

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20366

研究課題名（和文）線維芽細胞亜種特異的マーカーを用いた胎仔皮膚再生の観察

研究課題名（英文）Observation of fetal cutaneous regeneration using fibroblast subtype markers

研究代表者

鈴木 彩馨（Suzuki, Ayaka）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：80724062

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）：本研究は、当研究室独自に開発したマウス胎仔皮膚創傷モデルの皮膚再生メカニズムが、これまで、形態的・組織学的な観察と、2014年にRyanらが報告した真皮内の線維芽細胞subtypeの細胞表面マーカーの違いというデータを結びつけ、線維芽細胞subtypeの移動の違いという観点から胎仔の皮膚再生を観察するとともに、これらタンパクの皮膚再生能の機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：As Ryan et al reported in 2014, there are different lineage of fibroblasts in murine skin. They reported the incorporation of these different fibroblast subtypes to the adult wound healing and hair regeneration, but the relationship between murine fetal skin regeneration after wounding and these fibroblasts subtypes have never been reported. We originally developed a new method to make wounding as early as embryonic day 13 (E13), and observed a relationship between skin regeneration and these fibroblast subtypes. We found that Lrig 1positive fibroblasts are key players which achieve cutaneous regeneration. But these characters diminished after they were cultured under two dimensional condition.

研究分野：再生医療

キーワード：皮膚 再生 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

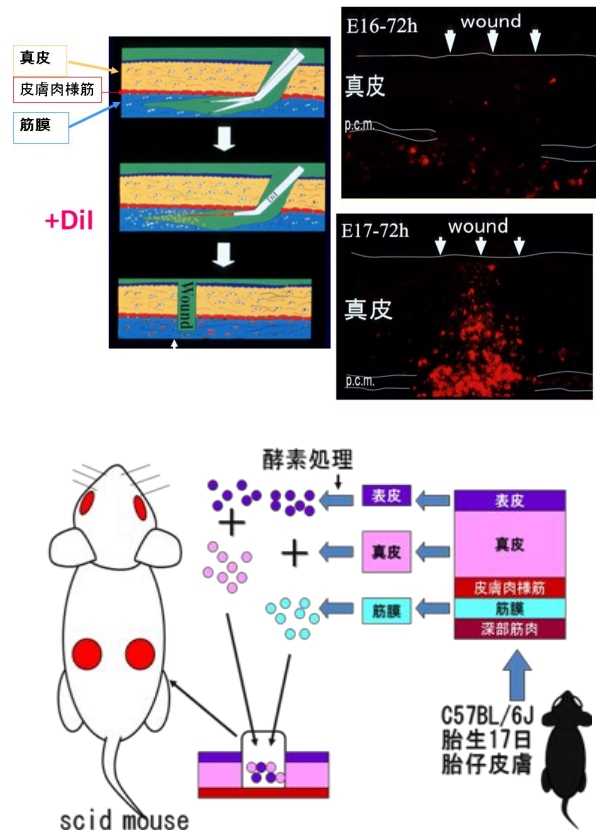
成獣の哺乳類の皮膚は、損傷を受けるとその部位は完全に再生することではなく瘢痕が残る。しかし哺乳類でもある発生段階までの胎仔は、皮膚に損傷を受けても傷跡が残らず完全に皮膚が再生することがわかっている。慶應義塾大学形成外科学教室では、独自に開発した胎仔手術法を基に、皮膚再生の研究を行っている。その中で、創傷部の真皮構造が再生する時期から、瘢痕となって線維化する時期に切り替わるのが、胎生 16 日と胎生 17 日の間であることを発見した。これまでの組織学的観察から、その原因が表皮 - 間葉相互作用の違いであると報告してきた。つまり、皮膚を再生させるのは真皮浅層の線維芽細胞で、瘢痕を形成するのは真皮深層の線維芽細胞であり、これらを別々に表皮細胞と免疫不全マウスへ混合移植することで、完全な皮膚を再生することに成功している (図 1)。



