

令和 元 年 6 月 18 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20373

研究課題名（和文）周期的伸展刺激による瘢痕形成動物モデルの構築と装置の実用デバイス化

研究課題名（英文）establishing an animal scar formation model with cyclic stretch stimulation, and practical device

研究代表者

今村 三希子 (Imamura, Mikiko)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：50590527

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,400,000 円

研究成果の概要（和文）：周期的伸展刺激によりマウスに瘢痕形成を引き起こすモデルを成立させた。市販の材料を工夫し、比較的安価・簡便に装置の作成が可能である。刺激付加後のマウスの皮膚は、肉眼上での上皮組織の肥厚・ケロイド形成は見られなかったが、組織標本上、弾性線維の増加や瘢痕幅の増加から、瘢痕形成傾向が生じると判定した。

周期的伸展刺激はモーターと強力磁石によって与えていたが、動力を電磁石化することで付加刺激の電気的な制御や装置の静音化・小型化を達成し、実用デバイス化することを最終目標の一つとしていたが、開発上に問題が生じ、実現できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床現場の実際においては、周期的伸展刺激が加わる関節部等に瘢痕形成が好発する症例が多くみられるが、瘢痕形成の起きやすい条件をin vivoで再現できた点が有意義と考える。尚且つ当モデルでは、マウスの動作を制限させることなく、数週間単位で創部への周期的刺激付加が可能であり、これまでに発表されている動物モデルと比較して優れている点と言える。また、研究当初の目標では、周期的伸展刺激による瘢痕形成機序へのケラチノサイト由来（エンドセリン1）ET1の関与を明らかにすることを挙げていたが、組織標本上では有意な結果をみとめなかった。

研究成果の概要（英文）：We establish an animal model which cause scars to form with cyclic stretch stimulation. This system can be made by commercially available kit, such as motors, magnets, plastic plate and so on. With this “in vivo” model, we confirmed scar formation after 3 weeks cyclic stretch stimulation on mouse skin.

We have planned to reveal a relationship between cyclic stretch stimulation and endothelin-1 in the process of scar formation, but we cannot have achieved yet.

研究分野：形成外科

キーワード：動物モデル 瘢痕形成 周期的伸展刺激 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域では患者の QOL に大きな影響を及ぼす瘢痕形成の機序や治療法について、さまざまな研究が試みられていた。当初、機械力（mechanical force）の中でも張力が瘢痕形成に及ぼす影響が注目され、張力の刺激による、瘢痕形成下での細胞内外で引き起こされる変化について検討がなされていた。過去 in vivo でモデルは実現が難しく、Aarabi S らによる創外固定器を利用したモデル（Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *Faseb J* 2007 Oct;21(12):3250-61）や、Chin MS らによるサーボ制御装置を利用した周期的伸展刺激を付加するモデル（Analysis of neuropeptides in stretched skin. *PRS* 2009 Jul;124(1):102-13）が知られていたが、前者は“周期的”な伸展刺激を付加するモデルではなく、後者は装置そのものが大がかりで高価であり、マウスを装置と連結させておかななくてはならないため、24~72 時間の装用が限度であり、数週間単位での研究は困難であった。マウスの活動を損ねることなく、生理的な瘢痕形成過程に近似した伸展刺激を周期的に付加するモデルがあれば、より理想的であると考えられた。

また、周期的伸展刺激による瘢痕形成という機序には以下のような実験的背景がある。研究者所属施設では過去の in vitro 研究において「ケラチノサイトから分泌されるエンドセリン 1（ET1）が創収縮に影響を及ぼす」、「ケラチノサイトへの周期的伸展刺激が、ET1 の分泌を促進させる」という結果を得ており（Kurita M, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 May 27;409(1):103-7）、ケラチノサイトと線維芽細胞の相互作用（上皮-間葉相互作用）を介した物理的刺激による瘢痕形成の促進機序に着目した。

2. 研究の目的

(1) 創部に周期的な伸展刺激を与え、瘢痕形成を促進させる動物モデルの確立と実用デバイス化

研究者は過去の研究でモデルのプロトタイプを既に作成（3.研究の方法に後述）していた。使用するマウスの種類や瘢痕形成を引き起こす実験プロトコルについては未確定であり、本研究内でのモデル確立化を第一目標とした。加えて、周期的伸展刺激はモーターと永久磁石によって付加するシステムを採用していたが、動力を電磁石に変えることが可能か、刺激の電気制御や装置の静音化・小型化は可能かを検討し、より accessible なモデル、実用デバイス化（商品化）が可能なモデルについても模索することを目的とした。

