

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670870

研究課題名(和文) 温度感受性を利用した新たな創傷治療薬の開発

研究課題名(英文) Wound Healing via utilizing thermosensitivity

研究代表者

城戸 瑞穂 (Kido, Mizuho)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60253457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔は身体の他の部位に比べ、多様な化学・機械・温度刺激に曝されている。ゆえに粘膜が損なわれ傷ができることも少なくないが口腔粘膜は再生能力が高く速やかに治癒し、瘢痕も生じにくいことが知られている。私たちは、口腔内の温度が皮膚表面よりも高いことに着目し、温かい温度で活性化されるイオンチャネルであるTRPV3 (transient receptor potential vanilloid channel)に着目した。マウス臼歯を抜歯する創傷モデルで治癒期間の比較したところ、TRPV3遺伝子欠失マウスでは野生型マウスよりも創部の治癒が遅延していたことからTRPV3が創傷治癒に関わる事を見出した。

研究成果の概要(英文)：Oral mucosa is exposed by various stimuli including thermal, mechanical or chemical stimuli in food and drink. Because of that, it is susceptible to injure but is known to heal faster compared with the skin. As the temperature in the oral cavity is higher than on the skin, we explore the effect of thermosensitive ion channel, TRPV3 (transient receptor potential vanilloid channel) on the wound healing processes. Since we found delayed wound healing in the TRPV3 gene deleted mice, TRPV3 is suggested to be important molecule in the oral wound healing processes.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：口腔粘膜 イオンチャネル 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

口腔は重層扁平上皮である口腔上皮にくまなく覆われている。口腔粘膜は、身体他の部位に比べ、多様な化学・機械・温度刺激に曝されている。飲食物に含まれる多様な刺激を適切に感知することにより、私たちの体に必要なものを摂取し、不要なものを吐き出すという役目を担っている。多様な刺激にさらされた結果、口腔粘膜が損なわれ、創ができることも少なくないが、その一方で再生能力が高く速やかに治癒し、瘢痕も生じにくいことが知られている。その速やかな治癒を可能にしている理由として、唾液の成分や血流が豊富であることなどが挙げられているが、その機構は明らかとはいえない。

TRP (transient receptor potential) チャネルファミリーは、非選択的な陽イオン透過性のチャネルとして知られており、細胞内外のセンサーとして多様な刺激を受容することが見出されている (Caterina et al, 1997; Moran et al, 2004; Ramsey et al, 2006)。これまでに哺乳類では 28 種類の TRP チャネルが報告されているが、その中で TRPV3 (transient receptor potential vanilloid 3) は 33 以上の温度で活性化すること、さらに、食用ハーブであるタイムやオレガノなどの抽出物により活性化されることが報告されている (Xu et al, 2006)。また、TRPV3 は、皮膚角化細胞にて顕著な発現を示し、温度感受性を示し、温度刺激により上皮細胞から ATP が放出されることが報告されている (Chung et al, 2003, 2004; Moqrich et al, 2005; Mandadi et al, 2009)。さらに、TRPV3 遺伝子欠失マウス (TRPV3KO) は、体毛が波打っていること、皮膚への外来物の進入が亢進すること、TRPV3 活性化が上皮成長因子受容体 (EGFR) 活性化を促すことを報告している (Chung et al, 2010)。また、私たちは、口腔上皮が TRP チャネルを介して活性化することを明らかにしてきた (Kido et al, 2003, Shimohira et al, 2009, Wang et al, 2011)。さらに、私たちは口腔粘膜の上皮細

胞が TRPV3 により温度感受性を示すことを見いだした。

## 2. 研究の目的

上記のように皮膚の TRPV3 がバリア能に関わることが報告されたことから、口腔粘膜の速やかな創傷治癒に TRPV3 が関わるとの仮説を立て、研究を行うこととした。

## 3. 研究の方法

すべての動物実験は九州大学動物委員会により計画の承認を得て、動物福祉に配慮して行った。TRPV3KO は、C57BL/6Ncr と 10 世代以上 backcross させたものを用いた。また C57BL/6 NCr (WT) マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) は対照として用いた。マウスは SPF 環境にて自由に食餌飲水できる状況で飼育した。麻酔下の 5-8 週令のマウスの第一臼歯を抜歯し、3, 5, 7 日後に灌流固定を施し、治癒を観察した。また抜歯より安定な創傷モデルとして口蓋に 1.5mm の創を作製するモデルも検討した。

## 4. 研究成果

TRPV3KO は、WT に比べ、抜歯後の創の面積が広がった。また、TRPV3KO は、WT に比べ、細胞の増殖が低下していた。さらに、初代培養口腔上皮細胞においても TRPV3KO より採取した細胞は WT の細胞に比べ、増殖活性が低かった。また、培養細胞を 31 と 37 との異なる温度で培養して比較したところ、WT で認められる 37 での増殖増強が TRPV3KO 細胞では認められなかった。さらに TRPV3 活性化剤を培養液に添加したところ WT 細胞では細胞増殖が上昇したが、TRPV3KO 細胞では TRPV3 活性化剤による効果は認められなかった。

