

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18445

研究課題名（和文）皮膚血管三次元パターンニングの解析

研究課題名（英文）Analysis of embryonic vascular development in the skin

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） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：創傷治癒の分野においては、治りにくいきずをいかに治すか、またきずをいかにきれいに治すかという大きな課題があるが、そのいずれにも血管新生が密接に関わっていることが知られている。本研究においては、マウス胎子の体幹部皮膚を対象として、血管ネットワークが形成される様子を可視化し、さらにそのメカニズムについて検討することにより、皮膚における血管新生が起こるメカニズムの一端を明らかにすることを目的に研究を行った。ホールマウント染色標本を用いて、側腹部から背部へ血管および神経のネットワーク構造が進展する様子を可視化することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎子皮膚における血管新生の時期と様式の概要について可視化することができた。皮膚創傷治癒や腫瘍の血管新生など、血管が大きく関与する病態における治療のヒントとなる知見が得られたものと考える。

研究成果の概要（英文）：Angiogenesis is a key process in skin wound healing for both refractory ulcers and hypertrophic scars. In the present study, development of vascular and neural network was investigated using mouse fetal skin and subcutaneous tissue whole-mount preparations. Here we have shown for the first time that neurovascular bundles emerge from fetal lateral trunk at embryonic day 11 and spread towards midline until embryonic day 13.

研究分野：形成外科

キーワード：血管新生 創傷治癒 再生

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒の分野においては、治りにくいきずをいかに治すか（難治性潰瘍の治療）またきずをいかにきれいに治すか（quality of wound healing）という大きな課題があるが、そのいずれにも血管新生が密接に関わっていることが知られている。つまり、虚血性潰瘍をはじめとする難治性潰瘍の多くにおいて血管新生の障害が基礎となっていること、また粗大な瘢痕の抑制のためには創傷治癒過程の早期から機能的な血管ネットワークが形成されることがポイントとなることが知られている。トラフェルミン（フィブラスト®）による上皮化の促進、瘢痕の抑制効果はそれを具現化した一例であると言える。そのため、創傷治癒の最適化をさらに進めるべく多方面から研究が進められているが、依然として治療困難な潰瘍症例、病勢の制御が困難なケロイドや肥厚性瘢痕の症例は数多く存在する。近年の血管生物学の発展により血管新生のメカニズムについて続々と新たな知見が得られているものの、まだ不明な点も多い。創傷治癒過程における血管新生のより詳細なメカニズムの一端が解明できれば、創傷治療の新たな戦略開発が可能になると考えられる。

