

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462808

研究課題名(和文) 糖尿病性創傷治癒障害における血清由来Nanoparticleの役割の解明

研究課題名(英文) The role of the serum-derived Nanoparticle in the diabetic wound healing disorders

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：初め、糖尿病で低下するAdiponectinが血清由来Nanoparticleの生成・分解を通じて創部におけるCa<sup>2+</sup>動態について与える影響について調査を試みたが、Adiponectin蛋白の精製に難渋したため、創部のイオンチャンネルについても同時に研究を進めた。

Transient Receptor Potential チャンネルのうちTRPC3が肥厚性癒痕創部において発現上昇していた。皮膚線維芽細胞に反復伸展刺激を与えるとTRPC3の発現が上昇した。さらにTRPC3過剰発現線維芽細胞に伸展刺激を与えるとCa<sup>2+</sup>濃度が上昇、NF- $\kappa$ Bがリン酸化されFibronectinの発現が上昇した。

研究成果の概要(英文)：Initially, we tried to investigate how Adiponectin, which is known to be decreased in diabetic condition, acts on the local Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the wounds through Serum-derived Nanoparticle formation/degradation. However, it was so difficult to synthesize Adiponectin protein that we started to study about ion channels in the wound simultaneously.

Among Transient Receptor Potential cation channels, TRPC3 was appeared to be up-regulated in the hypertrophic scar contracture tissue. When cyclic stretch stimuli were applied to the cutaneous fibroblasts, the expression of TRPC3 was elevated. Furthermore, in the TRPC3 overexpressing fibroblasts, cyclic stretch stimuli raised cytoplasm Ca<sup>2+</sup> concentration, which lead to the phosphorylation of NF- $\kappa$ B and the up-regulation of Fibronectin.

研究分野：形成外科

キーワード：創傷治癒 機械的刺激 TRPC3

## 1. 研究開始当初の背景

カルシウムシグナリングとは細胞の機能を制御するカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 依存性の情報伝達経路である。細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は低濃度であり、細胞外とくらべ約 1 万倍の大きな濃度差がある。これらの  $\text{Ca}^{2+}$  は外界からの刺激によって細胞質に流入することにより細胞内のタンパク質と結合して、その機能調節を行い、細胞内情報伝達機構を制御することが知られている。

血清由来 Nanoparticle (以下 NP) は血清中の蛋白、核酸などに  $\text{Ca}^{2+}$  などのイオンが凝集したものである。その分解・凝集能によって局所の  $\text{Ca}^{2+}$  動態を調節することで、線維芽細胞など創傷治癒過程に関わる細胞のセカンドメッセンジャーとしての  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを変化させ、創傷治癒に影響を与える可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

当初の計画として、糖尿病で減少する Adiponectin 蛋白を用いて NP を作成し (Adiponectin 蛋白はカルシウム結合蛋白と結合するため NP の core となり得る) 皮膚全層欠損創を作成した糖尿病マウスへの投与実験を行い、その創傷治癒過程を観察することを目的としていた。しかしながら GST 結合 Adiponectin 蛋白を用いた大量精製がうまくいかず、この方法では研究が進まなかった。このため、創傷治癒過程の  $\text{Ca}^{2+}$  動態としてイオンチャネルの研究も同時に進めた。

臨床上問題となる創治癒過程の障害として糖尿病性潰瘍などの難治性潰瘍が創治癒が進行しない病態であるのに対し、肥厚性瘢痕・拘縮は逆にコラーゲンの分泌や沈着の過多という創治癒が進行しすぎる病態とされている。 $\text{Ca}^{2+}$  動態を通じた肥厚性瘢痕・拘縮のメカニズムの解明はこれら線維性疾患の病態だけでなく、難治性潰瘍発生メカニズムについての知見も得ることとなると考えられる。

肥厚性瘢痕・拘縮は関節などの動きのある部分に多く発生し、創部にかかる力学的緊張はこのような瘢痕の増悪因子として知られている。しかしながら、細胞に加わる外的な力が如何にして細胞内シグナルへ変換され、瘢痕を生じるのかについてのメカニズムについては多くはわかっていない。

Transient Receptor Potential (TRP) チャネルは外部環境情報を感知し、その情報を  $\text{Ca}^{2+}$  等のカチオン流入に変換するセンサー分子である。TRP チャネルが創傷治癒に与える影響について調査することにした。

## 3. 研究の方法

(1). ヒト肥厚性瘢痕組織における各 TRPC ホモログの発現につき調査した。また、ヒト皮膚初代培養線維芽細胞をシリコンチャンパーに播種し、10 回/分、伸展率 20% の機械

