


論 文 要 旨

区 分	Ⓐ・乙	氏名	宮崎 綾子	
-----	-----	----	-------	---

Integrin $\alpha 6\beta 4$ and TRPV1 channel coordinately regulate directional keratinocyte migration.

研究目的

上皮細胞が外部からの刺激に応答して運動性を高め、方向性を持って遊走すること (chemotaxis や mechanotaxis など) は、創傷治癒の重要なプロセスの1つである。インテグリン $\alpha 6\beta 4$ (以下 $\beta 4$ とする) は、細胞遊走促進に働くとの多くの報告があるが、まだ明確になっていないことも多い。一方、 Ca^{2+} シグナルも、細胞運動や接着を調節することによって遊走を制御するとされる。 Ca^{2+} 流入チャネル TRPV1はケラチノサイトに発現するが、遊走に際しての細胞内 Ca^{2+} レベルの調節体としての TRPV1 の関与は不明である。本研究では、 $\beta 4$ と関連した細胞遊走における TRPV1 の役割について検討した。

材料および方法

細胞遊走実験 (スクラッチアッセイ) : マウスケラチノサイト Pam212 を単層培養し、集密的な状態で約 500 μm の幅で傷付けを行い、一定時間後の細胞が遊走した距離を測定した。蛍光免疫染色 : 遊走中の細胞を、TRPV1, インテグリン $\beta 4$ の特異的抗体にて染色した。コバルト取込アッセイ : TRPV1 を介した Ca^{2+} 流入の指標として、代替イオンとしての Co^{2+} 流入を観察した (硫化物 CoS として沈殿させて検出)。遺伝子定量解析 : リアルタイム PCR により行った。

結果及び考察

- ① $\beta 4$ の遊走への関与及び TRPV1 との協調的発現 : 蛍光免疫染色の結果、傷付けに応答した遊走に際して、遊走先端部の細胞集団において $\beta 4$ の発現増加が認められた。また、 $\beta 4$ の遺伝子ノックダウンによって遊走が有意に抑制されたことは、 $\beta 4$ が細胞遊走に関与することを示している。一方、TRPV1 も遊走先端部細胞に特異的に発現し、その発現は $\beta 4$ の発現細胞とほぼ一致していた。遊走誘導因子として働く epidermal growth factor 刺激によって、遊走が促進され、同時に、両者とも発現量が有意に増加した。これらの結果は、遊走に際して両者が協調して発現誘導されることを示している。
- ② TRPV1 の遊走への関与 : TRPV1 活性化薬カプサイシンは遊走距離を有意に増加させ、この作用は TRPV1 阻害薬 AMG9810 によって拮抗された。また、カプサイシンによって、 Ca^{2+} 流入の指標である CoS の蓄積が遊走先端部細胞に顕著に生じ、これらの細胞の分布は、TRPV1 免疫陽性細胞発現パターンと類似していた。これらから、TRPV1 刺激が Ca^{2+} 流入を介して遊走の促進に働くことが示唆された。
- ③ TRPV1 刺激に働く内因性機序 : カプサイシン刺激無しでも、傷付けに応答した CoS の蓄積が遊走先端部細胞に特異的に生じた。また、内因性リガンドにも拮抗する AMG9810 単独処置や TRPV1 遺伝子ノックダウンでも有意に遊走が抑制された。これらから、TRPV1 を刺激する内因性機序が傷付け刺激によって生じ、発現増加した TRPV1 を介して働く可能性が示唆された。
- ④ $\beta 4$ の発現誘導 : TRPV1 ノックダウンによって、 $\beta 4$ の mRNA の発現、遊走細胞での $\beta 4$ タンパクの発現が共に抑制された。また、AMG9810 は、遊走先端部での TRPV1 の発現には影響せず、 $\beta 4$ の発現のみを抑制した。これらの結果は、TRPV1 が Ca^{2+} 流入を介して $\beta 4$ の発現誘導にも関与していることを示唆している。

結 論

本論文では、傷付け後のケラチノサイトの遊走に際して、遊走先端部細胞において TRPV1 チャネルの発現が増加し、 Ca^{2+} 流入を介して遊走の促進をもたらすこと、さらには、遊走促進に働く $\beta 4$ の発現誘導によっても遊走を制御することを示した。本研究にて明らかになったケラチノサイトの遊走における TRPV1 の新しい役割を解明することによって、創傷の治療法の新たな開発につながることを期待される。