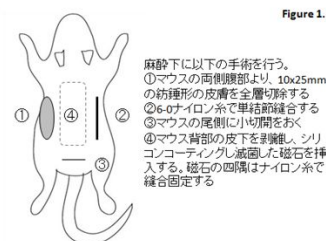
(2) 瘢痕形成の過程におけるケラチノサイト由来 ET1 の寄与についての検証

周期的伸展刺激による瘢痕形成の背景には、ケラチノサイト由来 ET1 の瘢痕形成における関与性を示唆する実験結果があり、in vivo でも周期的伸展刺激による ET1 分泌が起こるのか、ケラチノサイト由来 ET1 が引き起こす上皮間葉相互作用が、瘢痕形成機序に関わっているのかを明らかにすることを、過去研究から引き続いての目的とした。ET1 が瘢痕形成に大きく関与することが明らかになれば、すでに臨床使用されている肺高血圧症治療薬、エンドセリン受容体拮抗薬（一般名：ボセンタン、商品名：トラクリア）の瘢痕形成抑制作用が期待できた。

3. 研究の方法

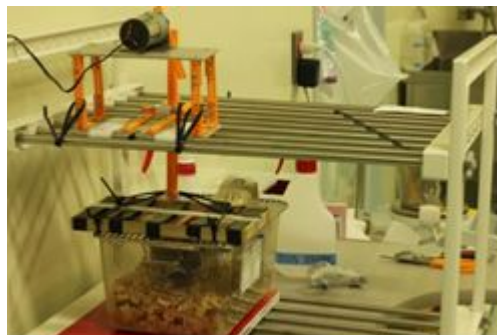
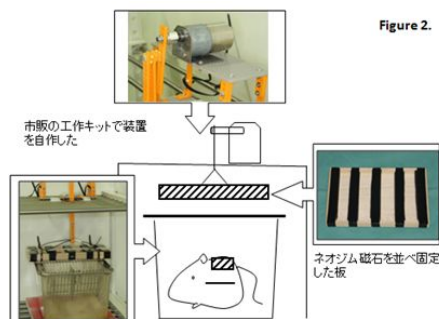
(1) モデル動物

7-8 週齢、雄の b6 マウスを使用し、Figure 1 の通りに手術創のモデルを作成した。麻酔はドミトール、ミダゾラム、ベトルファールの 3 剤混合薬を腹腔内に投与し、実験動物の鎮静と疼痛管理を行った。



(2) 周期的伸展刺激装置

創部に周期的な伸展刺激を加える手法として、動物内に埋め込んだネオジウム磁石を、体外に設置した磁石で牽引する装置【Figure 2. 右側が全体像】を作成した。装置の骨格には市場で簡単に入手できる、機械工作のパーツを利用した。一般的な動物飼育室で使用されるケージ内にマウスを飼育し、ケージ外に装置を設置することで、マウスの活動性を損なうことなく、マウスの創部に周期的な伸展刺激を 3 週間連続して付加することが可能であった。2016 年度より装置を増設し複数列で実験可能となった。



