

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10007

研究課題名（和文）機能的真皮の基礎となるコラーゲンの幾何学構造と変形機構の解明

研究課題名（英文）Geometric organization of collagen fibers in human dermis and deformation mechanism of the fibers underlying pliability of the skin

研究代表者

齊藤 晋（Saito, Susumu）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00450239

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：真皮はゼリー状の基質と線維から構成される。線維成分は主にコラーゲン線維と弾性線維であり、コラーゲン線維は皮膚に強さを、弾性線維は皮膚に伸び縮みを与えている。これまで研究代表者は真皮を全方向に伸展する方法と組織を透明化する方法で真皮を処理し多光子顕微鏡で観察することにより、コラーゲン線維と弾性線維の三次元的構造を可視化した。本研究プロジェクトでは、これまで開発した研究手法を用いてヒト真皮の変形を可視化することに成功した。ヒト真皮に一方と全方向に伸展ストレスを与え、得られた画像データから各層の線維配向を解析し、組織全体の線維配向の変化を可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体がスムーズに動くためには、皮膚がしなやかに伸び縮みしなければならない。この伸び縮みは真皮のコラーゲン線維や弾性線維が関与している。この健全な柔軟性は疾患や外傷で失われる。例えば、エーラス・ダンロス症候群では皮膚に異常な弾性が生じる。外傷後や熱傷後に癬痕ケロイドが生じれば、皮膚は伸びなくなり、外傷に対して脆弱となる。人工真皮を用いて再生した皮膚は弾性が乏しく、健全な皮膚が再生できたとは言えない。つまり、真皮の伸展機構を明らかにすることは、疾病学、創傷治癒学、再生医学において極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：The dermis is composed of a jelly-like matrix and fibres. The fiber components are mainly collagen fibers and elastic fibers. Collagen fibers give strength to the skin, and elastic fibers give the skin elasticity. So far, the principal investigator has visualized the three-dimensional structure of collagen fibers and elastic fibers by treating the dermis with a method of stretching the dermis in all directions and a method of making the tissue transparent and observing it with multiphoton microscopy. In this research project, we succeeded in visualizing the deformation of human dermis using the method developed. We applied stretching stress in one direction and all directions to the human dermis. Fiber orientation was analyzed for all the layers using a series of images. We succeeded in visualizing the change in 3D fiber orientation of the dermis.

研究分野：イメージング

キーワード：イメージング コラーゲン 弾性線維 皮膚 ヒト 三次元

1. 研究開始当初の背景

真皮の細胞外マトリックスは水様の基質と線維成分から構成され、線維成分は主にコラーゲン線維と弾性線維である。真皮は非常に強靱かつ弾性に富む組織である一方、創傷治療により生じる癒痕は脆く弾性に乏しい。健全な皮膚のような強靱さと弾性を備える皮膚再生は挑戦的課題であるが、そもそも真皮の強靱さと弾性のメカニズムについては解明されていなかった。例えば、皮膚は方向によって伸びやすさが異なり、それはコラーゲン線維網の幾何学的構造に由来すると憶測されてきたが、真皮のコラーゲン線維の幾何学的構造とその変化を三次元に解析する手法が無かった。また、弾性線維は真皮の弾性に関与していると考えられているが、弾性線維とコラーゲン線維の構造的関係は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト真皮のコラーゲン線維および弾性線維の構造および構造変化を真皮全層にわたって定量的に解析する手法を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 等二軸伸展法と組織透明化法、多光子イメージングを用いたヒト真皮網状層の線維配向解析

本研究は当施設の倫理委員会の承認を得た。被験者すべてから文書のインフォームドコンセントを得た。遊離皮弁を用いた再建手術において皮弁をトリミングする時に余剰となった皮膚が採取された。2軸伸展と組織透明化による処理を行うためのドナー部位はすべて大腿上外側で、外傷の既往や皮膚疾患を認めなかった。パジェット型デルマトームを用いて採取したヒト皮膚サンプルを約 800 μm の厚さでスライスして皮下脂肪層を除去し、皮膚の表皮層と真皮層のみを含むシートを作成した。

In-plane で 2 軸伸展を与える伸展機器をカスタムメイドした。伸展により真皮内の線維の分布的な関係が温存されるかを検証するため、同じ設計の伸展器を多光子顕微鏡に設置し、新鮮真皮シートをコラーゲン線維が直線的な形態になるまで伸展を加えた。伸展により線維網が相似形に拡大しているかを検証するため、弾性線維の座標値を求め、それらの主成分ベクトルを求めた。伸展前の主成分ベクトルと伸展後の主成分ベクトルの類似性を、コサイン類似度を用いて評価した。

800 μm の厚さの皮膚全層サンプルから 12mm 幅の正方形の切片を得た。2 軸伸展器で組織を全ての方向に約 1.25 倍に伸展した後、伸展状態のまま 4%パラホルムアルデヒド 24 時間浸漬固定した。顕微鏡観察におけるレーザー光の透過性を最大限にするため、組織透明化法 (CUBIC) を用いた。組織透明化処理を施した検体のうち、中央部を直径 2.5 mm の正円デルモパンチでくりぬいて顕微鏡観察を行った。走査型多光子レーザー顕微鏡 (FV1000-MPE2、オリンパス、東京、日本) を用いて、コラーゲン線維は第 2 高調波発生 (SHG) を用いて 420-460 nm フィルターを介して検出し、弾性線維は自家蛍光 (TPAF) を用いて 495-540 nm フィルターを介して検出した。2 μm 厚の z 間隔で皮膚表皮から 500 μm の深さまでスキャンし、積層画像を得た。隣接する 3 \times 3、合計 9 撮像領域 (633 \times 633 μm) に対してスキャンを行った。