以上のことから、TRPV3 活性化が上皮の増殖や移動に関わり、創傷治癒を積極的に促進していることが示唆された。

TRPV3 製剤の応用のために、より簡便かつ安定的なモデルとして口蓋にパンチ創を作製し、その治癒過程を観察した。口蓋の円形パンチモデル

においても、TRPV3KOではWTに比べ、治癒が遅延しており、抜歯モデルにおける結果と一致していた。口蓋モデルの方が抜歯モデルに比べ、創の上皮形態のばらつきが少ないことから、粘膜治癒のモデルとして評価がしやすいこともわかった。組織学的な観察では、口蓋モデルと抜歯モデルでは、上皮の伸展移動形態が異なっていた。教科書的な分類では、歯肉は被覆粘膜、口蓋は咀嚼粘膜とされることから、粘膜の特徴による差や創による欠損の大きさによるのかもしれない。次に、免疫組織学的にN-Cadherin, Vimentinの発現増加,  $\beta$ -Cateninの核移行, E-Cadherin など上皮間葉転換のマーカー群の発現変化を調べた。その結果治癒過程組織の上皮がそれらの分子マーカーの発現を多様に変化させていることがわかった。

## 引用文献

- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824
- Chung, M. K., Lee, H., Caterina, M. J. (2003) Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 32037–32046
- Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., Caterina, M. J. (2004) TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 21569–21575
- Kido, M. A., Muroya, H., Yamaza, T., Terada, Y., Tanaka, T. (2003) Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. *J. Dent. Res.* 82, 393–397
- Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S., Andahazy, M., Story, G. M., Patapoutian, A. (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468–1472
- Mandadi, S., Sokabe, T., Shibasaki, K., Katanosaka, K., Mizuno, A., Moqrich, A., Patapoutian, A., Fukumi-Tominaga, T., Mizumura, K., Tominaga, M. (2009) TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Moran, M. M., Xu, H., Clapham, D. E. (2004) TRP ion channels in the nervous system. Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 362–369
- Ramsey, I. S., Delling, M., Clapham, D. E. (2006) An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 619–647
- Shimohira, D., Kido, M. A., Danjo, A., Takao, T., Wang, B., Zhang, J. Q., Yamaza, T., Masuko, S., Goto, M., Tanaka, T. (2009)

TRPV2 expression in rat oral mucosa.  
*Histochem. Cell Biol.* 132, 423–433  
Wang, B., Danjo, A., Kajiya, H., Okabe, K.,  
Kido, M. A. (2011) Oral epithelial cells are  
activated via TRP channels. *J. Dent. Res.* 90,  
163–167  
Xu, H., Delling, M., Jun, J. C., Clapham, D.  
E. (2006) Oregano, thyme and clove-derived  
flavors and skin sensitizers activate specific  
TRP channels. *Nat. Neurosci.* 9, 628–635

#### 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)

Aijima R, Wang B, Takao T, Mihara H,  
Kashio M, Ohsaki Y, Zhang JQ, Mizuno A,  
Suzuki M, Yamashita Y, Masuko S, Goto M,  
Tominaga M, Mizuho A. Kido (2015)

The thermosensitive TRPV3 channel  
contributes to rapid wound healing in oral  
epithelia. *FASEB J.* 29(1): 182-92

〔学会発表〕(計 18 件)

#### 【学会発表】

1. 城戸瑞穂、木附智子、合島 怜央奈、吉  
本怜子、張旌旗、大崎康吉  
口腔粘膜バリアに関わる温度感受性  
TRPV チャンネル第 121 回日本解剖学会  
郡山、2016.3.28-30
2. 城戸瑞穂、木附智子、合島怜央奈、吉  
本怜子、曹愛琳、張旌旗、大崎康吉 口  
腔粘膜上皮防禦機構への温度感受性  
TRP チャンネルの関与 第 6 回福岡薬  
理・生理学研究会 2015.12.24
3. 木附智子、合島怜央奈、畠山純子、大  
崎康吉、吉本怜子、張旌旗、城戸瑞穂  
歯肉付着上皮バリアへの TRPV4 チャ  
ネルの関与。第 9 回三叉神経領域の  
感覚-運動統合機構研究会

