

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791930

研究課題名(和文)酸化ストレスが創傷治癒、肥厚性瘢痕形成に与える影響について

研究課題名(英文)Effects of oxidative stress on wound healing and hypertrophic scar formation process

研究代表者

藤田 和敏(Fujita, Kazutoshi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40461066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：炎症時には酸化ストレスが増大し、活性酸素種(ROS)が細胞機能を傷害する。一方ROSは細胞内において精密に制御されたシグナル伝達の担い手でもある。TRPチャンネルは様々な環境因子を感応するチャンネルであり、なかでもTRPCは酸化ストレスに反応する。ROSによりTRPCは開口状態で安定し細胞内Ca濃度を上昇させる。Caは細胞内シグナルの重要なセカンドメッセンジャーであり、その細胞内濃度の上昇は様々な反応を引き起こす。本研究ではTRPC3,5過剰発現線維芽細胞を作成し、その機能を解析した。TRPC3過剰発現細胞を用いたコラーゲンゲルは酸化ストレス下で強い収縮を示した。

研究成果の概要(英文)：In inflammatory condition, oxidative stress increases where Reactive Oxygen species (ROS) damages cell function. On the other hand, ROS production is strictly regulated in the normal metabolism of cells and plays important roles in cell signaling. TRP channels react to a variety of environmental stress. Especially, TRPC subfamilies react to oxidative stress. ROS keeps TRPC channels open and Ca influx occurs which results in the increased Ca concentration in cytoplasm. Ca is known to be an important second messenger of cell signaling and the increase of Ca in cytoplasm causes several reaction. In this study, TRPC3 and 5 overexpressing fibroblasts were generated and the function of these channels in oxidative stress were analyzed. Fibroblast Populated Collagen Lattice with TRPC3 showed increased contractile activity in oxidative stressed condition.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：酸化ストレス TRPCチャンネル 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、様々な活性酸素種 (ROS:Reactive Oxygen Species) によって生体の酸化作用と抗酸化作用のバランスが崩れ、前者に傾いた状態のことである。炎症時には酸化ストレスが増大し、ROS が脂質やタンパク質、核酸などを酸化変性させ細胞機能を傷害することが知られている。一方 ROS は生体に非特異的損傷を与える毒性因子であるのみならず生体内でも産生され細胞内において精密に制御されたシグナル伝達の担い手であることも明らかになっている。皮膚創傷治癒過程や肥厚性瘢痕形成過程は炎症が強く関わるにも関わらず酸化ストレスがどのような影響を与えているのかは未だ不明な点が多い。

TRP チャンネルは様々な環境因子を感応するチャンネルであり、TRPC5 チャンネルは様々な外的刺激のうち酸化ストレスに反応するチャンネルでもあることがわかっている。すなわち、NO (一酸化窒素) などの ROS により、TRPC5 は開口状態で安定し細胞内 Ca 濃度を上昇させるというものである。Ca は細胞内シグナルの重要なセカンドメッセンジャーであり、その細胞内濃度の上昇はコラーゲンの発現上昇といった様々な反応を引き起こす可能性がある。

## 2. 研究の目的

上記背景より「創部の細胞の TRPC5 の発現量もしくは活性の違いにより、創部に存在する ROS に対する反応性が異なり創傷治癒遅延や肥厚性瘢痕形成が起こるのではないか」と考え、創傷治癒における TRPC5 の役割について調査した。

## 3. 研究の方法

(1). マウス TRPC5 過剰発現線維芽細胞の作成; TRPC5 の機能を解析するため Stable な TRPC5 過剰発現細胞の作成を試みた。マウス TRPC5 遺伝子をベクター (pMXs-IRES-GFP) に組み込んだ後、パッケージング細胞として Plat E 細胞に transfection しレトロウイルス液を作成、マウス皮膚線維芽細胞 (NIH3T3) に感染させ、マウス TRPC5 過剰発現線維芽細胞を作成した。

