

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23033

研究課題名（和文）メカノセンサーチャネルが調節する口腔粘膜創傷治癒機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms for oral mucosal wound healing regulated by mechanosensory cation channel

研究代表者

吉本 怜子（Yoshimoto, Reiko）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：70878181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔粘膜の治癒は皮膚よりも速やかで瘢痕が少ない。ゆえに、口腔粘膜の速やかな創傷治癒機構の解明は、口腔を含む全身における新たな治癒促進法を見出す手がかりとなりうる。私達は、口腔粘膜に機械刺激感受性のメカノセンサー陽イオンチャネルの発現を見出したことから、本研究では創傷治癒過程へのメカノセンサーの関与を明らかにすることを目指した。培養口腔上皮細胞を用いた超解像レベルの観察により、メカノセンサーイオンチャネル分子が特定の細胞骨格と関連すること、細胞の集団移動を調節することが明らかとなった。さらに、それらがマウス口蓋創傷モデルの創治癒に関連する上皮においても機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷からの速やかな治癒は、けが、手術後、褥瘡など多様な局面で課題となる。本研究では、重層扁平上皮の創傷治癒モデルとして、マウス口蓋創傷モデルを採用した。そして、粘膜上皮の治癒過程において重要な役割を果たす上皮の集団移動におけるメカノセンサーの関与を見出した。メカノセンサーの制御が治癒促進に関わることが示唆される結果が得られたことから、局所的かつ時間的なメカノセンサーの調節を標的とした治癒促進薬剤の応用が想定される。

研究成果の概要（英文）：Oral mucosa heals more rapidly with less scar than skin. Therefore, elucidating the mechanism of rapid wound healing of the oral mucosa may provide clues for new methods to promote wound healing. Since we found the expression of mechanosensitive cation channels in the oral mucosa, we investigated the role of mechanosensory channels in the wound healing processes. Immunofluorescence and live cell imaging using gingival epithelial cell lines revealed channel agonist-induced changes in cell migration and subcellular localization of the molecules at the super-resolution level. Furthermore, immunohistochemical analysis of a mouse palatal wound model revealed changes in mechanosensor expression and localization during the wound healing processes.

研究分野：常態系口腔科学

キーワード：創傷治癒 口腔粘膜 イオンチャネル メカノセンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

創傷は速やかに治癒することが求められる。口腔粘膜は咀嚼や飲食などにより機械的刺激を常に受けており、傷を受けることが多いが、口腔粘膜の傷は皮膚に比べて速やかに治り癒痕が少ない。ゆえに、口腔創傷治癒機構の理解はよりよい創傷ケアにつながると考えられているが、その詳細な機構は不明である。

申請者らのグループは、口腔粘膜上皮に機械的刺激や温度、低浸透圧、低 pH のセンサーである高カルシウム透過性イオンチャネル Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) が発現することを見出した。そして、口腔粘膜上皮が、口腔内の温かな温度で活性化されること、また TRPV4 が上皮細胞のバリア機能に関与することを明らかにした (Aijima et al. 2015 FASEB J; Yoshimoto et al. 2018 J Histochem Cytochem; Kitsuki et al. 2019 J Periodontal Res)。さらに、TRPV4 遺伝子欠失マウスでは上皮細胞移動および口腔粘膜創傷の治癒が促進されることも見出した。

機械的刺激は創傷治癒に影響することが知られているが (Agha et al. 2011 J Surg Res)、未だそのメカニズムは不明な点も多い。TRPV4 は機械感受性をもつメカノセンサーとしても知られている。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞の TRPV4 発現系で、低浸透圧による細胞膨張が phospholipase A2 (PLA2) 刺激に始まるアラキドン酸の代謝産物 epoxyeicosatrienoic acid により TRPV4 が活性化された (Watanabe et al. 2003 Nature) との報告もある。また近年、TRPV4 が細胞膜の進展や押込刺激によってはほとんど活性化されないものの (Servin-Vences et al. 2017 eLife)、TRPV4 を発現させた HEK293T 細胞を細かな柱状のシリコン基質の上で培養し、柱を揺らす刺激すなわち細胞-細胞外基質界面の変形により PLA2 非依存的に TRPV4 の活性化を生じるとの報告もなされている (Sianati et al. 2021 Front Bioeng Biotech)。このことから、組織においても TRPV4 が細胞外の物理的変化を感知していると考えられる。

傷を覆う上皮の再生は、上皮細胞が細胞間接着を調節しながら集団的な移動によって起こる。この際、再生する上皮の先端の細胞は周囲の環境を感知しながら進み、後に続く細胞は接着斑や細胞間結合を活発に再構成しながら均整を保って移動すると考えられるが、その分子実体は明らかとは言いえない。そこで、本研究では、再生する上皮が、TRPV4 を初めとしたメカノセンサーを介して周囲環境や組織に加わる機械的刺激を感知しながら、細胞移動や増殖、細胞間接着を調節し治癒に関与するとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

上皮再生は細胞移動と細胞間結合のダイナミックな調節を要する過程である。上皮再生の不良は治癒遅延を引き起こし、临床上問題となる。個体レベルの観察では、マウスが用いられることが多い。マウスの皮膚は上皮が薄く、また皮筋が存在し、創部が収縮することから、ヒトの創傷治癒とは異なっていると理解することができる。そこで重層扁平上皮の創傷治癒モデルとして口腔粘膜を用い、治癒過程におけるメカノセンサーイオンチャネルの役割を明らかにし、速やかな治癒をもたらす機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 創傷治癒過程における TRPV4 発現解析

