

令和 6 年 5 月 30 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：20K18415

研究課題名(和文) 難治性リンパ浮腫の発症におけるTRPチャネルの関与とその分子機構

研究課題名(英文) TRP channels involvement in the pathogenesis of intractable lymphedema

研究代表者

上野 一樹 (Ueno, Kazuki)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30817028

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)：多様な生体機能に関わるTRPチャネルの一つ、TRPV1の Maus皮膚の創傷治癒における役割を解析した。Trpv1遺伝子欠損(KO)マウスと野生型(WT)マウスの背部皮膚欠損創を作製し、治癒過程を組織学的に評価した。その結果、KOマウスにおいて、創傷治癒遅延と再上皮化の異常を認めた。更に、NETs形成の亢進と、好中球性炎症の遷延化を認めた。以上から、TRPV1チャネルは、好中球性の炎症反応を制御し、Maus皮膚創傷治癒に重要である可能性が示唆された。また、Maus尾部慢性リンパ浮腫モデルの作成に成功し、この系を改良する事でTRPを含むシグナル系の関与についても今後解析が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な生体機能に関わるTRPチャネルの一つ、TRPV1の Maus皮膚の創傷治癒における役割を解析し、TRPV1チャネルは、好中球性の炎症反応を制御する、Maus皮膚創傷治癒に重要なTRPチャネルである可能性が示唆された。また、Maus尾部慢性リンパ浮腫モデルの作成に成功し、この系を改良する事でTRPを含むシグナル系の関与についても今後解析が期待される。今回の知見を元に、TRPチャネル解析を通じて形成外科領域に重要な創傷治癒とリンパ浮腫双方についての解析進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of TRPV1, one of the TRP channels involved in various biological functions, in murine cutaneous wound healing. The results showed delayed wound healing and abnormal re-epithelialization in KO mice. In addition, we observed increased NETs formation and prolonged neutrophilic inflammation. These results suggest that TRPV1 channel may be an important TRP channel in murine cutaneous wound healing that regulates neutrophilic inflammatory responses. We have also succeeded in generating a mouse model of chronic lymphedema of the tail and expect to analyze the involvement of signaling pathways including TRPs by modifying this system.

研究分野：創傷治癒、リンパ浮腫、顔面先天異常

キーワード：TRPV1 TRPイオンチャネル 創傷治癒 リンパ浮腫 好中球 NETs

1. 研究開始当初の背景

手術に高頻度で認められるリンパ浮腫は、先進国では急速に増加している。この続発性リンパ浮腫は正常な創傷治癒過程を経ず、リンパ管が不可逆的に変性するため、難治性となり有効な治療法がない。当然ながら、難治性リンパ浮腫に対する有効な治療法の確立には、リンパ浮腫の病態を解明することが必要条件となる。一方、近年では組織の侵害刺激受容に関わるイオンチャンネル型受容体の機能を有する Transient receptor potential (TRP) チャンネルが注目され、外来侵襲による生体反応での TRP 分子の役割の解明について研究を展開されているが、これらのイオンチャンネルとリンパ浮腫モデルを用いた研究はなされていない。本研究では、創傷治癒への TRP イオンチャンネル群の関与の視点から、リンパ浮腫患者群にみられる四肢の浮腫や皮膚硬化の分子機構を解明する。本研究の成果は、難治性リンパ浮腫に対する新規治療法の開発に貢献することが期待される。

2. 研究の目的

TRP (Transient Receptor Potential) イオンチャンネルは、陽イオンチャンネルファミリーであり、種々の物理的、化学的刺激に応答する細胞における“センサー”として、またイオン流入を細胞内シグナルとして効率的に下流に伝えるシグナル複合体形成の“足場”として働くと考えられている。TRP は、TRPA、TRPC、TRPM、TRPML、TRPP、TRPV の 6 種類のサブファミリーに分類されており、その一つの TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) は、カプサイシン、高温 (43 以上)、化学刺激、pH 変化、組織障害など様々な要因で活性化される。TRPV1 は、皮膚にも発現が認められており、痛みや化学物質のセンサーとしてだけでなく、炎症誘導と抗炎症作用の双方に影響を有すると推察されている。

形成外科領域において、皮膚創傷治癒は重要な研究領域となっているが、上記のような活性を持っている TRPV1 チャンネルが同過程に関与している可能性についてマウスのモデル実験系を樹立した。Trpv1 ノックアウトマウス (Trpv1 KO マウス) の皮膚創傷治癒過程について、肉眼的観察、組織学的解析を行い、TRPV1 チャンネルの創傷治癒における機能を明らかにした。

従って、この様な進展によって、治療効果などの判定を可能とする優れた慢性リンパ浮腫モデルが求められていることから、さらに同モデルを樹立し、術部に対する可視的な解析を経時的に可能とする実験系を開発しつつある。

