

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390480

研究課題名（和文） レチノイン酸を主軸とした皮膚創傷治癒機構の解析

研究課題名（英文） Role of retinoic acid in the mechanism of skin wound healing

研究代表者

坂井 靖夫（SAKAI YASUO）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50272315

研究成果の概要（和文）：レチノイン酸（RA）の不活化酵素である Cyp26b1 遺伝子欠損（KO）マウスを用いて、皮膚発生におけるRAの役割を探索した。Cyp26b1-KO表皮には皮膚バリア機能不全がみられた。また、角質の形態異常、顆粒層でのケラトヒアリン顆粒の消失、周皮のマーカーであるKrtap13の発現が増強・持続していた。Cyp26b1-KO皮膚は毛包を欠損するが、胎生期の皮膚をヌードマウスに移植すると毛包が誘導された。妊娠マウスを使用した胎仔手術では、Cyp26b1-KO皮膚で創傷治癒の遅延化が認められた。本研究では、皮膚発生および創傷治癒過程におけるRAの重要性が証明された。

研究成果の概要（英文）：We searched for a role of retinoic acid (RA) in the developmental skin using Cyp26b1 knockout (KO) mice. A skin barrier dysfunction was observed in the Cyp26b1-KO epidermis. We found malformation in the cornified layer and absence of keratohyaline granules in the granular layer. Krtap13, a marker of the periderm, was also up-regulated and last in later stages. Although the Cyp26b1-KO skin lacked hair follicles, skin grafting to a nude mouse could induce hair formation. We performed fetal operation to know the effect of RA on wound healing. In the Cyp26b1-KO skin, a delay of healing was seen compared with the normal one. In this study, we found RA is critical for skin development and wound healing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：レチノイン酸、皮膚発生、毛発生、創傷治癒、CYP26B1

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、外界とのバリアとして生体を保護し、生体内の恒常性を保つ上で重要な臓器で

ある。外界からの様々な刺激に対して絶えず修復機転が動いており、創傷治癒や再生医療を研究する理想的なモデルの一つである。皮

膚は単に上皮系細胞(表皮)と間葉系細胞(真皮)の合体ではなく、上皮-間葉相互作用により多種類の細胞を生み出し、付属器など複雑な器官を構築する。近年、遺伝子改変マウスの導入により、特定の細胞系譜や遺伝子機能の探索が可能となってきた。これにより、毛包の膨大部(バルジ)に存在する毛包幹細胞が、毛に限らず皮膚の修復・再生に大きく関与していることが判明した。

一方、ビタミンAの誘導体であるレチノイン酸(Retinoic Acid; RA)は、細胞の分化、成長、器官形成など様々な局面で重要な役割をしている。皮膚もRAの標的組織の一つであり、尋常性乾癬や重度の膿胞性ざ瘡に劇的な改善をもたらしている。またRAは、胚発生において強力な催奇性物質として知られている。研究代表者はRA不活化酵素であるcytochrome P450-26(CYP26)に注目して、マウス胚を用いた形態形成を研究してきた。CYP26は、3つのファミリー(A1、B1、C1)が存在する。研究代表者は、全てのCyp26ノックアウト(KO)マウスの作製に関与し解析してきた。特にCyp26b1は、研究代表者が遺伝子のクローニングからKOマウス作製まで一貫して行った。

本研究では、モデル動物としてCyp26b1 KOマウスを用いる。Cyp26b1 KOマウスは、四肢、皮膚、口蓋、頭蓋顎顔面、生殖細胞など多岐に渡る臓器に異常が認められた。Cyp26b1 KOの皮膚は、毛包形成不全、表皮・真皮細胞の形態および層構造異常などがみられ、正常に比して顕著な相違がある。皮膚発生において、Cyp26b1は表皮基底層直下と毛包周囲の真皮層に発現しており、体節で合成されるRAが拡散によって表皮層へ到達するのを阻止している。Cyp26b1が欠損すると、皮膚のRA濃度が上昇し、RA標的遺伝子発現のかく乱が生じると推察されている。従来からRAの皮膚機能構築に対する重要性は知られていたが、RAと皮膚発生に関する報告はほとんど無い。