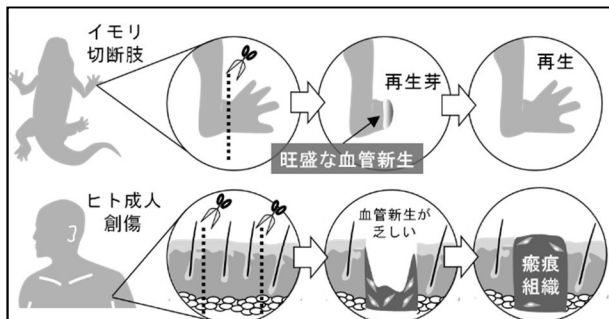


図1. 再生と瘢痕形成

イモリの切断肢は旺盛な血管新生により、元通りの形に再生するが、ヒト成人の皮膚創傷治癒は血管新生が乏しく、瘢痕組織を伴う。

2. 研究の目的

そこで、本研究においては、マウス胎仔の正常血管・リンパ管の発生を手掛かりとして、皮膚の血管新生に関する新たなメカニズムを探索することを目的とする。申請者らは以前から皮膚の無瘢痕性創傷治癒（scarless wound healing）を目指してマウス胎仔を対象として創傷治癒研究を行ってきた。ヒトやマウスをはじめとして、哺乳類の皮膚は真皮網状層より深層に達する皮膚損傷を受けると再生することではなく、恒久的に瘢痕が残ってしまうこととなるが、胎生期中期以前までであれば皮膚付属器や表皮紋理を含めて全ての構造が再生することが知られている。研究の一環としてマウス胎仔体幹部皮膚のホールマウント染色標本を観察していたところ、胎生期の一時期に血管と神経が側腹部から皮膚へ穿通し、以後背部正中へ向かって血管新生が進み血管網が形成されることを見出した。マウス四肢においては末梢神経が動脈のパターン形成を誘導することが報告されているが、その現象は胎生15日前後のことであり、血管新生そのものというよりは血管のリモデリングの過程にかかわるものと考えられる。体幹部皮膚の発生期における血管新生のメカニズムを研究した報告は渉猟し得た限り存在せず、本研究は非常に独自性の強いものと考えられる。また、ホールマウント免疫染色標本を用いることにより、血管やリンパ管、神経線維の可視化が可能となり、薄切切片では代替できない三次元情報が得られるという利点もある。

3. 研究の方法

(1) 血管・神経・リンパ管のネットワーク構造の可視化

胎生期の血管、リンパ管、末梢神経のネットワークがどのように形成されるかについて、その時期や様式の可視化を目指す。そのために、マウス胎仔の皮膚を切り出してホールマウント染色標本を作成する。

各日齢の胎仔を母体より摘出し、手術用の剪刀で腹部より体腔に達する切開を加えた後、4%PFAで固定（4、overnight）する。その後側腹部から背部まで、顕微鏡視下に皮下組織を剥離し、シート状の皮膚・皮下組織標本作製する。ブロッキング後、0.5%TritonX-100 in PBS溶液中で各1次抗体と反応させる（4、overnight）。洗浄後、各2次抗体と反応させる（室温、2時間）。洗浄後にスライドガラス上に検体を広げ、封入する（ProLong®、ThermoFisher）。共焦点顕微鏡（FV3000、Olympus）で鏡検し記録する。

(2) 血管新生制御因子の時間的・空間的分布の解析

多様な組織において主要な血管新生制御因子としてはたらく VEGF について、胎生期の皮膚・皮下組織における発現を検討する。

胎生11～13日目において、血管ネットワークがまだ形成されていない背部正中部と、すでに血管網が形成された側腹部からそれぞれ RNA を抽出し、遺伝子発現について検討する。

