

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15755

研究課題名(和文) 創傷治癒過程における、機械的伸展刺激と皮膚免疫系相互作用機序の解明

研究課題名(英文) The relationship between the mechanical force and the interaction of skin-immune system during 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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥厚性瘢痕は、創傷治癒反応が過剰に起こりコラーゲンなどが蓄積した状態である。肥厚性瘢痕形成に関わる因子として主なものに、(1)創部にかかる緊張、(2)創部での炎症があり、機械的伸展刺激時の樹状細胞と線維芽細胞との相互作用の動きを調査する予定であったが、うまくいかなかった。しかし、その中で伸展刺激時の表皮細胞と線維芽細胞の相互作用についても調査し、伸展刺激により表皮細胞は Endothelin-1 を分泌するが、一方線維芽細胞は Endothelin Receptor B およびそのカップリングチャネルである TRPC3 n 発現・活性が上昇し、肥厚性瘢痕形成の一因となっている可能性があることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Hypertrophic Scar is a condition where high accumulation of collagen can be seen which is promoted by the excessive wound healing process. Main factors causing hypertrophic scar are (1). stretching force of wound site and (2). inflammation of wound. Although we tried to investigate the interaction between fibroblasts and dendritic cells under stretched condition, the research did not work well. However, meanwhile, we found the interaction between keratinocyte and fibroblasts under cyclic stretched condition. It is known that keratinocytes secret Endothelin-1 in response to the stretching force. In our study, cyclic stretching force is found to enhance the expression of Endothelin Receptor B and its coupling ion channel; TRPC3 and the sensitivity to Endothelin -1 signaling is increased. These findings suggest that the interaction between fibroblasts and keratinocytes during the wound healing process contribute to the formation of hypertrophic scar.

研究分野：形成外科

キーワード：機械的伸展刺激 肥厚性瘢痕 TRPC3 EDNRB

1. 研究開始当初の背景

肥厚性瘢痕は、創傷治癒反応が過剰に起こりコラーゲンなどの細胞外マトリックスが蓄積した状態である。関節など機械的に反復する刺激の強い部位に生じやすく、創部への物理的機械的刺激がその成因に関わると考えられている。

我々はこれまで創部にかかる機械的伸展刺激が肥厚性瘢痕を生じる仕組みについて研究してきた。その結果、線維芽細胞に発現する TRPC3 というカルシウムチャンネルが機械的刺激を細胞内シグナルへ変換し、細胞内カルシウム濃度の上昇を経て Fibronectin の発現を上昇させることを解明した⁽¹⁾。しかしながら同時に、機械的刺激は線維芽細胞のコラーゲン分泌を直接増加させるわけではないことも判明した。すなわち、伸展刺激が線維芽細胞を通じて肥厚性瘢痕を引き起こすという単純な図式ではなく、線維芽細胞以外の細胞の関与が推察される。

例えば感染や血腫などにより炎症が強く起こった際も肥厚性瘢痕となりやすく、また肥厚性瘢痕そのものも発赤・腫脹といった炎症症状を呈していることから、その成因に免疫系とのつながりがあるのではないかと考えられている。また、創傷治癒は線維芽細胞のみならず、表皮細胞や血管内皮細胞など様々な細胞が相互に作用して進行する生体プロセスであり、創傷治癒の異常である肥厚性瘢痕拘縮の成因としてもこれらの細胞間の相互作用に重要な意義があることが推察される。

当初の計画として、炎症・免疫反応は、大まかには、最初に樹状細胞などの抗原提示細胞が抗原を提示し、サイトカインを放出し、これにリンパ球が反応、更に様々なサイトカインを放出することで血管透過性の亢進や細胞の遊走を促すことにより起こることから、機械的伸展刺激を受ける部位はまず細胞に直接外力が加わるが、そこに炎症が起こる、言い換えればそこに分化した T 細胞が出現するということは、はじめに機械的伸展のシグナルが直接的もしくは間接的に樹状細胞に伝わり、抗原提示やサイトカインの放出が行われているのではないかと考え、樹状細胞と線維芽細胞の相互作用について研究を行う予定としていた。

2. 研究の目的

当初、(1)機械的刺激は樹状細胞に直接影響を与えるのか？それとも機械的刺激を受けた別の細胞からのシグナルが樹状細胞に伝わり免疫系を賦活化するのか？(2)賦活化された免疫系の細胞はどのようにして線維芽細胞に影響を与えるのか？について明らかにすることを目的としていた。しかしながら樹状細胞の培養がうまくいかず、この方法

では研究が進まなかった。このため、機械的伸展刺激下での線維芽細胞と相互作用するものとして表皮細胞を対象として研究を行うこととした。

表皮細胞は機械的伸展刺激に応じて Endothelin-1 (以下 ET-1) を分泌することが知られている⁽²⁾。ET-1 は Endothelin Receptor と結合して細胞内へとシグナルと伝えるが、Endothelin Receptor は TRPC3 を介して Ca 濃度を上昇させ様々な細胞内シグナルを伝達している。

