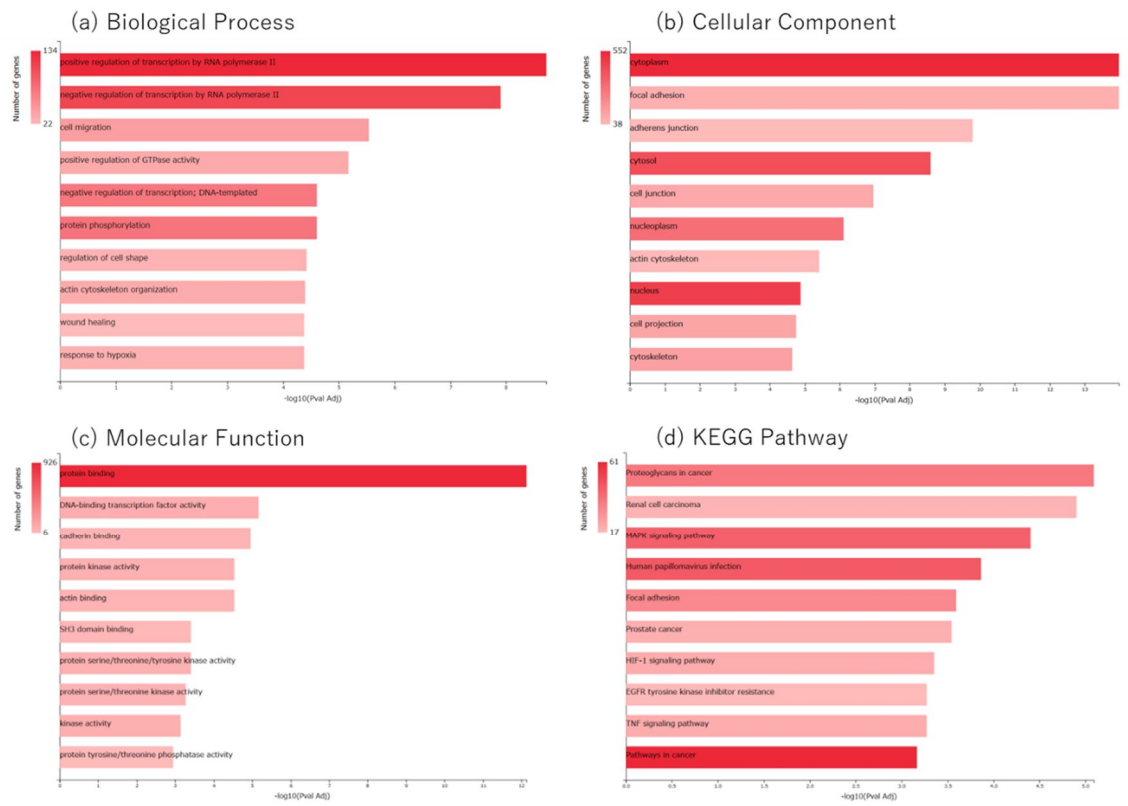


図3 図1の対象遺伝子からコントロールと比較し発現比-2以下の変化のあった遺伝子のGO解析を示す。(a)biological process、(b)cellular component、(c)cellular component、(d)KEGG pathway

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 0件）

1. 著者名 (Otsuka) Saito Kaori, Fujita Fumitaka, Toriyama Manami, Utami Ratna Annisa, Guo Zhihan, Murakami Masato, Kato Hiroko, Suzuki Yoshiro, Okada Fumihiro, Tominaga Makoto, Ishii Ken J.	4. 巻 654
2. 論文標題 Roles of TRPM4 in immune responses in keratinocytes and identification of a novel TRPM4-activating agent	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.02.062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------	---------