創傷治癒の究極的ゴールは、Scarless Healing(癒痕のない治癒)である。マウスでは、胎生13.5日までの胚はScarless Healingを呈することが知られている。また創傷治癒過程において、しばしば胎生期の現象が観察される。皮膚では、幹細胞を介して胎生期と同様の順で遺伝子発現が生じ、新たに組織が構築されている。創傷治癒を理解するためには、胎生期の創傷治癒過程、皮膚の発生も含めた研究が急務である。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、皮膚におけるRAの標的遺伝子を探ることである。免疫組織化学

法、in situ hybridization、microarray、RT-PCRなどを駆使して網羅的に探索する。RAは脂溶性の低分子物質(分子量:300)で、その濃度をin situで測定できない。生体局所でのRA変化は、RA Response Element (RARE)-lacZ レポーター遺伝子を使用して間接的に測定する。また、Cyp26b1 KOマウスは口蓋裂のため生直後致死であることから、conditional KOマウスを作成して生後の皮膚の解析を試みる。

第二の目的は、正常とCyp26b1 KOを用いて皮膚の機能的解析を行い、RA活性の意義を探索することである。創傷治癒に対する影響をみるため、胎生13.5~18.5日胚を用いて胎仔手術を行う。通常胎生13.5日で見られるScarless Healingが、RAの影響でどのように変化するか大変興味深い。また、胎生17.5~18.5日の皮膚をヌードマウスに移植することにより、致死の影響を避けて解析可能である。更には上皮と間葉を分離して培養することにより、どの時点の上皮あるいは間葉に毛包誘導能がみられるのか探索する。

3. 研究の方法

(1) RA投与による基礎実験

RAを妊娠マウスに投与し、胚の皮膚に対する影響をみる。マウスは、ICRおよびRARE-lacZマウスを使用する。RARE-lacZマウスは、相対的にRAの高い部位がX-gal染色により青染するため、in situでのRA濃度の変化を間接的に知ることができる。胎生12.5~16.5日胚に対し、RAを母体に腹腔注射(30 mg/kg)して投与する。RAの投与時期や投与回数を変化させ、組織学的検討を行う。

(2) 各種マーカー遺伝子・蛋白の発現

各種マーカー遺伝子および蛋白に対し、in situ hybridization、免疫組織化学染色で変化をみる。まず、各種KeratinおよびFlaggrinやLoricrinなどのマーカーを用いて表皮分化の度合いを判定する。Cyp26b1 KOでは、表皮内で基底細胞の異常な増殖、更に表皮内に腺腔様組織がみられるが、真皮内に陥入する毛包構造は認められない。正常な毛包は、毛包幹細胞の存在からも創傷治癒にとって非常に重要である。Cyp26b1 KO皮膚においては、毛包発生に必要なSHH、WNT、BMPの各シグナルマーカー発現に注目して、どの分子をRAが制御しているかを探索する。具体的にはCD34、Keratin15、Lhx2など毛包幹細胞特異的分子の発現をみて毛包幹細胞への分化度を調べる。また、TUNEL法を用いたアポトーシスの状態、BrdUラベルとKi67免疫染色を用いた細胞増殖の評価を行う。更にRARE-lacZレポ-

ター遺伝子を導入し、Cyp26b1 KO皮膚におけるRA濃度の変化をみる。

(3) Microarray実験

Cyp26b1 KOの皮膚は、形態的に胎生15.5日までは正常とあまり差がない。毛包の発生では、毛包芽 (germ) の状態で停止する状態である。RAが及ぼす遺伝子の発現の変化は、既に胎生14.5日には顕著であると推察される。そこで胎生14.5日目の皮膚・皮下組織を採取し、ディスペーゼ処理にて表皮と真皮皮下組織に分離する。表皮群と真皮皮下組織群において、それぞれ正常とCyp26b1 (-/-)のRNAを抽出してmicroarray実験を行う。

