

主論文の要旨

**Mechanosensitive ATP release from hemichannels
and Ca²⁺ influx through TRPC6 accelerate wound
closure in keratinocytes**

〔ヘミチャネルからの伸展刺激依存性ATP放出とTRPC6チャネルを介したCa²⁺流入はケラチノサイトの創傷閉鎖を加速する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
細胞科学講座 細胞生物物理学分野

(指導：久場 博司 教授)

高田 弘弥

【緒言】

皮膚の表皮細胞は、様々な外的環境に常に曝され、熱、紫外線、化学物質などの物理化学的刺激だけでなく、接触や伸展などの機械的刺激も固有のセンサーで感知している。しかし、その感知機構や役割についての全容は未解明のままである。本研究では、HaCaT 培養表皮細胞の創傷治癒モデルを用いて、表皮細胞の伸展に伴う細胞外への ATP 放出とその拡散による細胞間 Ca^{2+} 波の伝播をリアルタイムイメージング法により観察した。その結果、ATP 放出経路には hemichannel、 Ca^{2+} 流入経路には TRPC6 チャンネルが関与しており、さらにこの ATP- Ca^{2+} シグナリング系の阻害剤は創傷治癒を抑制することを明らかにした。本研究は創傷治癒過程に機械刺激と ATP- Ca^{2+} シグナリング系が深く関わっていることを示した初めての例である。

【方法】

カラーゲンコートしたシリコン製薄膜チャンバー上に幅約 250 μm のストリップを貼付して HaCaT 細胞を培養し、コンフルエント達成後にストリップを剥離して線状の創傷（細胞の非存在部位）を作成し、創傷治癒アッセイを行った。蛍光指示薬 Fluo-8 を AM 体で細胞に取り込ませ細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を、また Luciferin-Luciferase 試薬を外液に加えそのバイオルミネッセンス反応を用いて細胞外 ATP 放出を、それぞれのイメージングによって測定した。培養と実験は創傷時の上皮環境を模した Ca^{2+} 濃度 (0.07 mM) 溶液中で行った。

【結果及び考察】

創傷形成作成後、持続的な一軸伸展刺激を与え、顕微鏡下で創傷部位の閉鎖を経時的に観察した。その結果、20%の伸展刺激によって顕著な創傷治癒促進効果（8 時間で創傷閉鎖）が見られた (Fig. 1A)。この促進効果は一過性の伸展刺激（20%, 1 s）でも同様に見られた。伸展刺激に加え TRPC6 チャンネルの活性化剤 hyperforin (1 μM) を投与することで、創傷の閉鎖がさらに促進（6 時間で創傷閉鎖）された (Fig. 1B)。伸展刺激と TRPC6 チャンネルの活性化によって創傷閉鎖がなぜ促進されるのか、その機序を明らかにするため、伸展による Ca^{2+} 応答を測定した。

創傷形成 3 時間後、一過性の伸展刺激によって創傷部位先端から Ca^{2+} 上昇が誘起され、 Ca^{2+} 波が先頭から後方の細胞群へ伝播し、5 分以上にわたって持続した (Fig. 2A)。Hyperforin 未処理の細胞では、そのような伸展依存性 Ca^{2+} 波は見られなかった (Fig. 2B)。この Ca^{2+} 波は ATP 分解酵素 apyrase、ATP 受容体阻害剤 suramin 及び ATP 放出サイトとして予想される hemichannel の阻害剤 carbenoxolone (CBX) によって抑制され (Fig. 2C)、ATP の関与が示唆された。また、これらの阻害剤は創傷閉鎖を著しく抑制した (Fig. 2D)。

次に、細胞外 ATP のイメージングを行った。伸展刺激を加えると、ATP が創傷部最前列細胞から放出され、ゆっくりと拡散する様子が観測された (Figs. 3A,B)。放出 ATP と Ca^{2+} 応答の時間経過を創傷部先端から各距離で測定し比較すると、先端の細胞を除

き ATP の拡散 (Figs. 4A,B; 点線) 後に Ca^{2+} 反応 (Figs. 4A,B; 実線) が起こっており, 放出 ATP が拡散し周りの細胞で P2Y 受容体が活性化することによって Ca^{2+} 波が伝播していることが示された。