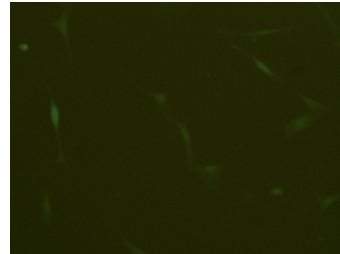
(2). TRPC5 過剰発現細胞を用いて ROS 添加時の細胞反応の観察; TRPC5 過剰発現細胞の酸化ストレスへの応答性を観察するため ROS として H2O2 を用いた際の応答性を観察した。H2O2 を TRPC5 過剰発現細胞とコントロール細胞に添加し、24 時間の培養の後、創傷治癒・肥厚性瘢痕形成に関わる遺伝子発現を Real Time PCR を行い観察した。

(3). TRPC5 過剰発現線維芽細胞を用いて

Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL) を作成し、H2O2 を添加することで Collagen Gel の収縮度に変化があるか観察した。

## 4. 研究成果

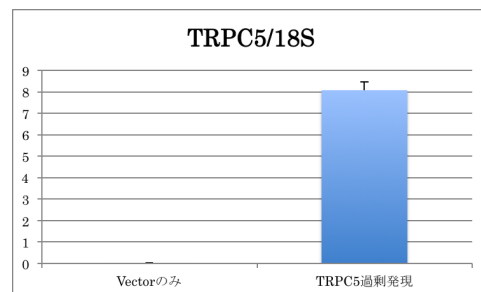
(1). 作成した TRPC5 過剰発現線維芽細胞の GFP 発現を蛍光顕微鏡にて確認した (図 1)。



(図 1)

TRPC5 過剰発現線維芽細胞。

また、TRPC5 の発現を Real Time PCR 法にて確認した (図 2)。



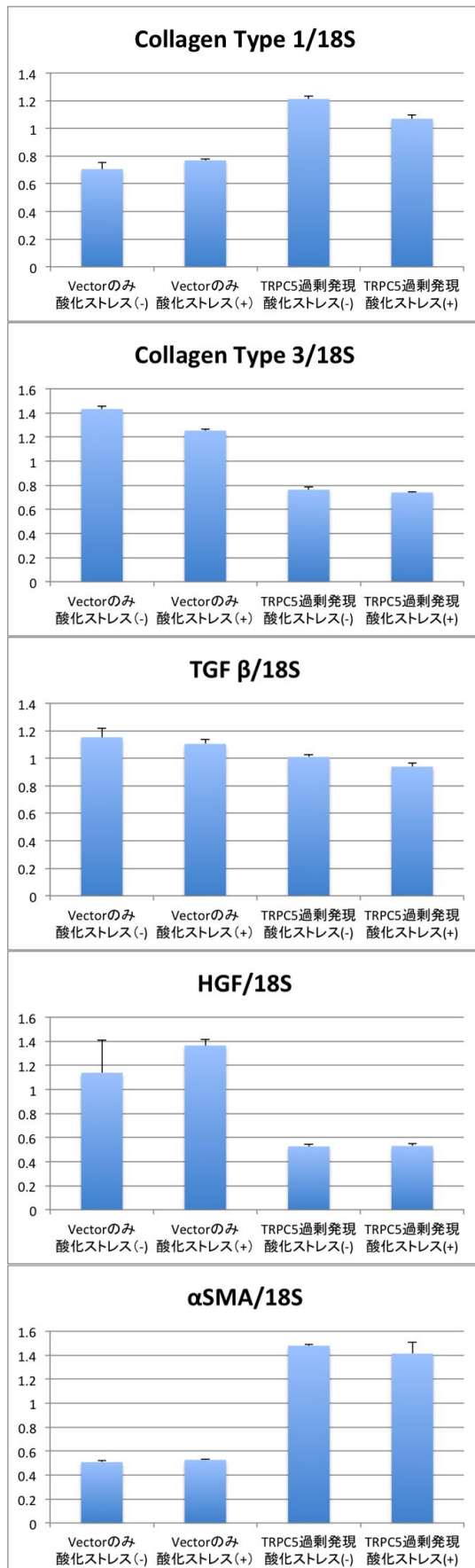
(図 2)