2 次元画像フーリエ変換法を用いて線維の方向の同定を行った。フーリエ変換の処理は 211 \times 211 μm の正方形の画像に対して適応した。Z 方向 (浅深方向) の 251 スライスに対して処理を行い、それを 9 つの正方形領域すべてに行った。8bit、512 ピクセル \times 512 ピクセル、211 \times 211 μm の画像をフーリエ変換し、パワースペクトル画像を得る。パワースペクトル画像から各方向の振幅平均を計算し、極座標化する。プロットを楕円近似し、その楕円長軸を配向角と定義し、長軸/短軸比を配向強度と定義した。Z スタック画像においてコラーゲン線維束が撮像範囲に出現すると配向強度が増加し、線維束が消えると配向強度が減少する。この特徴から、Z 深度と配向強度のプロットを 1 次微分しピークを検索した。配向強度 1.1 未満のピークは重要でないピークとして除外した。局所におけるコラーゲン線維束と弾性線維の方向の関係を評価するため、SHG 画像の配向強度のピークに一致するレベルで

の TPAF 画像の配向角を求めた。同定されたピークの配向角についてヒストグラムを作成した。ヒストグラムに対してガウシアンモデルフィッティングを行った。2つ以上の Mode が存在した場合、最高ピーク値のものを Mode1 とし、その次に大きいピーク値のものを Mode 2 と定義した。分布の方向の違いを評価するため Mode1 と Mode 2 の角度差を求めた。

(2) 一軸伸展法と等二軸伸展法での構造変化の違いに関する定量的解析手法の確立
ヒト真皮に無伸展、および一軸伸展と等二軸伸展を与え、同様の固定および透明化法で処理を行い、多光子顕微鏡によるコラーゲン線維描出を行った。深さ方向に 1 μ m 間隔で 200 μ m の深さまで連続画像を取得し、全ての画像に対して高速フーリエ変換およびカーブレット変換法にて定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト真皮網状層の線維配向解析

フーリエ変換を用いた線維配向解析を行い、最も配向強度の高い配向角を抽出し、合計 9 か所でヒストグラムを作成した。網状層浅層で 2 または 3 つの分布を、深層で 1 または 2 つの分布を認め、主たる分布については両層間で方向に類似性を認めた。また、局所的なコラーゲン線維と弾性線維の角度差を評価したところ、浅層で線維の 94% が、深層で線維の 85% が角度差 15 度未満であった。コラーゲン線維と弾性線維が同じ方向に分布することが示された。

(2) 一軸伸展法と等二軸伸展法での構造変化の違いに関する定量的解析手法の確立

無伸展と等二軸伸展では主に 2 方向の配向を示した。一方、一軸伸展法では伸展度を 1.3、1.5 と増加させると、2 つの配向する線維のうち伸展を加えた方向の配向が強くなり、もう一方の配向は減少した。側面からの観察では、伸展により表皮に並行な方向への配向が強くなり、表皮に垂直な方向の配向が減少した。

以上の結果から、本研究ではヒト真皮を等二軸伸展法と組織透明化法、多光子イメージングを用いて観察する手法を確立し、ヒト真皮網状層のコラーゲン線維と弾性線維が 2 軸配向すること、それらが同じ方向に分布することを始めて明らかにした。また一方向に伸展することによって、より伸展方向に配向する変化を可視化する方法を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S. Saito, I Tsuge, H Yamanaka, N Morimoto.	4. 巻 46
2. 論文標題 Soft tissue abnormalities in Wassel Type VI radial polydactyly: a detailed anatomical study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hand Surgery (European Volume)	6. 最初と最後の頁 352-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1753193421990212.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Saito, N Morimoto.	4. 巻 -
2. 論文標題 Interphalangeal joint deviation in floating-type radial polydactyly with malalignment of the flexor pollicis longus tendon: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hand Surgery (European Volume)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1753193420982209.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maho Ueda, Susumu Saito, Teruasa Murata, Tomoko Hirano, Ryoma Bise, Kenji Kabashima, Shigehiko Suzuki	4. 巻 23:9(1)
2. 論文標題 Combined multiphoton imaging and biaxial tissue extension for quantitative analysis of geometric fiber organization in human reticular dermis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47213-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齊藤晋, マリアキアラムニツソ, 津下到, 森本尚樹
2. 発表標題 弾性線維の弾性を可視化する多光子イメージング手法の確立
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 齊藤晋
2. 発表標題 三次元/ダイナミックイメージングの基本と手外科研究への応用
3. 学会等名 第7回手の造形手術研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 齊藤晋, 津下到, 山中浩気, 森本尚樹
2. 発表標題 生体イメージング新時代：光超音波による微小血管の三次元構造と生体内挙動の可視化
3. 学会等名 第64回日本手外科学会学術集会 ランチョンセミナー9 『光超音波イメージング技術を用いた 微細な脈管構造描出と臨床応用』
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Susumu Saito, Maho Ueda, Itaru Tsuge, Naoki, Morimoto
2. 発表標題 Dynamic Multi-Photon Imaging Shows Differences in Collagen Fiber Deformability Between Human skin and Keloids
3. 学会等名 The 2nd Congress of The Asian Pacific Society for Scar Medicine with The 14th Japan Scar Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤 晋
2. 発表標題 二軸伸展法を用いた緻密交織線維性結合組織の構造解析
3. 学会等名 第4回エラスチン・関連分子研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------