(3)実験プロトコル

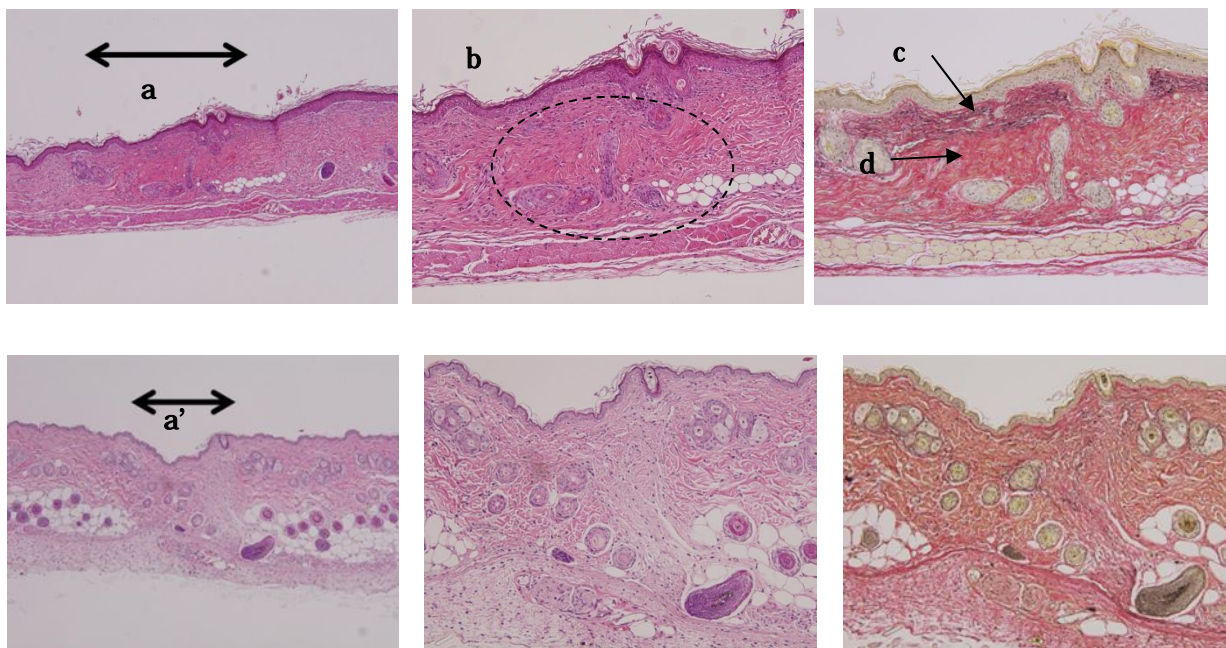
手術から 4 日目に抜糸し、創部の癒合を確認した上で実験開始した。3 週間連続して周期的伸展刺激を創部に付加した。伸展刺激の周期はおよそ 20 回/分、強さは 0.2N であった。刺激付加終了後、創部を含めた皮膚を採取し、組織学的な評価（ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・ワンギーソン染色、各種免疫染色）を行った。

4．研究成果

(1)周期的伸展刺激付加により瘢痕形成傾向をみとめた

マウスに作成した創部は、周期的伸展刺激を付加した実験群と対照群で外表の所見に明らかな差異はみとめなかった。しかし、組織標本において下記の結果を得た。

上段：実験群（左から、HE 染色 100 倍/HE 染色 200 倍/EV 染色 200 倍）下段：コントロール群（同左）



実験群で瘢痕組織の幅の増加【矢印 a/a'】、弾性線維・膠原線維の増加【矢印 c.d.】が見られた。

膠原線維が渦巻状になり、肥厚性瘢痕・ケロイドに近い病態を呈した。【点線囲み b.】

一方、本実験プロトコルで採取した組織標本の一部において、のように表皮直下（＝真皮浅層）における、ET1 分泌亢進を示唆するような所見がみられ、周期的伸展刺激と ET1 の関連性を解明する手がかりとして大いに期待をした。しかし、実験を反復するにつれ、実験群と対照群の組織間における差異が明らかでなくなり、組織採取や標本の評価方法の正確性を見直したものの、組織内での ET1 分泌亢進は断言しがたい状況となった。

(2)周期的伸展刺激付加装置を増設した

周期的伸展刺激付加装置は市販の材料で作成可能なものの、強力なマグネシウム磁石の取り扱いや装置を長期間持続動作させるための調整に若干の工夫が必要となる。研究者の試行錯誤により、装置を増設し、複数列での実験が可能になった。

一方で、3-(2)に掲示した写真の通り、装置は飼育ケージの外周に柵を作成し、その上に設置することが必要となるため、通常の動物飼育施設で用いられている飼育ケージ柵を使用したままでは実験が施行できない。装置の設置スペースを要するとともに、動力に使用したモーターとアームの動作音が幾分耳障りであった。本研究内の目的で、動力を電磁石に変更することによる、装置の電気制御・小型化・静音化を挙げており、ケージの天地をソレノイドコイルで挟んで磁場を発生させるモデルを作成したものの、ケージサイズのコイルでは創部を安定的に牽引できる磁力を発生させられず、また、研究者の電氣的知識の不足から、本研究期間内では十分な成果を得ることができなかった。しかし、装置自体の開発意義は十分にあると考えており、今後も当施設における動物研究に応用していきたいと思っている。

5．主な発表論文等

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。