線維芽細胞を伸展した際、表皮細胞から分泌される ET-1 との関係について調査した。

3. 研究の方法

(1) 5×10^5 個のヒト初代培養線維芽細胞を用いて Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL) を作成し、これに伸展した表皮細胞の conditioned medium を添加し、FPCL の収縮について観察した。

(2) 5×10^5 個の TRPC3 過剰発現線維芽細胞を用いて FPCL を作成し、ET-1 および ET-1 阻害剤、TRPC3 阻害剤を添加して FPCL の収縮について観察した。

(3) ヒト肥厚性瘢痕組織における Endothelin Receptor の発現について免疫染色を用いて観察した。また伸展率 20%、6 回/分で 24 時間の伸展刺激を行ったヒト初代培養線維芽細胞についても Endothelin Receptor の発現について免疫染色ならびに qRT-PCR を行い調査した。

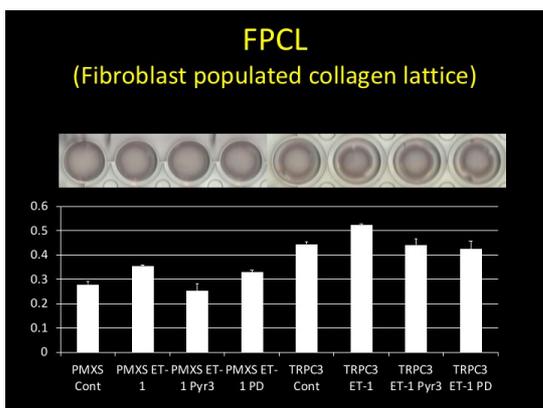
(4) TRPC3 により細胞内 Ca 濃度が上昇すると Calcineurin/NFAT 系の活性が上昇することが知られる。TRPC3 過剰発現線維芽細胞において NFAT が活性化しているか観察した。さらに伸展刺激を行ったヒト初代培養線維芽細胞においても NFAT が活性化されているか Western Blot 法にて確認した。

(5) ノドマウスの背部皮下に TRPC3 過剰発現線維芽細胞を移植し、同部位に皮膚全層欠損創を作成して、創部の収縮について観察した。

4. 研究成果

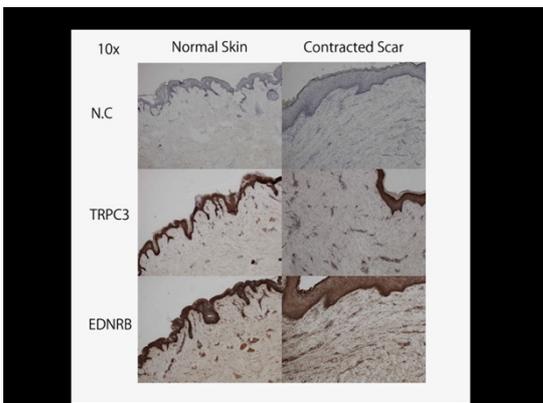
(1) HaCaT 細胞を伸展率 20%、6 回/分で 24 時間伸展し、conditioned medium を回収した。これをヒト初代培養線維芽細胞で作成した FPCL に添加したところ、コントロールの medium を加えたものと比べて conditioned medium を添加した FPCL は有意に収縮した。このため伸展刺激を加えた表皮細胞からは線維芽細胞を収縮させる何らかの因子が分泌されることが示唆された。

(2) 表皮細胞に伸展刺激を加えると、ET-1 の分泌が増加する。ET-1 の受容体である Endothelin Receptor は TRPC3 とカップリングすることが知られているため、伸展した表皮細胞からの conditioned medium に含まれる線維芽細胞を収縮させる因子として ET-1 が含まれるか確認するため、TRPC3 過剰発現線維芽細胞にて FPCL を作成し、ET-1 (100nM) を添加した。また、同時に ET-1 阻害剤 ; PD142893 (1 μ M)、TRPC3 阻害剤 ; Pyr3 (3 μ M) を添加した。ET-1 添加により TRPC3 過剰発現 FPCL ではコントロール (PMXS) の FPCL より有意に強い収縮が見られた。この収縮は ET-1 阻害剤、TRPC3 阻害剤にて減少した (図 1)。



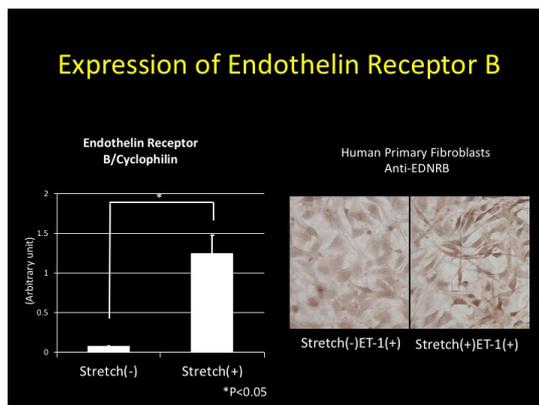
(図 1)