4．研究成果

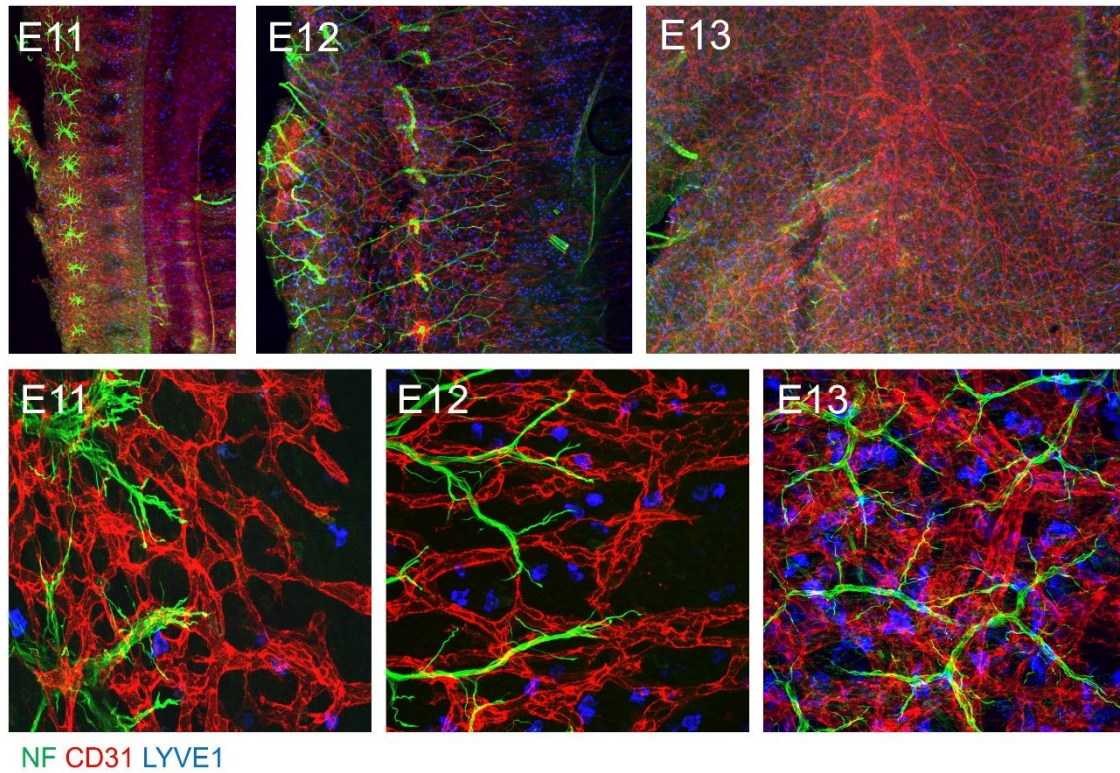


図2．胎児体幹部皮膚における血管・神経ネットワークの形成

(1) 体幹部皮膚における血管・神経ネットワークの形成

胎生 11 日目～13 日目の胎児について体幹部皮膚・皮下組織のホルマウント染色標本を作製し、抗 Neurofilament 抗体で神経線維、抗 CD31 抗体で血管内皮、抗 LYVE1 抗体でリンパ管内皮（およびマクロファージ）の染色を行った。図 2 に示す通り、胎生 11 日目頃に側腹部皮膚を穿通するように血管神経束が出現し、以後、2 日間程度の時間をかけて腹側および背側へ血管および神経線維が進展し、全体としての血管・神経ネットワークが形成されることが分かった。血管と神経との関連については、血管の先進部の方が神経線維よりもやや先立って分布するという特徴が認められたが、その走行については完全に一致していることはなく、それぞれ独立した形成機構を持つことが示唆された。