的伸展刺激を 24 時間与え、TRPC チャネルの発現状況を Real Time PCR 及び免疫細胞染色法にて調査した。

(2). TRPC の機能を解析するため、マウス胎仔皮膚由来線維芽細胞 (NIH3T3) に対し、pMXs-IRES-GFP システムを用いて TRPC3 過剰発現細胞を作成した<sup>1</sup> (図 1)。

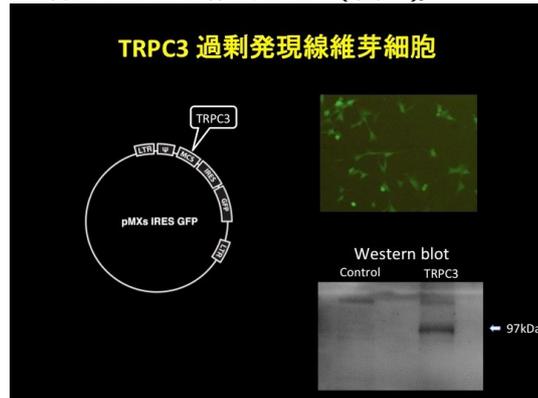


図 1

この細胞を用いて Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL) を作成し、コントロール細胞を用いて作成した FPCL と比較した。FPCL は  $8 \times 10^5$  個の細胞/500ul で作製した。また TRPC 作動薬である OAG と TRPC3 阻害剤である Pyr3 とを添加し FPCL の収縮がどのように変化するか観察した。

(3). 創傷治癒過程において創部ではコラーゲンなどの細胞外マトリックスや Growth Factor など様々な分子が発現している。なかでも創部の収縮において重要な働きをする分子に Fibronectin がある。Fibronectin は細胞接着分子として知られ、細胞外マトリックスとしての働きの他、リガンドとしてインテグリンと結合し、細胞内シグナルを発生させて細胞の移動や分化に関わるとされている<sup>2</sup>。

ヒト初代培養線維芽細胞に伸展刺激を与えた際に Fibronectin の発現が上昇するかを Western Blot 法で観察した。ヒト肥厚性瘢痕組織での Fibronectin の発現を免疫組織染色法で調査した。また、TRPC3 過剰発現細胞に伸展刺激を与えた際の Fibronectin 発現変化を Real Time PCR 法、Western Blot 法にて観察した。また TRPC3 阻害剤である Pyr3 添加による影響についても調査した。

(4). Fibronectin 遺伝子の発現は様々な因子により調節されているが、遺伝子のプロモータ部分に  $\beta$  結合部分を持つことから、転写因子 NF  $\beta$  による調節を受けると考えられている。

TRPC3 過剰発現線維芽細胞における Fibronectin の発現に NF  $\beta$  が影響しているか確認するため NF  $\beta$  の阻害剤である Wedelolactone を添加し、細胞を伸展して Fibronectin の発現変化を Western Blot 法で確認した。TRPC3 過剰発現細胞を伸展した

際、NF- $\kappa$ B や、NF- $\kappa$ B の上流にある I $\kappa$ B のリン酸化についても調査した。更に EMSA assay で NF- $\kappa$ B と B 結合部分との結合を確認した。

(5). TRPC3 過剰発現線維芽細胞の機械的刺激に対する反応が TRPC3 が直接刺激に反応して細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を变化させるかを観察した。細胞をシリコンチャンバーに播種し、Fluo4 を添加後、伸展しながら蛍光顕微鏡にて Live image を観察した。

(6). In vivo での TRPC3 過剰発現線維芽細胞の働きを観察した。TRPC3 過剰発現線維芽細胞をマウスの背部皮膚・皮下に移植し、10 日後に径 5mm のバイオプシーパンチを用いて皮膚全層欠損創を作成し経時的に創治癒過程を観察した。また創作成後 5.9 日目に創部を採取し、免疫組織学的検討も行った。

#### 4. 研究成果

(1). ヒトの肥厚性瘢痕組織から mRNA を抽出し、Real Time PCR にて各 TRPC ホモログの発現状況を観察したところ、各 TRPC ホモログのうち TRPC3 の発現が上昇していた。免疫組織学的検討でも肥厚性瘢痕組織では TRPC3 蛋白の発現が上昇していた。ヒト初代培養線維芽細胞に伸展刺激を加えると mRNA、蛋白レベルいずれでも TRPC3 の発現上昇を認めた。すなわち、ヒトの創部においても関節などの反復する機械的刺激が加わる部位では、線維芽細胞において TRPC3 の発現が上昇していると考えられた。

(2). TRPC3 過剰発現細胞を用いて作成した FPCL はコントロール細胞を用いて作成したものに比べて有意に収縮した。この収縮は TRPC 作動薬である OAG の添加で濃度依存性に増強し、ブロッカーである Pyr3 の添加で減弱した。このことから TRPC3 は創部の収縮に関与すると考えられた。