(図 1) 再生させた皮膚

しかし、これまで真皮浅層と深層を分ける特徴的な線維芽細胞の皮膚表面マーカーは不明であったので、その後の詳細な検討は出来なかった。しかし Ryan らは、これら線維芽細胞の場所の違いによる特徴的な皮膚表面マーカーを示した報告を行った (Ryan et al., Nature 504, 277-281, 2013)。これにより線維芽細胞の subtype による解析が可能となったが、胎仔の創傷におけるこれら陽性細胞の動態は不明であった。本研究は、当研究室独自に開発したマウス胎仔皮膚創傷モデルの皮膚再生メカニズムが、これまで、形態的・組織学的な観察と、顕微鏡下で採取した部位別の組織からの線維芽細胞が再生能を有するという証明を、真皮内の線維芽細胞 subtype の細胞表面マーカーの違いというデータを結びつけ、線維芽細胞 subtype の移動の違いという観点から胎仔の皮膚再生を観察するとともに、これらタンパクの皮膚再生能の機能解析を行うという点で独創的である。また、部位により発現に違いがある Blimp1, Dlk1, Lrig1 が、培養を行ってもその性質を維持できるのか、培養を行った後に性質が変わるようであれば、培養培養の条件を変えることにより、その性質を復活させることができるのか否かを、当研究室で行ってきた手法を用いて解析することを目的とした。本研究の多くの部分は、当研究室で永らく行ってきたマウス胎仔皮膚再生の研究と、細胞

凝集塊を形成することで、細胞が未分化性を獲得するという研究で培ってきた細胞培養、細胞移植の研究手法を使って施行した (図 2)。



(図 2) 当研究室で行ってきた、胎仔皮膚再生における線維芽細胞の動態の変化

2. 研究の目的

本研究では、マウス成獣および胎仔の皮膚に創傷を作成して、その治癒過程と B-lymphocyte-induced-maturation protein 1 (Blimp1)、Delta-like homologue 1 (Dlk1)、Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1 (Lrig1) の免疫染色を行い、皮膚の再生や治癒に伴ってこれら陽性細胞が、創傷後にどのように移動するかを観察することを目的とした。また、Blimp1, Dlk1, Lrig1 など、真皮の部位異なった部位に特徴的な発現をするタンパク質が、培養後にどのような変化をするかを調べるとともに、これら陽性細胞が各々毛包誘導能を有するか否かを生体内から抽出し、マウス表皮細胞との免疫不全マウスへの混合移植により毛包誘導能を調べた。

3. 研究の方法

(1) 胎仔創傷の作成

成獣および妊娠 13, 15, 17 日のマウスを用い、全身麻酔下に側胸部に全層切開創を作成する。妊娠マウスは顕微鏡下で胎仔手術を施し子宮を切開し、胎仔を露出しマイクロサージャリー用の鉗刀を用いて、側胸部に創傷を作成する。創傷作成後、成獣は 1, 3, 5, 7,

14 日目に創部皮膚を回収し、胎仔は 24,48,72 時間後に胎仔を採取し、創周辺組織を回収した。

(2)免疫染色

採取した組織を OCT コンパウンドに包埋し、急速凍結後に 7 μ m の凍結切片を作成する。乾燥させた後、アセトンで 10 分間、室温で固定する。一次抗体は P B S で、Blimp1,Lrig1 は 40 倍、Dlk1 は 50 倍に希釈し、切片上に滴下して室温で 1 時間反応させる。その後 PBS で 3 回洗浄し、対応する二次抗体を P B S で 200 倍希釈したものに DAPI を 1000 倍希釈となるよう調整、混和して各染色とし、検体に滴下し、室温で 30 分間反応させた。再び PBS で洗浄後、封入し蛍光顕微鏡で観察する。使用予定の一次抗体・二次抗体の詳細は以下の通りである (Ryan et al.,Nature 504,277-281.2013)。< 一次抗体 > e Bioscience Blimp1(Human/Mouse) Rat 14-5963-80 R & D systems Pref-1/DLK/FA1 Goat AF1144, R & D systems Lrig1 Goat AF3688,< 二次抗体他 > Santa Cruz Anti Rat IgG FITC sc-2011,SIGMA Anti Goat IgG Cy3 C-2821,DAPI Molecular Probes D1306。

(3)2 次元培養による細胞の性質の変化

Blimp1(+),Dlk1(+),Lrig1(+)細胞を FACS で採取し、2 次元培養をおこない、2,5,10 継代後に細胞からタンパクおよび RNA を抽出し、これらマーカーの変化を免疫染色、Western blot と real time PCR で観察した。次に Blimp1,Dlk1,Lrig1 陽性細胞が、培養下ではどのような変化を示すかを、MACS を用いて、それぞれ陽性の細胞を回収・培養し、継代とともに、これらのタンパク発現の変化を Western blot 法で解析し、培養を行ってもこれらのタンパク発現が維持できるか否かを観察した。さらに、非接着培養皿の培養により、細胞凝集塊を形成することで、タンパク発現が変化するか否かを観察した。