(3) (1), (2) より伸展した線維芽細胞は TRPC3 のみならず TRPC3 がカップリングする Endothelin Receptor の発現が上昇している可能性が示唆された。このため、肥厚性癒痕組織について免疫染色を行い、Endothelin Receptor A, Endothelin Receptor B (EDNRB) の発現について確認したところ、EDNRA の増加は見れなかったが、EDNRB の発現上昇を認めた (図 2)。



(図 2)

伸展刺激が Endothelin Receptor の発現を上昇させるか確認するため、ヒト初代培養細胞に伸展刺激を加え、EDNRA、EDNRB の発現につき確認した。免疫染色、qRT-PCR いずれでも EDNRA は増加しておらず、EDNRB の増加が見られた (図 3)。



(図 3)

(4) ET-1 が Endothelin Receptor に結合した後、Endothelin Receptor に共役する G 蛋白が分解し、Phospholipase C を活性化する。Phospholipase C は phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂) を inositol-1, 4, 5- triphosphate (IP₃) と diacylglycerol (DAG) とに分解する。IP₃、DAG は TRPC を活性化し、細胞内 Ca 濃度を上昇させ、Calcineurin を活性化して、転写因子である NFAT を活性化して核内移行させ様々な遺伝子発現を調節している。このため、TRPC3 過剰発現線維芽細胞において NFAT が活性化しているか観察した。

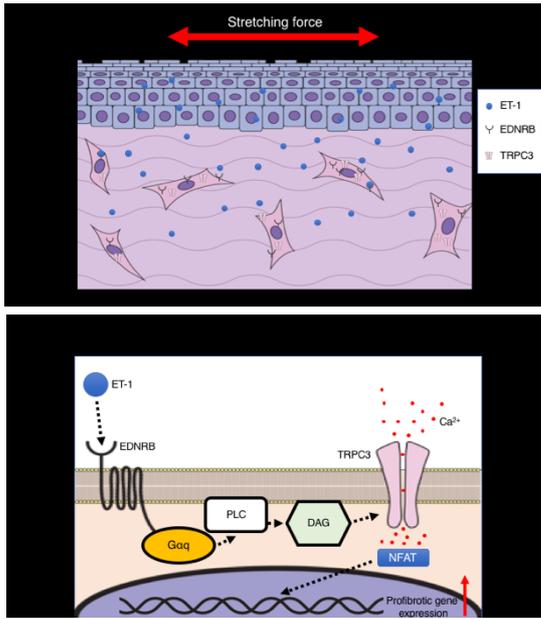
TRPC3 過剰発現細胞においては伸展刺激により NFATc4 の活性化が見られた。

伸展刺激により線維芽細胞において EDNRB ならびに TRPC3 が増加するとすれば、伸展刺激を与えた線維芽細胞に ET-1 を添加することでシグナルの下流である NFAT が活性化されると考えられ、これを確認したところ、伸展刺激を加えたヒト初代培養線維芽細胞に ET-1 添加すると NFATc4 の活性化が見られた。

(5) 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。

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癒痕が生じやすいメカニズムの 1 つ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表皮細胞より ET-1 の分泌が増加する。一方、線維芽細胞においては EDNRB ならびに TRPC3 の発現が亢進する。表皮細胞から分泌された ET-1 は発現の増加した線維芽細胞上の EDNRB に結合し、TRPC3 を活性化する。また、TRPC3 は機械的刺激を直接感知しチャネルを開くことでも Ca イオンを流入させる。細胞内 Ca²⁺濃度が上昇することで NFAT が活性化され、線維化の方向へ働く様々な遺伝子発現を調節する。すなわち、創部への伸展は表皮細胞の ET-1 の分泌上昇、線維芽細胞の ET-1 感受性の増加を通じ癒痕や拘縮を促進するというメカニズムが考えられた (図 4)。



(図 4)

引用文献

1. Ishise H, Larson B, Hirata Y, Fujiwara T, Nishimoto S, Kubo T, et al. Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFκB activation. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2015 Jun 18;:1-15.

2. Kurita M, Okazaki M, Fujino T, Takushima A, Harii K. Cyclic stretch induces upregulation of endothelin-1 with keratinocytes in vitro: possible role in mechanical stress-induced hyperpigmentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011 May 27;409(1):103-7.

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 14 件)

① 河合建一郎 西本聡 曾束洋平 石瀬久子 尹庸 古川朋子 森口くるみ 棚田祐助 垣淵正男 創傷治癒と酸化ストレスにおける TRPC チャンネルの役割 第 26 回日本形成外科基礎学術集会 (大阪) 2017 年

[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

藤原 敏宏 (FUJIWARA, Toshihiro)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号 : 00423179

曾束 洋平 (SOTSUKA, Yohei)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 40437413

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