(3). ヒト皮膚線維芽細胞に反復する伸展刺激を与えると、Fibronectin 蛋白の発現が上昇していた。肥厚性瘢痕組織においても Fibronectin 蛋白の発現が増強していた。TRPC3 過剰発現線維芽細胞に同様の伸展刺激を与えると、コントロール細胞、伸展していない場合と比べて、Fibronectin の発現が、mRNA レベル、蛋白レベルで上昇しており、この Fibronectin 発現の上昇は Pyr3 を添加すると阻害された。これらのことから、Fibronectin は皮膚線維芽細胞で機械的刺激により発現が上昇すること、機械的刺激に対する反応には TRPC3 が関与することが(反復する刺激により促進される)肥厚性瘢痕形成メカニズムと関わる可能性が示唆された。

(4). NF- $\kappa$ B 阻害剤である Wedelolactone の添加により、TRPC3 過剰発現線維芽細胞に伸

展刺激を与えた際の Fibronectin の発現上昇が阻害された。実際にこれらの細胞への伸展刺激では 15 分まで時間依存性に NF $\kappa$ B のリン酸化が促進され、また Pyr3 濃度異存性にリン酸化が抑制された。NF- $\kappa$ B の上流シグナルである I $\kappa$ B も同様に Pyr3 添加でリン酸化が抑制された。免疫細胞染色では TRPC3 過剰発現細胞において伸展刺激に対してリン酸化 NF- $\kappa$ B の核内移行が促進されていた。EMSA では TRPC3 過剰発現細胞に伸展刺激を与えた際にゲルシフトが強く見られ、これは Unlabeled Probe で阻害された。また伸展時に Pyr3 を添加しても阻害されていた。このことから TRPC3 過剰発現細胞の伸展刺激に対する反応としての Fibronectin 発現上昇には転写因子としての NF- $\kappa$ B を介した経路が関与すると強く示唆された。

(5). TRPC3 過剰発現線維芽細胞に反復する伸展刺激を与えると即座に細胞質内  $Ca^{2+}$ の濃度が上昇した。コントロール細胞や、TRPC3 過剰発現細胞でも伸展位を維持させた場合にはこの濃度上昇は見られなかった。このことから TRPC3 は伸展刺激を直接感知し、細胞質内  $Ca^{2+}$ の濃度を調節することで細胞への機械的刺激を細胞内シグナルへと変換させることが示された。

(6). TRPC3 過剰発現細胞を移植された創部はコントロールと比べ創収縮が促進した。免疫組織学的には Fibronectin 発現の亢進がみられた。

以上より、関節といった繰り返される緊張が加わる部位において創部肥厚性瘢痕が生じやすいメカニズムとして以下のものが考えられた。

反復する機械的刺激により皮膚創部における線維芽細胞の TRPC3 の発現が亢進する。TRPC3 は機械的刺激を直接感知しチャネルを開き  $Ca^{2+}$ イオンを流入させる。細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇することで NF- $\kappa$ B が活性化され、創部での Fibronectin 蛋白の発現が増加する。結果として創部の瘢痕や拘縮が促進される(図 2)。

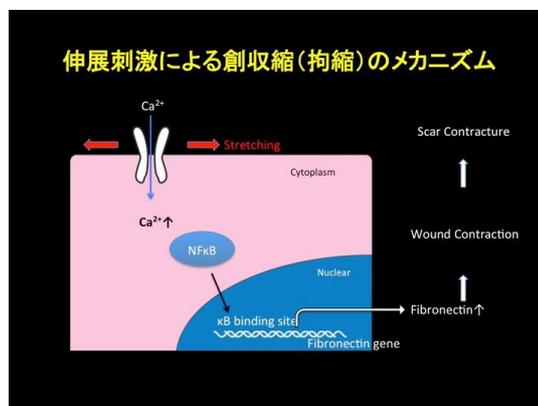


図 2

## 引用文献

1. Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. Gene Ther. 2000 Jun;7(12):1063-6.  
2. Grinnell, F. Fibronectin and wound healing. J. Cell. Biochem. 26, 107-116 (1984).