(4)Blimp1(+),Dlk1(+),Lrig1(+)細胞の毛包誘導能の観察

成獣並びに胎生 17 日のマウス胎仔の皮膚、を採取し、コラゲナーゼで消化した後に、MACS で Blimp1(+),Dlk1(+),Lrig1(+)細胞をそれぞれ回収した。新生仔 C57BL マウスから表皮細胞を酵素処理で回収し、これら MACS で回収した細胞と、各々混合し、免疫不全マウス皮膚全層創に混合移植し、毛包誘導能を有しているか否かを確認した。これまでの予備実験で、顕微鏡下に採取した真皮浅層の線維芽細胞と、表皮細胞との混合培養では、単一細胞に分解した後も 100% の確率で完全な皮膚が再生されている。

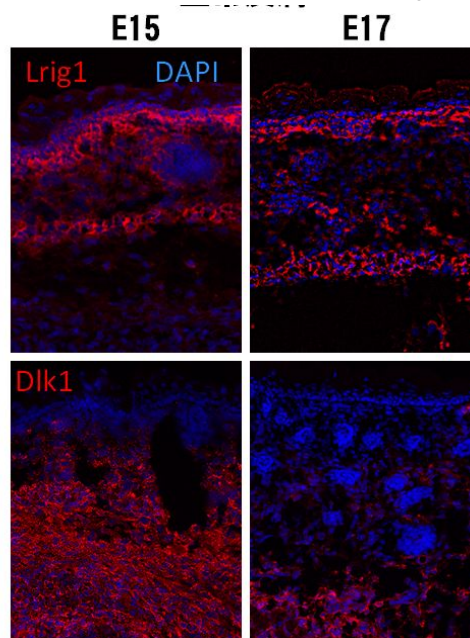
4 . 研究成果

(1)胎仔創傷の作成

マウスの胎仔手術を行い、創傷を作成し、さまざまな時間の後に組織を回収することができた。それぞれの組織は OCT コンパウンドで包埋し、凍結切片を作成した。

(2)免疫染色

Ryan らの報告に準じて胎仔組織の免疫染色を行ったところ、記載の通り胎生 15 日、17 日の表皮直下の細胞は Lrig1(+) Dlk1(-)で、深層の細胞は Lrig1(-) Dlk1(+)であった。Blimp1 に関しては、同様の結果は得られなかった。このため、以下の研究では Lrig1 と Dlk1 を指標として、検討を行った (図 3)。



(図 3)正常胎生 15 日と 17 日のマウス胎仔における Lrig1 と Dlk1 の発現

また、真皮が完全に再生する胎生 15 日目のマウス胎仔の創傷作成後 48 時間の観察では、創傷を作成した部分は、Lrig1(+) Dlk1(-)の細胞で占められていたが、瘢痕を残す胎生 17 日の創傷部では創傷部位は Lrig1(-) Dlk1(+)の真皮深部由来の線維芽細胞で占められていた。このことから、形態的には真皮の再生と毛包誘導は Lrig1(+) Dlk1(-)細胞によって成されているものと考えられた。

(3)2 次元培養による細胞の性質の変化初代培養では、表皮直下の線維芽細胞と深部の線維芽細胞は in vivo の観察と同様に戦争由来の線維芽細胞は Lrig1(+) Dlk1(-)で、深層の細胞は Lrig1(-) Dlk1(+)であった。しかし、継代を行うとともに Lrig1、Dlk1 の発現は減少し近似したタンパク発現となった。これらの変化は、非接着性培養皿で培養を行っても回復させることは出来なかった。

(4)Lrig1(+), Dlk1(-)細胞の毛包誘導能の観察上記の結果から、表皮直下の線維芽細胞の特

徴としては Lrig1(+)Dlk1(-)で、真皮深層の細胞は Lrig1(-)Dlk1(+)であったので、毛包誘導能は Lrig1(-)Dlk1(+)の細胞が有していると考えられた。ただ、培養を行うとこの性質は消失することから、新鮮なマウス胎生 17 日目の真皮から、酵素処理で単一の細胞に浮遊させ、MACS を用いて、Lrig1(+)Dlk1(-)細胞と、Lrig1(-)Dlk1(+)細胞とに分離を行い、表皮細胞と共に免疫不全マウス皮膚欠損創に移植を行ったところ、Lrig1(+)Dlk1(-)細胞のみに毛包誘導能が観察された。一方で、表皮細胞と Lrig1(-)Dlk1(+)細胞の混合移植群では、毛包誘導は認められなかった。

(3)連携研究者
なし
(4)研究協力者
なし

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 0 件)

〔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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 彩馨 (SUZUKI, Ayaka)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教
研究者番号: 80724062

(2)研究分担者

なし