ATP 放出の機序を探るため, gap junction/hemichannel 透過性の蛍光試薬 calcein の共存下で伸展刺激と放出 ATP のイメージングを行った。創傷形成 3 時間後に calcein を投与しても取り込みは全く見られなかったが (Fig. 5A), 伸展刺激を加えると創傷部位最前列の細胞でのみ calcein が検出され (Fig. 5B), この取り込みは CBX によって阻害された (Fig. 5C)。さらに放出 ATP のイメージングを同時に行った結果, ATP 放出サイトのみ calcein の取り込みが見られたことから (Fig. 5D), 伸展刺激によって開口した hemichannel を介して ATP が放出されたことが示唆された。Hemichannel としては pannexin 及び connexin が考えられるが, 創傷部位における抗体染色のイメージング (Fig. 6) を行った結果から, この細胞においては pannexin が機能していると推測された。

機械刺激による Ca^{2+} 応答の細胞内機序を明らかにするため, 少し強い伸展刺激を与え培養コロニー全体が反応した状態での Ca^{2+} 応答に対する各種阻害剤の影響を見た。Fluo-8 の蛍光反応を, 実験最後に ionomycin 処理して得られた最大応答で normalize した。Hyperforin 処理によって伸展依存性 Ca^{2+} 応答は増大し, 持続時間も顕著に増加した (Fig. 7A)。以下ではこの hyperforin 処理細胞をコントロールとし阻害剤の影響を測定した。 Ca^{2+} -free 外液中では Ca^{2+} 反応はほぼ抑制され, Ca^{2+} 流入が反応の大部分をしめていることがわかる (Fig. 7A)。阻害作用を示した阻害剤をみても伸展によって放出された ATP が各細胞の P2Y 受容体を活性化し G タンパク質/PLC/DAG 経路を介して TRPC6 が活性化され Ca^{2+} 流入が増大したことを示している (Fig. 7A)。これらの阻害剤は創傷閉鎖に対しても同様に作用し, それを顕著に抑制することが確かめられた (Fig. 7B)。このことは伸展刺激による創傷閉鎖促進に ATP- Ca^{2+} シグナリング系が深く関わっていることを強く示唆する。

さらに, ATP 刺激による Ca^{2+} 流入 (Fig. 8A) 及びその G タンパク質の下流で生じる DAG を模した膜透過性類似体 OAG 添加によって活性化される Ca^{2+} 流入 (Fig. 8B) に対し, 上記阻害剤の影響を調べた。Figs. 8A,B に示すように, 伸展刺激による Ca^{2+} 流入と同様にこれらの阻害剤で抑制された。

以上の結果を模式図 (Fig. 9) にまとめた。HaCaT 表皮細胞において伸展刺激はまず創傷部位最前列細胞のヘミチャネルを活性化し ATP 放出を引き起こす; 放出された ATP は autocrine/paracrine 的に周囲の細胞に作用し G タンパク共役型の P2Y 受容体を活性化する; P2Y 活性化の下流にある DAG 経路は TRPC6 からの Ca^{2+} 流入を活性化する; この持続的な Ca^{2+} 流入が創傷治癒促進に重要な役割を果たすと考えられる。

最後にさらに興味深いことに, 外的な伸展刺激を与えない条件下で上記の ATP- Ca^{2+} シグナリングの各種阻害剤処理の創傷治癒への影響を調べたところ, これらの薬物によって顕著に抑制された (Fig. 10A)。この事実は, 外的な機械刺激のない通常の創傷治癒過程においても, 創傷部位に面した最前列細胞が遊走する時, 先端では protrusion

(突出), 細胞後方では **contraction** (収縮), そして後続細胞に対しては **traction** (牽引) などの内在的なメカニカルフォースが生じており (Fig. 10B), これらメカニカルストレスによる ATP-Ca²⁺シグナリング系の活性化が創傷治癒に関与していることを想像させる。

【結論】

本研究では, メカニカルストレスに対する表皮細胞の応答メカニズムを解明するために, 創傷治癒モデルを用いて, 伸展刺激と ATP-Ca²⁺シグナリングのイメージングを行った。その結果, 伸展刺激が創傷治癒を促進する分子機構において, **hyperforin** は **TRPC6** を介して, 細胞の遊走時に細胞内に生じる伸展刺激や後続細胞に対する牽引 (伸展) 刺激による **hemichannel** からの ATP 放出と続く細胞内 Ca²⁺流入を増強し, 創傷治癒促進に寄与するものと推測された。

本研究により得られた, 伸展刺激の創傷治癒促進効果とその分子機序に関する知見は, 新しい創傷治療剤を開発する上で重要な基盤を提供すると思われる。