3. 研究の方法

TRPV1 は、皮膚に発現が認められており、痛みや化学物質のセンサーとしてだけでなく、炎症誘導と抗炎症作用の双方に影響を有すると推察されている。リンパ浮腫のメカニズムとして慢性炎症が着目されており、その予備実験として、TRPV1 と皮膚創傷治癒過程における炎症の関連性について検討した。実験には、Trpv1 遺伝子欠損 (KO) マウスと対照群の野生型 (WT) マウスを用いた。それぞれの背部皮膚に直径 5.0mm の円形的全層皮膚欠損創を作製した。皮膚欠損創作成後 (POD: post-operative days; 0, 2, 4, 7, 10, 14)、肉眼的観察、組織学的解析から治癒過程を評価した。

さらに尾部リンパ浮腫モデルとして、マウスの尾に対して皮膚欠損を作成し、リンパ管を結紮後、欠損部に透明なシリコンシートを挿入することで、慢性的な浮腫形成モデルの改良を目指しつつある。慢性浮腫モデルの肉眼的解析および、デキストラン注射によるリンパ管新生の確認を行っている。

4. 研究成果

POD7 と 10 の時点では、KO マウスは皮膚欠損の範囲が広域であった。POD7 における KO マウスの再上皮化は、WT マウスに比べ遅延していることが HE 染色で観察された (図 1)。炎症期に動員され、その後に漸減するとされる好中球数は、WT マウスにおいては POD4 から POD7 にかけて減少を認めたものの、Trpv1 KO マウスでは減少が観察されなかった (図 2)。マクロファージ数は明らかな差を認めなかった。H3Cit で標識された NETs (Neutrophil Extracellular Traps) 形成は、POD4 および POD7 の両方で、WT マウスと比較して Trpv1 KO マウスで増加した (図 3)。以上の結果より、TRPV1 チャンネルは、好中球性の炎症反応を制御し、マウス皮膚創傷治癒に重要な TRP チャンネルである可能性が示唆された。(Ueno et al. Exp. Anim. 2023)

また、同時に皮膚欠損作成に加えてシリコンシートを欠損部に貼付することで、マウス尾部慢性リンパ浮腫モデルの作成に成功し、術部の経時的な解析を行うことが可能となり、この系を改良する事で TRP を含むシグナル系の関与についても今後解析が期待される (図 4)。

今回の成果により、今後 TRPV1 を含む複数のチャンネル遺伝子群の関与を遺伝子改変マウスモデル系でさらに解析する必要がある事が示された。また、NETs 形成とそれら TRP 遺伝子間の関係も今後の興味深いトピックと考えられた。今後は、TRP チャンネル遺伝子改変マウスに対して尾部リンパ浮腫を作成し解析を行うことで分子機構を明らかとし、難治性リンパ浮腫に対する新規治療法の開発に繋げたい。

