

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20324

研究課題名(和文)表皮細胞の抗張力反応の解析

研究課題名(英文)Analysis of epidermal cell-mediated response by tensile strength

研究代表者

加茂川 留理 (Ruri, Kamogawa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70749324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚損傷時や皮膚欠損縫縮時、損傷部位の離開を防ぐ結果として必ず癒痕が生じる。このメカニズムを解明すべく、骨延長術のデバイスをマウス背部に装着しマウス皮膚持続的張力負荷モデルを用いた検討をおこなった。その結果これまでは真皮細胞だけでなく表皮細胞にも抗張力反応を示すことが明らかとなった。真皮細胞は進展収縮に並行して配列するが、表皮細胞の場合には進展収縮の方向と垂直に配列した。こうした細胞ではSMAの発現が認められた。そしてPlatelet-Derived Growth FactorがSMA発現を予防し、さらには癒痕をおさせる因子の一つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When skin is injured, to prevent the dissection of the wound, scar always occurs. In order to elucidate this mechanism, a device for distraction osteogenesis was attached to the back of the mice and evaluated their skin which load continuous tension. As a result, it has been clarified that not only the dermal cell but also epidermal cell have cell-mediated reaction by tensile strength reactions. The dermal cells are arranged in parallel with the progressive contraction but in epidermal cells they are aligned perpendicular to the direction of the development contraction. Expression of SMA was observed in these cells. It was suggested that Platelet - Derived Growth Factor prevents SMA expression and is one of factors to prevent scar.

研究分野：形成外科

キーワード：抗張力反応

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の様々な細胞は、外部環境(「場」)から与えられる張力により細胞内のシグナル伝達経路が活性化され、その張力により細胞が適応するとともに、張力の組織全体に与える影響を緩和させる。このシステムの代表として、血流・血圧に対する血管内皮細胞・動脈平滑筋細胞の応答がよく知られている。これらの細胞は発生期だけでなく後天的にも(動脈硬化時など)、血圧の上昇、血流のずり応力を感じ、その血圧・血流に耐えうる動脈としての頑丈な表現型を呈する適応能力を持つ。

形成外科領域において、最重要課題の一つに scarless wound healing がある。すなわち、皮膚においては特に皮膚損傷時や皮膚欠損縫縮時、周囲組織からの張力がかかるが、皮膚深層に存在する真皮細胞が筋線維芽細胞(Smooth muscle actin:SMA 陽性)へ分化することにより外部からの張力を緩和し、損傷部位の離開を防ぐ。その結果として必ず癒痕が生じる。

しかしながら、そのメカニズムの解明は十分ではない。

## 2. 研究の目的

申請者のグループは独自の骨延長術のデバイスをマウスに適用し、新規マウス皮膚持続的張力負荷モデルを確立した。このモデルにより、再現性の高い定量的な張力を皮膚に負荷することが可能であることが判っている。申請者はこれまでの予備実験で伸展刺激を与えた皮膚の組織学的解析において、真皮線維芽細胞だけではなく表皮細胞にも張力応答反応が存在するという、これまでの皮膚張力応答メカニズムの理解に関して全く新しい知見を示唆する所見を得ている。

さまざまな視点から表皮細胞の変化を解析し、その張力応答細胞としての表現型を明確にする。また網羅的遺伝子解析により、表

皮細胞の変化において変動する遺伝子をピックアップし、その機能を明らかにし『表皮細胞の抗張力反応』という全く新しい視点により皮膚の張力応答メカニズムを理解することを目的とする。すなわち当該領域は動く・ゆらぐ細胞がそれを囲む「場」からの拘束を受けて組織全体の調和がもたらされるメカニズムを明らかにすることを目的としている。本研究は皮膚に特化し、表皮細胞が張力と言う「場」からの影響による細胞の挙動変化、皮膚という組織全体の調和へのメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

マウス背部皮膚に創を作成後、その創部をまたぐようにして延長器を装着する。この延長器は頭蓋顎顔面領域において骨延長術の際に使用しているものである。そして皮膚に持続的張力負荷このモデルにより作成された持続的張力負荷後の皮膚組織を採取し、免疫組織学的解析を行う。申請者は Keratin5 陰性の終末分化に近い細胞に SMA の強い発現を見出しているが、SMA 以外の各種細胞骨格構成タンパクの発現を網羅的に評価して張力応答細胞としての表現型を明確にする。

そして持続的張力を加えたときの表皮細胞をフローサイトメトリーにより分離・回収し、*in vitro*において培養細胞シートの系をシリコン膜伸展培養装置と組み合わせ、表皮細胞の張力負荷時の細胞の挙動を詳細に観察する。また SMA 発現を抑制するとされる PDGF 受容体キナーゼ阻害剤である AG1296 を投与した際の反応を解析する。

最終的には解析にて得られた興味深い遺伝子の働きを明確にするために、表皮細胞特異的 Cre マウスである *Keratin5-Cre* マウスとの交配により表皮細胞特異的ノックアウトマウスを作成し、皮膚持続的張力負荷時の表皮における該当遺伝子の機能をより特異的に解析する。