(4) 創傷治癒実験

創傷治癒研究において、Scarless Healingの解明は重要かつ急務である。本実験は研究分担者の貴志が確立した方法に従って行う。マウスでは、胎生13.5日に作成された皮膚全層の創が、Scarless Healingを呈することが知られている。また、胎生期を通じて作成された創は、生後に比して癒痕が少ない。母体に麻酔を行い、胎生13.5~17.5日胚の側胸部に皮膚全層の創を作成する。術後の子宮収縮を予防する目的で、Ritodrine (1 mg/kg)を腹腔内投与して閉創する。母体は12時間後、24時間後、48時間後に安楽死させ、胚の創周囲組織を採取して組織学的検討を行う。また、末梢神経機能依存性の皮膚創傷治癒を検討するため、肋間神経を切断する群も含めて検討する。

(5) Conditional KOマウスの作成

Cyp26b1 KOマウスは口蓋裂などが原因で生直後致死となる。これを回避する目的で、conditional KOマウスを作成する。Cre-loxPシステムは、特定遺伝子のプロモーター制御下に発現されるCre蛋白が、2つのloxP配列に挟まれた(flox) DNA配列を組換えにより欠損させるシステムである。本システムを用いても致死を回避できない可能性はあるが、少なくともCyp26b1を限局した形でKOできるため、得られる結果は非常に有用である。

(6) 毛包誘導実験

胎生皮膚を免疫不全マウス (ヌードマウス)の背に移植すると、毛包を有した皮膚が再生できる。本実験を正常とCyp26b1 KO皮膚を用いて行い、毛包誘導能に関する評価を行う。Cyp26b1 KOの間葉には毛包誘導能が欠如していると推察されるが、それまでに得られたデータより必須の因子を同定し、それを負荷してレスキュー実験が行えれば目的は達せられる。

4. 研究成果

本研究にてRAが正常な皮膚発生および創傷治癒過程において極めて重要な役割を果たしていることが判明した。Cyp26b1の欠損により皮膚でのRA濃度の上昇が惹起され、結果としてRA標的遺伝子の発現かく乱が生じたものと推察された。Cyp26b1 KO皮膚でのRA濃度の上昇は、RARE-lacZレポーター遺伝子やMicroarrayでのRA応答遺伝子の発現変化により確認され、また妊娠マウスを用いたRA投与実験でCyp26b1 KO皮膚に近似した表現型を誘導できた。

Cyp26b1 KO皮膚の特徴的異常として、バリア機能不全と毛包形成不全を見出した。マウス皮膚のバリア機能は、胎生16.5日から背側皮膚より生じ、胎生18.5日には全身において完成する。Cyp26b1 KO皮膚では胎生18.5日においてもバリア機能が欠損していた。また、Cyp26b1 KO表皮では、角質層に不全脱核細胞の存在、Filaggrinの欠損(ケラトヒアリン顆粒の欠損)、Loricrinの過剰産生が認められた。さらにケラチン関連遺伝子では、K19(粘膜マーカー)の異所発現、Ktrap13(周皮マーカー)の過剰・持続発現がみられた。毛包誘導に関しては、WNT系およびShh系マーカーの発現に変化はなかったが、毛包周囲のFgf10の異所発現が毛包発生を抑制している可能性が示唆された。

胎仔手術は、胎生15.5日と17.5日胚に対して行い、Cyp26b1 KOにおける線維化の増大と創傷治癒の遅延を認めた。さらに正常とCyp26b1 KO由来の線維芽細胞培養実験を行い、創傷治癒に重要なTGF-betaに対する反応をみた。結果的には両群においてTGF-beta刺激による関連遺伝子(SMADs, CTGF)の発現に有意差はなかった。

胎生18.5日のCyp26b1 KO皮膚を用いたヌードマウスへの移植実験では、予想外に毛包形成が誘導された。このことは、RAの作用が胎生期と生後において違う可能性を示唆している。