図 1

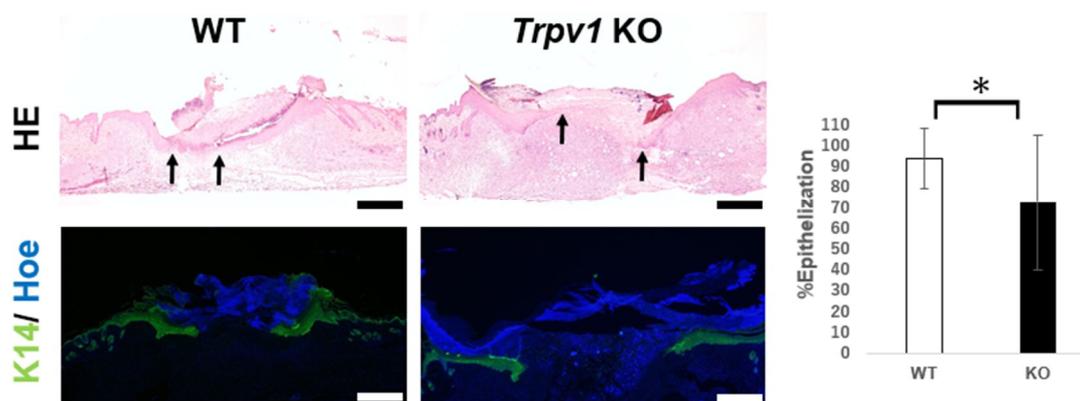


Figure 2

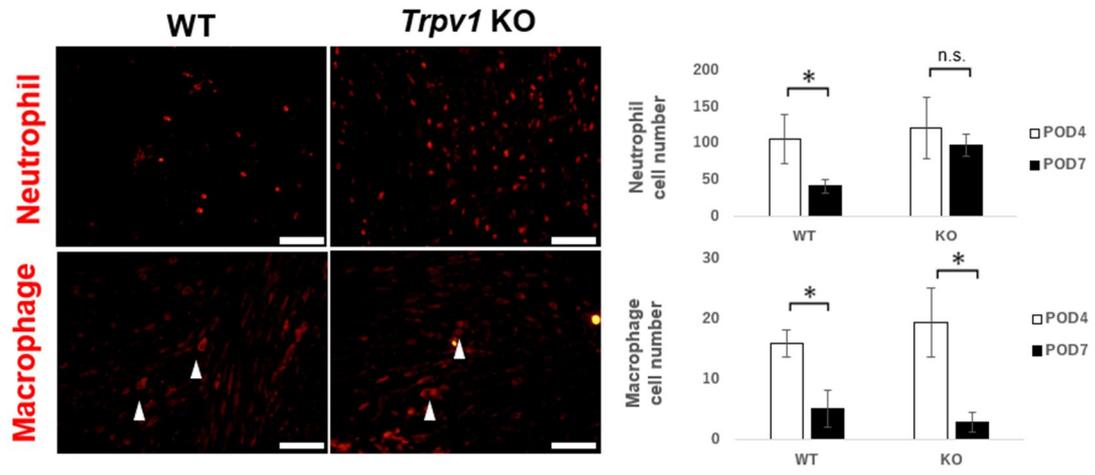


Figure 3

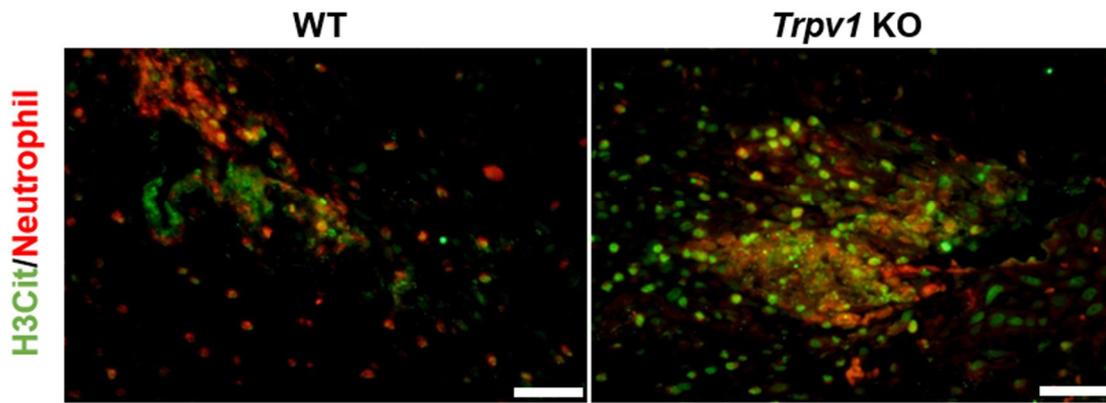
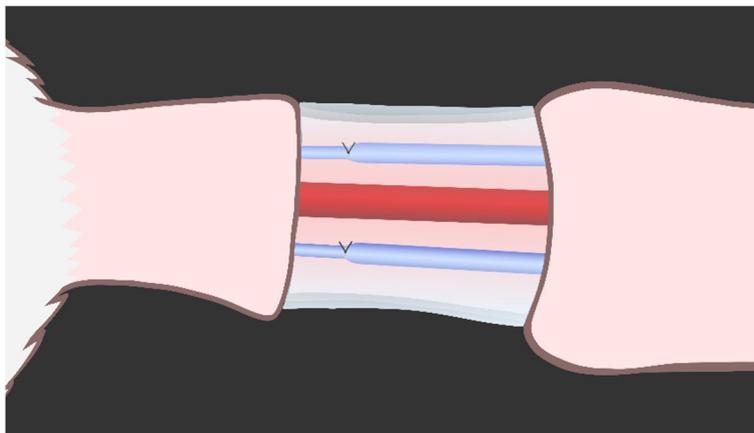


Figure 4



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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 UENO Kazuki, SAIKA Shizuya, OKADA Yuka, IWANISHI Hiroki, SUZUKI Kentaro, YAMADA Gen, ASAMURA Shinichi	4. 巻 Vol.72-2
2. 論文標題 Impaired healing of cutaneous wound in a $\text{Trpv1}^{-/-}$ deficient mouse	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 224-232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.22-0124	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野一樹、山田源、久米川真治、朝村真一
2. 発表標題 Trpv1欠損マウスにおける皮膚の創傷治癒遅延
3. 学会等名 第52回 日本創傷治癒学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野一樹、山田源、久米川真治、朝村真一
2. 発表標題 TRPV-1欠損マウスにおける創傷治癒遅延とその役割
3. 学会等名 第31回 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野一樹、橘五月、和田仁孝、朝村真一
2. 発表標題 TRPV-1欠損マウスにおける創傷治癒遅延とその役割
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------