8 週齢雄性の野生型 C57BL/6NCrSlc マウスの口蓋粘膜に、直径 1.5mm の生検パンチにて円型の創を形成し、術後 1-7 日目の組織を採取した。mRNA 発現解析と組織切片の免疫組織化学的解析を行った。

(2) 培養細胞を用いたイオンチャネルとアクトミオシンの局在解析

マウス歯肉上皮不死化細胞株 GE1 を 1%FBS 含有 SFM101 培地 (Nissui) にて培養すると、GE1 細胞は E-cadherin による細胞間接着を呈し、発達した仮足を有し活発に移動する。TRPV4 の細胞移動能への影響を知るため、GE1 細胞に TRPV4 agonist GSK1016790A を添加して in vitro 創傷治癒アッセイおよび生細胞ライブイメージングを行った。また、各分子の細胞内局在を明らかにするため、この細胞をガラス基質上に培養し、固定後、TRPV4 をミオシンやアクチンとともに蛍光免疫染色にて可視化し LSM800 Airyscan により超解像レベルで観察を行った。

4. 研究成果

(1) マウス口蓋創傷モデルは創形成から 4 日後より閉鎖し、7 日後では全数の創が閉鎖していた。TRPV4 の mRNA 発現は創形成前と比較して創形成後 2, 4 日後に低く、創形成 7 日にはやや回復して創形成前と有意差がなくなった。組織学的解析では、TRPV4 は残存上皮では上皮基底層での染色が顕著であったが、再生上皮では基底層での染色は減弱し、再生上皮先端に染色陽

性を呈した。

(2)-1 GE1 細胞に TRPV4 agonist を添加すると、細胞移動が抑制された。TRPV4 agonist 刺激した細胞では、コロニー辺縁の細胞の仮足において、アクチンが仮足の辺縁に集まって束を形成している所見が観察された。また、TRPV4 agonist 刺激により、細胞内のリン酸化ミオシン調節軽鎖(Thr18/Ser19)は減少した。EGTA による細胞外カルシウムのキレートにより TRPV4 agonist によるリン酸化ミオシン調節軽鎖の減少は抑えられた一方、BAPTA-AM により細胞内カルシウムをキレートするとリン酸化ミオシン調節軽鎖がほとんど見られなくなった。よって、TRPV4 を介したアクトミオシンの調節は細胞内外のカルシウムに依存することが示唆された。

(2)-2 培養上皮細胞株の免疫染色により、TRPV4 の細胞内局在ならびに細胞骨格分子との位置関係の同定を行った。コロニー辺縁（移動する細胞群の先端に位置する）の GE1 細胞において、TRPV4 の染色陽性は細胞仮足に含まれるアクチン線維の上に局在し、その局在パターンはミオシンのようにアクチン上に等間隔に認められた。また、TRPV4 の染色陽性は一部 myosin IIA, 2pMRLC と共存した。一方、密に培養した GE1 細胞は細胞間に E-cadherin とその裏打ちをなす線維状アクチンからなる細胞間接着を呈した。細胞同士の境界面で線維状アクチンが束となって皮質アクチンを形成する部位では、TRPV4 は細胞膜へ集積していた。このような TRPV4 の局在は、移動する細胞の仮足および細胞間接着部位で、それぞれアクトミオシンを調節する働きと関連することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉本 怜子, 合島 怜央奈, 澤田 孟志, 高イキ, 曹 愛琳, 大崎 康吉, 城戸 瑞穂
2. 発表標題 温度感受性イオンチャネルTRPV4によるアクトミオシン動態調節と創傷治癒の関連
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉本 怜子, 澤田 孟志, 高イキ, 曹 愛琳, 城戸 瑞穂
2. 発表標題 口腔上皮細胞におけるアクチン動態変化の観察
3. 学会等名 第64回日本顕微鏡学会九州支部集会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本 怜子, 大崎 康吉, 澤田 孟志, 福山 哲平, 古賀 龍之介, 城戸 瑞穂
2. 発表標題 温度感受性イオンチャネルTRPV4は口腔粘膜上皮細胞内アクチン動態を制御する
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本 怜子, 合島 怜央奈, 大崎 康吉, 曹 愛琳, 高イキ, 城戸 瑞穂
2. 発表標題 温度感受性イオンチャネルTRPV4はアクチン・ミオシンの調節を介して口腔粘膜上皮細胞の移動および細胞間接着を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、曹愛琳、高イキ、内野加穂、澤田孟志、城戸瑞穂
2. 発表標題 温度感受性イオンチャネルTRPV4によるアクチン・ミオシンの調節と口腔粘膜創傷治癒の関連
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、曹愛琳、高イキ、西山めぐみ、本田裕子、内野加穂、澤田孟志、城戸瑞穂
2. 発表標題 口腔粘膜上皮の創傷治癒における温度感受性イオンチャネルTRPV4
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、曹愛琳、高イキ、本田裕子、内野加穂、澤田孟志、城戸瑞穂
2. 発表標題 口腔粘膜創傷治癒におけるTRPV4の影響
3. 学会等名 第15回TRPチャネル研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、曹愛琳、高イキ、本田裕子、内野加穂、澤田孟志、清島保、城戸瑞穂
2. 発表標題 口腔粘膜創傷治癒におけるアクトミオシン細胞骨格の変化とTRPV4の影響
3. 学会等名 第62回日本歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------