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Hisako Ishise, Barrett Larson, Yutaka Hirata, Toshihiro Fujiwara, Soh Nishimoto, Tateki Kubo, Ken Matsuda, Shigeyuki Kanazawa, Yohei Sotsuka, Kazutoshi Fujita, Masao Kakibuchi & Kenichiro Kawai. Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFκB activation. Scientific Reports, 査読あり, 5, Article number: 11620 (2015) doi:10.1038/srep11620

[学会発表](計 14 件)

河合建一郎, 石瀬久子, 西本聡, 藤原敏宏, 曾束洋平, 藤田和敏, 外岡真紀, 垣淵正男. TRPC チャンネルを創傷治癒。(パネルディスカッション) 第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会 2015.10.8 岩手県民会館 (岩手・盛岡)

河合建一郎, 石瀬久子, 西本聡, 藤原敏宏, 曾束洋平, 藤田和敏, 外岡真紀, 齋藤拓也, 垣淵正男. 皮膚創部における酸化ストレスと TRPC チャンネルの関係. 第 7 回日本創傷外科学会総会・学術集会 2015.7.25 東京ドームホテル (東京・文京区)

Kenichiro Kawai, Hisako Ishise, Barrett Larson, Soh Nishimoto, Toshihiro Fujiwara, Masao Kakibuchi. Calcium Entry Via TRPC3 Channels Transduce Mechanical Force And Accerelate Wound Contraction. Plastic Surgery Research Council 60th Annual Meeting 2015.5.16 Seattle (USA).

Kenichiro Kawai, Hisako Ishise, Barrett Larson, Soh Nishimoto, Toshihiro Fujiwara, Masao Kakibuchi. TRPC3 Channels Regulate Expression of Fibronectin Via NF B Signling In Response to Cyclic Strain And Contribute to Hypertrophic Scar Formation. Plastic Surgery Research Council 60th Annual Meeting 2015.5.16 Seattle (USA).

河合建一郎, 石瀬久子, 藤原敏宏, 西

本聡, 垣淵正男. 細胞力覚チャンネル TRPC3 が創収縮に果たす役割について 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 2014.10.9 キッセイ文化ホール (長野・松本)

石瀬久子, 河合建一郎, 藤原敏宏, 西本聡, 垣淵正男. 機械的刺激応答チャンネルとしての TRPC3 の役割 Fibronectin の発現調整機構について- 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 2014.10.9 キッセイ文化ホール (長野・松本)

河合建一郎, 石瀬久子, 藤田和敏, 曾束洋平, 藤原敏宏, 西本聡, 垣淵正男. 創収縮における Mechano Transducer としての TRPC3 の役割について. 第 9 回癒痕ケロイド治療研究会 2014.8.31 日本青年館 (東京・新宿区)

河合建一郎, 石瀬久子, 西本聡, 藤原敏宏, 曾束洋平, 藤田和敏, 木下将人, 齋藤拓也, 大島遙, 垣淵正男. 創収縮における TRPC3 の役割について. 第 6 回日本創傷外科学会学術集会 2014.7.25 かがわ国際会議場、サンポートホール高松 (香川・高松)

河合建一郎, 石瀬久子, 西本聡, 垣淵正男. 機械的伸展・収縮刺激が皮膚肥厚性癒痕を引き起こすメカニズム TRPC3 の役割について 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 2013.11.7 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟・新潟)

石瀬久子, 河合建一郎, 西本聡, 垣淵正男. 伸展刺激による皮膚表皮細胞と線維芽細胞間の相互作用 肥厚性癒痕形成時の Endothelin-1 と TRPC3 の役割 . 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 2013.11.7 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟・新潟)

Kenichiro Kawai, Barrett Larson, Hisako Ishise, Antoine L. Carré, Soh Nishimoto, Michael T. Longaker, H Peter Lorenz, Masao Kakibuchi. Serum derived nanoparticles increase the rate of cataneous wound closure. The 22nd China-Japan Joint Congress on Plastic Surgery 2013.8. 24 Dalian (China)

河合建一郎, 石瀬久子, 西本聡, 垣淵正男. 伸展刺激が肥厚性癒痕を引き起こす際の TRPC3 の役割について. 第 5 回日本創傷外科学会総会 2013.7.11 ホテルグランヴィア京都 (京都・京都)

石瀬久子, 河合建一郎, 西本聡, 垣淵正男. 肥厚性癒痕における皮膚表皮細胞と線維芽細胞間の関係について-TRPC3 の役

割 ~ 第 5 回日本創傷外科学会総会  
2013.7.11 ホテルグランヴィア京都 (京  
都・京都)

Ishise H, Kawai K, Larson BJ,  
Nishimoto S, Kakibuchi M. Transient  
receptor potential C3 play an important  
role in the formation of hypertrophic  
scar as a mechanical transducer. Plastic  
Surgery Research Council 58th Annual  
Meeting 2013.5.4 Santa Monica (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

垣淵 正男 (KAKIBUCHI, Masao)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50252664

西本 聡 (NISHIMOTO, Soh)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30281124

石瀬 久子 (ISHISE, Hisako)  
兵庫医科大学・医学部・病院助手  
研究者番号：30567194

藤田 和敏 (FUJITA, Kazutoshi)

兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40461066

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：