TRPC5 過剰発現細胞はコントロール細胞と比べて約 200 倍の遺伝子発現を認めた。

TRPC5 の機能については Ca imaging にて確認した。

(2). TRPC5 過剰発現細胞と vector のみを transfection したコントロール細胞をコラーゲンコートした 24 well plate にそれぞれ  $1 \times 10^5$ /well で播種し、H2O2 を 10nM-10mM の濃度で添加した。TRPC5 過剰発現細胞は H2O2 濃度が最終濃度  $1 \mu\text{M}$  までは培養可能であったが、それ以上の濃度では培養皿からはがれた (コントロール細胞ははがれなかった)。このため H2O2 の最終濃度を  $1 \mu\text{M}$  で添加することとし、創傷治癒に関わる遺伝子として Collagen Type 1, Collagen Type 3, TGF $\beta$ , HGF, SMA, CTGF, IL-6 の発現がどのように変化するか、Real Time PCR 法にて観察した。調べた遺伝子のうち、コントロール細胞と TRPC5 過剰発現細胞で (酸化ストレスをかける前、すなわち base の状態で) 発現量に差があったものは、Collagen Type 1 (TRPC5 過剰発現で上昇), Collagen Type 3 (TRPC5 過剰発現で減少), SMA (TRPC5 過剰発現で上昇), CTGF (TRPC5 過剰発現で減少) であった。

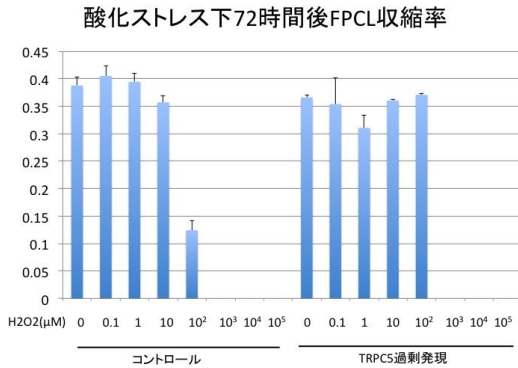
しかしながら、1  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による酸化ストレスで発現量が有意に変化するものはなかった (図 3)。



(図 3)

TRPC5 過剰発現細胞ではコントロール細胞と比べて Collagen Type 1, Collagen Type 3, SMA の遺伝子発現が変化している。しかし酸化ストレス付加では変化がなかった。

(3). 次に TRPC5 過剰発現細胞と vector のみを transfection したコントロール細胞を用いて FPCL を作成した。ブタ皮膚 Collagen Type 1c を 2.4mg/ml になるように DMEM 培地に溶き、ここへそれぞれの細胞を  $2 \times 10^5/0.5\text{ml/well}$  となるようにして播種した。FPCL が生成された後同量の 20%FBS 入り DMEM 培地を加え、24 時間培養した後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を最終濃度が 100nM-100mM になるようにして添加した。FPCL を Well の底面からはがし、0, 24, 48, 72 時間後の FPCL の収縮率を観察した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の最終濃度が 100  $\mu$ M まではいずれの細胞の FPCL も同様に収縮したが、それ以上の濃度ではすべての FPCL が収縮しなかった。このとき細胞を顕微鏡にて観察すると細胞の形は丸くなり死滅していた。しかしながら H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が 100  $\mu$ M の時はコントロール細胞を用いた FPCL は収縮率が低下したが、TRPC5 過剰発現細胞を用いた FPCL では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度がそれ以下の時と同様に収縮した (図 4)。



(図 4)

H2O2 100 μM 添加でも TRPC5 過剰発現細胞を用いた FPCL は収縮するが、コントロール細胞を用いた FPCL は収縮力が減弱する。

3次元培養の結果より、TRPC5を過剰発現した線維芽細胞はコントロールの線維芽細胞に比べて、H2O2による酸化ストレスへの耐性が強いことが示唆された。また2次元培養ではTRPC5過剰発現細胞のみが1 μMのH2O2刺激で培養皿からはがれたが、これもTRPC5のみがH2O2に反応して強く収縮したためかもしれない。

今回の実験では創傷治癒に関わる因子としてCollagen Type1, Collagen Type 3, TGF, HGF, SMA, CTGF, IL-6について遺伝子発現変化を調査したが、H2O2添加ではTRPC5過剰発現線維芽細胞、コントロール細胞ともに有意な発現変化を認めなかった。しかしながら、Collagen Type 1, Collagen Type 3, CTGF, SMAに関してはTRPC5を過剰発現することだけで有意に発現変化をすることから、TRPC5はこれらの遺伝子発現に関わる可能性が示唆された。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

藤田 和敏 (FUJITA, Kazutoshi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40461066

### (2) 研究協力者

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

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