Conditional Cyp26b1 KOは、En1-Cre、Prx1-Cre、Hoxb6-Creを用いて、間葉特異的Cyp26b1 KOを順次作成した。得られたCyp26b1 conditional-KO皮膚は、予想に反し表皮構造は正常に近かった。Cyp26b1は真皮に限局して発現するとされていたが、再検討した結果、Cyp26b1は表皮でも発現していることを見出した。また、Cyp26b1 conditional-KO皮膚には毛包が存在するが、毛流が一定でないことからRAが毛の極性に関与していることが考えられた。

本研究では、皮膚発生におけるRAの役割を

探索してきたが、表皮においてはバリア機能、真皮においては毛包誘導能に重要であると結論した。また、RAは表皮と真皮に独立した調整機構が存在するも、表皮-真皮間の相互作用にも大きく関与していることが示された。

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 18 件)

- ① Okano J et al. (Sakai Y; 9 人中 8 番), Increased retinoic acid levels through ablation of Cyp26b1 determine the processes of embryonic skin barrier formation and peridermal development. *J Cell Sci.* 査読有, (2012) 125:1827-36. DOI:10.1242/jcs.101550
- ② Fushimi T et al. (Itami S; 6 人中 6 番), Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen.* 査読有, (2012) 20:226-35. DOI:10.1111/j.1524-475X.2012.00771.x
- ③ Shimizu R et al. (Kishi K; 6 人中 6 番), Sphere formation restores and confers hair-inducing capacity in cultured mesenchymal cells. *Exp Dermatol.* 査読有, (2011) 20:679-81. DOI:10.1111/j.1600-0625.2011.01281.x
- ④ Inui S et al. (Itami S; 6 人中 6 番), In vitro and in vivo evidence of pathogenic roles of Hic-5/ARA55 in keloids through Smad pathway and profibrotic transcription. *J Dermatol Sci.* 査読有, (2010) 58:152-4. DOI:10.1016/j.jdermsci.2010.03.008
- ⑤ Kanazawa S et al. (Sakai Y; 11 人中 8 番), bFGF regulates PI3-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. *PLoS One.* 査読有, (2010) 5:e12228. DOI:10.1371/journal.pone.0012228

[学会発表] (計 8 件)

- ① 坂井靖夫ほか, Cyp26b1 遺伝子欠損マウスは皮膚のバリア機能が障害される, 第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2011 年 10 月 6 日, 東京
- ② 坂井靖夫, やさしい分子生物学 - 3 次元的に標的物質を視る (教育シンポジウム), 第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演), 2011 年 10 月 6 日, 東京
- ③ Okano J et al. (Sakai Y), Increased endogenous retinoic acid by the absence of Cyp26b1 impairs peridermal

development and skin barrier formation during development. 2011 Annual Meeting of Society of Investigative Dermatology, 2011 年 5 月 4 日, Phoenix (USA)

- ④ Sakai Y et al. Retinoic acid induces cleft palate by suppressing Fgf10 in the bend region of the palatal shelves. *Plastic Surgery* 2010, 2010 年 10 月 1 日, Toronto (Canada)
- ⑤ 坂井靖夫、細川 互, 発生学を基盤とした先天異常疾患に対するアプローチ (主題シンポジウム), 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演), 2010 年 9 月 17 日, 横浜

[図書] (計 1 件)

- ① Sakai Y, Dräger UC. Detection of retinoic acid catabolism with reporter systems and by in situ hybridization for CYP26 enzymes. *Methods Mol Biol.* (2010) 652:277-94. DOI: 10.1007/978-1-60327-325-1_16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 靖夫 (SAKAI YASUO)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 50272315

(2) 研究分担者

板見 智 (ITAMI SATOSHI)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号: 30136791

貴志 和生 (KISHI KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40224919

吉村 陽子 (YOSHIMURA YOKO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 20129737

(H21 まで研究分担者として参画)

井上 義一 (INOUE YOSHIKAZU)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号: 80340264

(H21 まで研究分担者として参画)