

## 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25年6月11日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592002

研究課題名（和文） 創傷治癒における骨髄細胞（Fibrocyte）の関与とその発現異常の解明

研究課題名（英文） Fibrocyte behavior relative to blood vessels under skin wound healing

## 研究代表者

丸山 優 (MARUYAMA YU)

東邦大学・医学部・名誉教授

研究者番号：00101931

## 研究成果の概要（和文）：

創傷治癒過程の主体である線維芽細胞の由来は一部が血球由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte: Fb)由来であると判明してきた。しかしFbの発現特異性やその誘導を構成する微小環境成分は解明されていない。今回、正常ないしは病的な皮膚創傷治癒過程で積極的に参画していると推察されるFbの発現特異性や線維化誘導メカニズムへの関与を明確にするため、皮膚切除材料非病変部組織を蒐集し、創傷治癒過程を5期に分類して各病期においてCD34, Leukocyte specific protein-1 (LSP-1), procollagen-I (Pro-I) の二重染色で同定されるFbの血管内外での発現特異性や血管を介在としたケモカイン誘導因子の関与を検討した。

ヒト正常皮膚創傷治癒では、各創傷治癒期において Fb は血管内(Circulating)と血管外(Infiltrated)とでは全く異なる発現様式を示し、それらの由来や分化様式が異なることが示唆された。さらに、 $\alpha$ -SMA 染色から分類した毛細血管、細小動静脈、動脈における CXCL12, 6Ckine, MCP-1 の発現を解析すると、細小動静脈で CXCL12 の発現増加が確認でき、CXCL12 のレセプターである CXCR4 は、CD34+細胞に共発現していた。よって、骨髄細胞から Circulating Fb への分化誘導において CXCL12 発現性細小動静脈の血管構築による微小環境形成が重要であると考えられた。特に、Circulating Fb の血管外への誘導に CXCL12-CXCR4 の相互作用が関与していると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Fibrocytes are bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and play an integral role for the repair process following tissue injury. However, the extent of fibrocytes in extra- and intra-vascular regions during wound healing process remains obscure. The present study was undertaken to investigate the distributional relationship between circulating and infiltrated fibrocytes in relation to the level of vessel formation. After double-staining of 49 human skin tissues samples with CD34 or leukocyte-specific protein-1 (LSP-1) plus pro-collagen I, a considerable difference in the numbers of fibrocytes was evident between extra- and intra-vascular regions, with obviously fewer circulating, than infiltrated fibrocytes. The expression of infiltrated, but not of circulating fibrocytes, changed as healing advanced, suggesting that the cellular properties of fibrocytes differed between extra- and intra-vascular regions. Triple staining demonstrated the specific distribution of pro-collagen I+/CD34+ circulating fibrocytes in arterioles/venules, with the obviously increased expression of CXCL12 in the endothelial cells. Based on the relatively specific distribution of pro-collagen I+/CD34+ circulating fibrocytes within arterioles/venules, CXCL12-positive arterioles might provide a microenvironment that promotes CXCR4-mediated fibrocyte chemotaxis. These findings suggest that the coordinated cellular response by fibrocytes and endothelial cells in arterioles/venules is essential for trafficking of circulating fibrocytes into sites of tissue injury.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2012年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

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：創傷治癒学, Fibrocyte, 組織修復

1. 研究開始当初の背景

受傷後の皮膚修復は炎症期、増殖期、癒痕形成期が連続的かつスピーディーに遂行され、特に後期では線維芽細胞(Fibroblast)とそれから分化した筋線維芽細胞(Myofibroblast)から産生される膠原線維沈着による癒痕形成で組織修復が完了する。したがって癒痕化は膠原線維産生能を有する線維芽細胞の質や量に依存する。この癒痕線維化で重要な役割を果たす線維芽細胞はその一部が骨髄細胞(Fibrocyte)から分化することが *in vitro* で判明してきた。しかし *in vivo* の修復組織の主体である肉芽組織は多種類の細胞から構成されているため、同過程における Fibrocyte の種類や発現性、さらに同細胞から分化する線維芽細胞や筋線維芽細胞との協調による線維化への関与について不明な点が多い。最近肺線維症における線維化亢進に Fibrocyte の増加が報告された(Annika AS, et al. IJBCB 2008)。このことは肺線維化過程において骨髄細胞である Fibrocyte の積極的な参画の重要性を示唆する。したがって、正常ないしは病的な皮膚創傷治癒過程で積極的に参画していると推察される Fibrocyte の発現特異性や線維化誘導メカニズムへの関与を明確にするため本研究の申請に至った。