また、LYVE1 陽性のリンパ管内皮については、この時期には明らかな構造が認められなかった

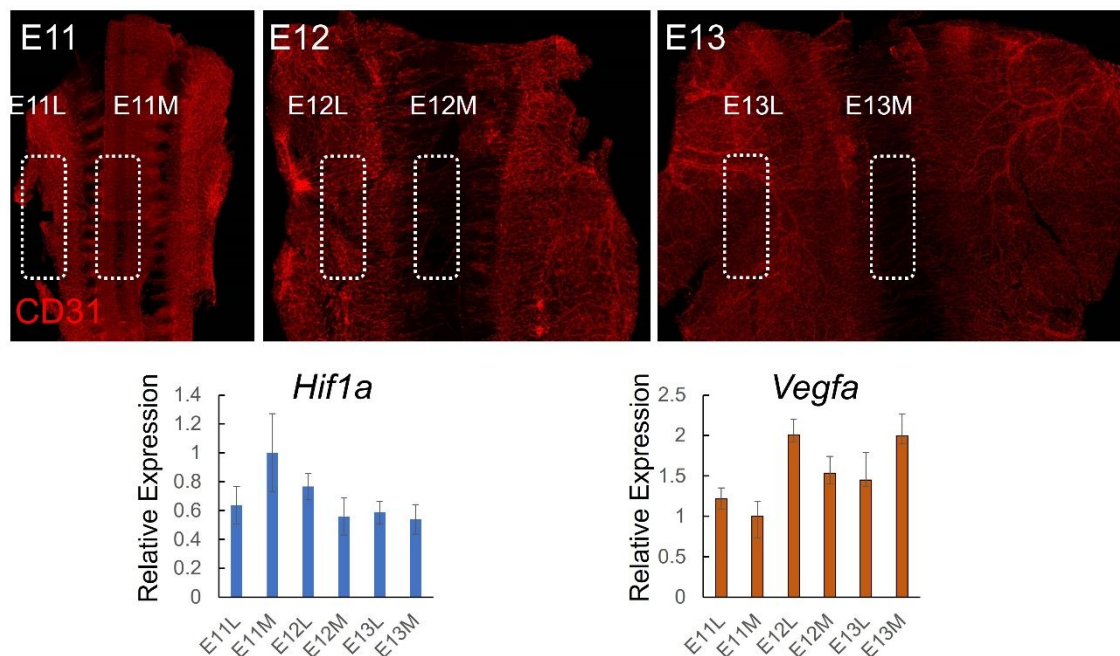


図3．胎児皮膚における VEGF-A の遺伝子発現

が、一方、血管や神経の出現以前から皮膚に在住するマクロファージのうちの一定数の細胞が LYVE1 を発現していることが分かった (図 2)。LYVE1 陽性マクロファージは血管の先端部と空間的に近接し影響を与えている可能性が示唆されたが、その真偽については、マクロファージの除去や遺伝子改変動物を用いたさらなる実験で検討して確かめる必要がある。

胎生 11 日目、12 日目までは、血管や神経線維が背部正中に向かう配向性を持っているのに対して、胎生 13 日目になりフロンティアがなくなると、その配向性が消失し、一様に密な網目状構造を呈するようになることが分かった。

胎子の無瘢痕性創傷治癒を解析する過程においては、胎生 13 日目以前の創部の血管新生は非常に盛んであり、皮膚全層切開創を作成した後にも、創部中心へ向かう血管新生が早期に観察されることが分かっている。一方、胎生 14 日目以降になると、血管新生の速度が著しく低下し、創部中心へ向かう血管は認められなくなる。その現象の背景には、皮膚血管網の発生時期との関連があるものと推測される。つまり、胎生 13 日目までは血管内皮細胞が皮膚の血管を形成する過程にあり、低酸素をはじめとする各種のシグナルへの応答性が高い状態だと考えられ、そのため、血管の消失を伴う創傷が作成されると早期に血管新生が行われるのだと推測することができる。その仮説検証のためには、胎生 13 日目以前の皮膚・皮下組織と、胎生 14 日目以降の組織からそれぞれ血管内皮細胞を分離し、遺伝子発現等について比較する研究が有用であり、今後検討すべきだと考えられた。

(2) VEGF の遺伝子発現の変化について

種々の組織において主要な血管新生因子としてはたらくことが知られている VEGF-A について、胎子皮膚におけるその遺伝子発現をしらべる実験を行った。VEGF-A は、低酸素状態の組織において HIF-1 応答性に発現が上昇することが知られている。胎生 11 日目～13 日目の皮膚・皮下組織のうち、すでに血管網が形成されている外側の組織と、まだ血管網が形成されていない内側の組織からそれぞれ RNA を採取し、qRT-PCR で HIF-1 と VEGF-A の遺伝子発現を検討した。

今回の実験においては、図 3 に示す通り、いずれも有意差を認めなかった。細胞種ごとの遺伝子発現を比較するなど、実験系を洗練して再検討する余地はあるが、VEGF-A 以外の分子により血管の形成が制御されている可能性も高いと考えられた。

本研究を通して、マウス胎子体幹部の皮膚・皮下組織の血管や神経ネットワーク形成過程の概要を知ることができた。この時期の血管内皮細胞の性質をさらに検討することにより、創傷治癒や腫瘍進展など血管新生がカギとなる生体反応における病態解明のヒントが得られる可能性があると考えられた。

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〕

〔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
---------	---------