#### 4. 研究成果

持続的張力負荷を創部にかけることで、表皮細胞は著しい過形成を起こした。このとき真皮内筋線維芽細胞が抗張力を発揮すべく張力と同方向に走行するのとは対照的に、表皮構造は垂直方向に成長していくことが確認できた。そして張力に応じて発現する Smooth muscle actin (SMA) が、真皮筋線維芽細胞のみならず、表皮細胞にも強く発現しており、この SMA の発現は表皮基底層より上層、つまり終末分化に近い表皮細胞 (Keratin5 陰性) で強く発現していた(図 1)。これらの知見は真皮線維芽細胞だけでなく表皮細胞にも張力応答反応が存在することを示唆している。

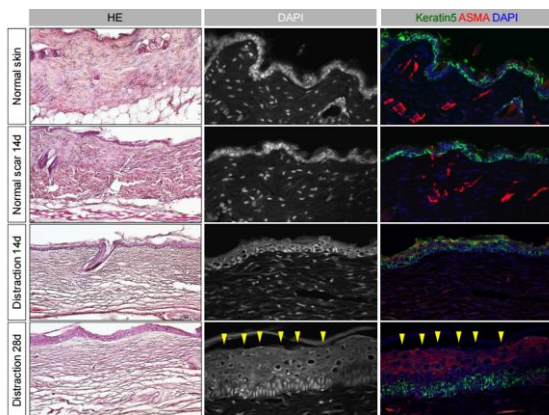


図 1 持続的張力負荷をかけた際の表皮、真皮細胞の反応

培養したマウス表皮細胞を *in vitro* にて一定方向へ進展刺激を加える検討を行った結果、細胞は進展収縮の方向と垂直方向に配列し、SMA 発現を認めた。さらに SMA 発現を抑制する Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) 受容体阻害剤である AG1296 を *in vitro* で用いて、進展刺激を加える検討を行った。その結果、表皮細胞、真皮線維芽細胞いずれにおいても、配列するものの、SMA の発現は抑えられる形となった(図 2)。PDGFR には と の 2 つが存在するが、この AG1296 はそのいずれもを阻害してしまう。

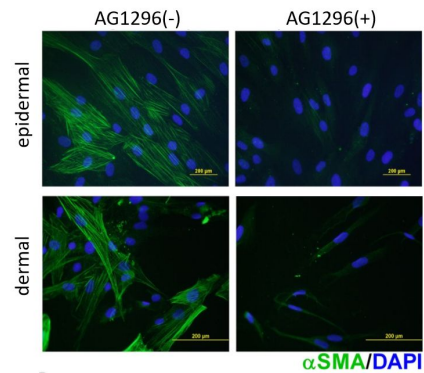


図 2 培養細胞シートに進展刺激を加えたときの反応

そこで、どちらがより関与していることを調べるためにノックアウトマウスを用いて検討することとした。しかしながら PDGFRa ならびに b のノックアウトマウスは致死的であり胎生期あるいは生後早期に死亡することが知られている。そこで PDGFRa *lox/lox* マウスならびに PDGFRb *lox/lox* マウスと Keratin 5-Cre マウスとの交配により表皮細胞特異的に PDGFR 遺伝子を欠損させたマウスを作製して背部の創傷を作成し進展刺激を加えた。結果、PDGFRa 欠損においては SMA の発現が抑えられなかったのに対して、PDGFRb 欠損においては SMA の発現を抑えることができた。同様に創そのものも PDGFRb 欠損においてはほかの二群に比して発赤なども抑えることができた(図 3)。

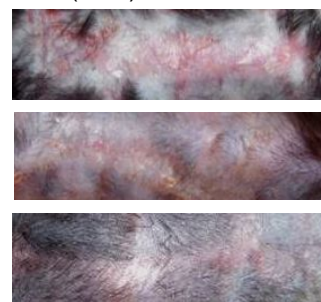


図 3 持続張力負荷後 28 日目の癒痕

(上段: wild, 中段: PDGFRa(-). 下段: PDGFRb(-))

今回の研究は以上であったが、本研究にはいくつか今後の検討課題を要する。

まず上述の如く PDGFR のノックアウトマウスは致死的である。それは PDGF が胎児の成長や血管新生に重要な役割をしているから

である。そのため臨床応用を考慮する場合、どのように皮膚に特異的に作用させていくかという問題点がある。

また網羅的解析の際に一過性に LYVE1 の発現を認めた。LYVE1 はリンパ管のマーカーであり、実際組織においてもリンパ管の増生を認めていた。今回はリンパ管新生に関する検討は行っていないが、炎症の“場”においてはリンパ球の浸潤が関連しているため、張力反応とリンパ管新生との関連に関しても検討することが今後の課題と考える。

しかしながら今回の研究の結果、これまで scarless wound healing に関しては真皮線維芽細胞にのみ着目され、表皮細胞は注目されていなかったが、表皮細胞も張力応答反応が存在することが示唆された。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

Ruri Kamogawa. Scar analysis by distraction osteogenesis for craniosynostosis. The 9th annual meeting of Asian Pacific Craniofacial Association, 2016.12.01, Nara Centennial Hall, Nara city, Nara

加茂川留理 . マウス肥厚性癬痕モデルを用いた表皮細胞の抗張力反応の解析 . 第 26 回日本形成外科基礎学術集会 .2016 年 9 月 15 日 . ナレッジキャピタルコンベンションセンター . 大阪

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

該当なし

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

加茂川 留理 ( KAMOGAWA Ruri )

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 70749324

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし