

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09867

研究課題名（和文）皮膚創傷治癒における基底膜コラーゲンの機能解析と治療応用のための基盤的研究

研究課題名（英文）Functional analysis of basement membrane collagen in skin wound healing and basic research for therapeutic application

研究代表者

米澤 朋子（Yonezawa, Tomoko）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：30304299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに皮膚創傷治癒過程において、XVIII型コラーゲンは再生上皮下に早期に出現することが明らかとなった。本研究ではXVIII型コラーゲンのノックアウトマウスを用いて創傷治癒過程の経時的な変化について解析を行い、野生型とは異なる表現型であることを見出した。さらに組織学的な解析を行い、XVIII型コラーゲンの創傷治癒における重要性が示唆された。その分子メカニズムについては予備的な知見は得られたが、さらに詳細な検討が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚は人体最大の臓器であり、外界からの最初のバリアである。皮膚の障害は熱傷、外傷、褥瘡、糖尿病性潰瘍など多岐に渡る。皮膚の創傷治癒において、細胞外マトリックスの関与は大きいとされている。再上皮化における基底膜の再形成や、創収縮における結合組織成分の働きに関する新しい知見は、難治性の治癒を促進するような効果的な治療の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our previous studies have shown that type XVIII collagen appears in the regenerative epithelium during the early phase of skin wound healing. In this study, we analyzed temporal changes in the wound healing process using type XVIII collagen knockout mouse and found that the phenotype of knockout mice was different from that of the wild type. Further histological analysis suggested the importance of type XVIII collagen in skin wound healing. Finally, preliminary findings on molecular mechanisms have been obtained, but more detailed studies are needed.

研究分野：分子生物学

キーワード：皮膚 創傷治癒 細胞外マトリックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は人体最大の臓器であり、外界からの最初のバリアである。皮膚の障害は熱傷、外傷、褥瘡、糖尿病性潰瘍など多岐に渡る。皮膚の創傷治癒において、細胞外マトリックスの関与は大きいとされている。再上皮化における基底膜の再形成や、創収縮における結合組織の構成分子の働きに関する新しい知見は、難治性の治癒を促進するような効果的な治療の開発に役立つと考えられる。これまでに我々はマウス皮膚創傷治癒モデルを用いて基底膜の形成と XVIII 型コラーゲンの発現について明らかにしてきた。

2. 研究の目的

皮膚創傷治癒過程における XVIII 型コラーゲンの役割とその分子メカニズムを明らかにし、創傷治癒に異常がみられるような難治性疾患に対する効果的な治療戦略を見出すための基礎的データを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚創傷治癒モデルの作製

8 週齢の XVIII 型コラーゲンノックアウトマウス及び野生型マウスを用いた。Galiano RD らの方法 (Wound Repair Regen, Jul-Aug, 2004;12(4):485-492) を参考にして改良を加え、皮膚創傷治癒モデルを作製した。麻酔下で背部を除毛し、シリコン製のハの字型のスプリントを固定、縫合した。その後、スプリントの中央に、皮膚生検パンチを用いて皮膚全層欠損を作製した。ドレッシングフィルムを巻き、創部を保護した。マウスの処置や管理は「岡山大学実験動物指針」「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、岡山大学動物実験委員会の承認を受け、適切に行った。

(2) マウス皮膚創傷治癒モデルを用いた表現型解析

創傷後 27 日間、創傷治癒の経過を肉眼観察し、カメラで撮影した画像を用いて創の面積を計測し、創収縮の経時的変化について定量を行った。また、3 日間ごとに組織を採取し、パラフィン包埋組織および凍結包埋組織を作製した。創中央部を含むパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソントリクロム染色などの組織染色を行った。また、同様にパラフィン切片や凍結切片を作製し、免疫組織染色を行った。

(3) マウス皮膚表皮細胞の初代培養と *in vitro* 解析

生後 0 日のマウス皮膚を採取し、ディスパーゼ処理して、表皮を分離した。トリプシン処理後、細胞塊や結合組織様の不純物をフィルターろ過で除去し、常法に従い、培養皿に播種して、表皮細胞を得た。サイトケラチン 14 に対する抗体を用いて採取した表皮細胞の純度を確認後、*in vitro* 解析に用いた。細胞の migration 活性を調べるために、以下のようにスクラッチアッセイを行った。即ち、細胞をコンフルエントになるよう 24well プレートに播種し、イエローチップを用いて細胞を直線状に削り、細胞の移動を経時的に位相差画像を取得して定量解析を行った。

(4) リコンビナントタンパク質作製

細胞や動物モデルに対して XVIII 型コラーゲンの作用を解析するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 由来の cDNA ライブラリーからヒト全長 XVIII 型コラーゲンをコードする DNA を PCR によって得て、タンパク質発現ベクターにクローニングし、HEK293 細胞に導入して安定発現細胞株を作製し、リコンビナントタンパク質の発現と精製を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウスを用いた皮膚創傷治癒における表現型解析

XVIII 型コラーゲンノックアウトマウスと野生型マウスの皮膚創傷治癒モデルを作製し、その治癒過程を経時的に肉眼観察して定量的な表現型解析を行ったところ、創収縮の進行に両マウス間で有意な差が検出された。次に、創中央部を含むパラフィン切片の HE 染色像を観察し、再成した上皮の長さの経時的な変化についても定量解析を行ったところ、両マウス間で有意な差が検出された。皮膚創傷治癒において XVIII 型コラーゲンが何らかの重要な役割を持つと考えられた。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた皮膚創傷治癒における組織学的解析

上記結果を踏まえ、両マウス間での違いを組織学的に検討した。肉芽形成と血管新生に関しては、抗 ACTA2 抗体、抗 CD31 抗体を各々用いて創中央部を含むパラフィン切片に対して免疫組織染色を行い、陽性領域の定量解析を行った。しかし、有意な差は見られなかった。マッソントリクロム染色を行い、コラーゲン線維と再形成された間質の面積を定量したところ、両マウス間で有意な差が検出され、創収縮の経時的変化から予想された結果となった。XVIII 型コラーゲンは創収縮に何らかのメカニズムで影響を及ぼすと分かったが、メカニズムの解明にはさらに詳細な検討が必要であった。

(3) マウス皮膚表皮初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析

再上皮化における XVIII 型コラーゲンの機能を解析するため、両ジェノタイプのマウスから採取した皮膚表皮細胞を培養して、スクラッチアッセイを行った。スクラッチ後の経時的な変化を解析したが、大きな差は認められなかった。マウス皮膚創傷治癒モデルでは再上皮化に有意な差が認められたため、培養系での解析を行うには異なる実験条件での解析を検討する必要があると考えられた。

(4) リコンビナントタンパク質作製

マウスを用いた解析から皮膚創傷治癒における XVIII 型コラーゲンの重要性が示唆されたので、ヒト XVIII 型コラーゲンの全長のリコンビナントタンパク質を作製した。細胞や動物モデルを用いた XVIII 型コラーゲンの生理活性について解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米澤朋子、前川明日華、前場崇宏、百田龍輔、渋谷千晶、岩田宗一郎、大野充昭、大橋俊孝
2. 発表標題 XVIII型コラーゲン欠損マウスにおける皮膚創傷治癒の解析
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米澤朋子、前場崇宏、Tang Shaoying、大野充昭、百田龍輔、稲川喜一、大橋俊孝
2. 発表標題 マウス皮膚創傷モデルにおけるXVIII型コラーゲンの解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学学術研究院医歯薬学域 分子医化学 http://www.okayama-u-mbb.jp/

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
研究 分 担 者	百田 龍輔 (Momota Ryusuke) (80263557)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	稲川 喜一 (Inagawa Kiichi) (90268615)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

	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
研究協力者	前場 崇宏 (Maeba Takahiro)		
研究協力者	(Tang Shaoying)		
研究協力者	前川 明日華 (Maekawa Asuka)		
研究協力者	(Zhang Xiaowen)		
研究協力者	(Bui Hai Dang)		

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

米国	ハーバード大学			
----	---------	--	--	--