2015.11.28-29 志賀島

4. 合島怜央奈、木附智子、吉本怜子、大  
崎康吉、張 旌旗、檀上 敦、山下佳  
雄、村田 祐造、曹愛琳、城戸瑞穂 口  
腔創治癒過程における上皮間葉転換  
関連分子の発現変化  
第 9 回 三叉神経領域の 感覚-運動統  
合機構研究会 2015.11.28-29 志賀島
5. Mizuho A Kido, Tomoko Kitsuki, Reona  
Aijima, Reiko Utsunomiya, Jing-Qi  
Zhang, Yasuyoshi Ohsaki. Temperature  
sensitive TRP channels in Oral Epithelial  
Barrier. The 13th International  
Symposium on Molecular and Neural  
Mechanisms of Taste and Olfactory  
Perception Fukuoka, 2015.11.3-4.
6. Tomoko Kitsuki, Reona Aijima, Junko  
Hatakeyama, Yasuyoshi Ohsaki, Jing-Qi  
Zhang, Mizuho A. Kido Effect of TRPV4  
gene deletion to barrier function in  
gingival epithelium. The 63rd Annual  
Meeting of JADR 2015 30<sup>th</sup> Oct. 2015  
Fukuoka International Congress Center
7. 木附智子、合島 怜央奈、畠山純子、  
大崎康吉、張旌旗、城戸瑞穂 TRPV4  
遺伝子欠失が歯肉付着上皮における  
物質透過性に与える影響 第 57 回  
歯科基礎医学会学術大会  
2015.9.11-13 新潟
8. 合島怜央奈、木附智子、吉本怜子、大  
崎康吉、張 旌旗、檀上 敦、山下佳  
雄、城戸瑞穂 マウス口蓋創傷モデル  
の治癒過程における上皮間葉転換  
関連分子の発現解析 2015.9.11 ~ 13  
新潟
9. Reona Aijima, Tomoko Kitsuki, Bing  
Wang, Tomoka Takao, Hiroshi Mihara,  
Makiko Kashio, Reiko Yoshimoto,  
Yasuyoshi Ohsaki, Jing-Qi Zhang,  
Makoto Tominaga, Mizuho A. Kido

- Oral mucosal barrier via thermosensitive TRP channels\_Third TRP meeting Leuven September 15,16, 2015
10. 合島怜央奈、王 冰、高尾知佳、三原弘、加塩麻紀子、大崎康吉、張 旌旗、木附智子、村田 祐造、富永真琴、城戸瑞穂 温度感受性 TRP チャネルを介した口腔粘膜の創傷治癒制御 2015 年度の生理学研究所研究会「生体ホメオスタシスの gateway としての上皮膜輸送マイクロホメオスタシス機構」2015 年 9 月 15 日-9 月 16 日愛知県岡崎市
  11. 合島怜央奈、木附智子、王 冰、高尾知佳、三原弘、加塩麻紀子、大崎康吉、張 旌旗、富永真琴、城戸瑞穂 口腔粘膜における TRPV3 チャネルの EGFR シグナルを介した速やかな創傷治癒への関与。第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会（合同大会） 神戸、2015.3.21-23.
  12. Reona Aijima, Bing Wang, Tomoka Takao, Hiroshi Mihara, Makiko Kashio, Yasuyoshi Ohsaki, Jing-Qi Zhang, Sadahiko Masuko, Makoto Tominaga, Mizuho A. Kido The role of thermosensitive TRP channel in oral wound healing Kyudai 2015
  13. 合島怜央奈、大崎康吉、張旌旗、木附智子、村田直久、城戸瑞穂 温度感受性 TRP チャネル活性化による新しい口腔上皮治癒機構の解明。第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡、2014.9.25-27.
  14. 木附智子、合島怜央奈、畠山純子、大崎康吉、張旌旗、城戸瑞穂 歯肉上皮バリア機能への TRPV4 の関与。優秀ポスター賞受賞。第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡、2014.9.25-27.
  15. Aijima R, Yamashita Y, Danjo A, Kido MA, Goto M. The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 96th Annual Meeting, Honolulu, 2014.9.8-13.
  16. 合島 怜央奈、王冰、高尾知佳、三原弘、加塩麻紀子、大崎康吉、張旌旗、水野敦子、鈴木誠、富永真琴、城戸瑞穂 口腔粘膜における TRPV3 チャネルを介した創傷治癒制御。第 10 回 TRP チャネル研究会、岡崎、2014.6.5-6.
  17. 合島怜央奈、王 冰、高尾知佳、三原弘、加塩麻紀子、大崎康吉、張 旌旗、富永真琴、城戸瑞穂 口腔粘膜における温度感受性 TRP の創傷治癒への関与。第 91 回日本生理学会大会、鹿児島、2014.3.16-18.
  18. Aijima R, Yamashita Y, Danjo A, Kido MA, Goto M. Thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. The 26th Conference of the Taiwan Association Oral and maxillofacial Surgeons, Tainan, 2014.3.8-9.
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
城戸 瑞穂 ( Kido Mizuho )  
九州大学大学院・歯学研究院・准教授  
研究者番号：60253457
- (2)研究分担者  
大山 順子 ( Ohyama Yukiko )  
九州大学大学院・歯学研究院・助教  
研究者番号：70294957