2. 研究の目的

- (1) 同課程における Fibrocyte の発現や subtype を同細胞マーカーの多重染色を用いた特異的染色法から解析しこれらの細胞の局在や発現頻度から皮膚創傷治癒に関与する Fibrocyte を同定する。
- (2) 創部に参画する Fibrocyte の骨髄からの誘導メカニズムを分化誘導サイトカインやケモカインを発現する細胞との相互関係から解析し、Fibrocyte の分化誘導に関する微小環境を同定する。
- (3) この過程で線維芽細胞(Fibroblast)、筋線維芽細胞(Myofibroblast)の発現性も検討

し、Fibrocyte, Fibroblast と Myofibroblast の相互関係による線維化誘導のメカニズムを解明する。

(4) ケロイドや糖尿病性潰瘍における Fibrocyte の発現変化を正常創傷治癒過程と比較検討し、病的な創傷治癒過程における骨髄由来の Fibrocyte の発現異常を明らかにし、同細胞による積極的な病態関与を検討する。最終的に、正常創傷治癒過程における Fibrocyte の機能と役割を解明し、難治性糖尿病性皮膚潰瘍等における Fibrocyte の分化発現異常が明らかになれば、同疾患の治療として Fibrocyte 移植という細胞療法による新たな治療開発に寄与すると考える。

3. 研究の方法

皮膚手術材料非病変部組織を蒐集し、それらの創傷治癒期を組織像から 5 期(炎症期、炎症増殖期、増殖期、リモデリング期、癒痕期)に分類し、各創傷治癒期における Fibrocyte の発現性を、各種抗体をマーカーにした多重免疫染色から解析する。同細胞の発現消長を、線維芽細胞(Fibroblast)や筋線維芽細胞(Myofibroblast)のそれと比較検討し、創傷治癒過程の進展における Fibrocyte の分化過程の全容を組織レベルで解明する。また、 $\alpha$ -SMA 血管平滑筋染色との比較検討から血管内(Circulating) Fibrocyte と血管外(Infiltrated) Fibrocyte に分類し、Fibrocyte の血管局在と組織修復との関連性を検討する。さらに、正常創傷治癒過程での発現特異性と、病的な創傷治癒での発現性を比較検討し、Fibrocyte の分化発現異常とそれによる病態関与を検討する。

4. 研究成果

- (1) 血管外(Infiltrated)Fb の発現特異性
 

各種蛍光二重染色で陽性の Fb は肉芽組織の血管内外で同定された。その頻度を各治癒期にて統計学的に解析すると、Fb は血管内に比べて血管外で著増していた。また、

Procollagen-I/LSP-1およびCD34/LSP-1陽性細胞は炎症・増殖期をピークに増加し癒痕期に向かって減少した。Procollagen-I/CD34陽性細胞は、他グループより発現数は少ないが、ほぼ同様の変化を示した。なお正常皮膚ではFbの発現を認めなかった。癒痕期への移行とともにCD31減少とprolyl-4-hydroxylase(P4H)増加がみられ、同時にCD34/LSP-1陽性細胞におけるP4H発現が同定されたので、LSP-1はFbのマーカであることが確認された。

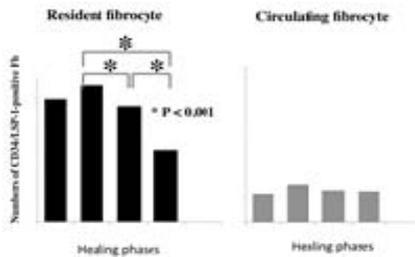
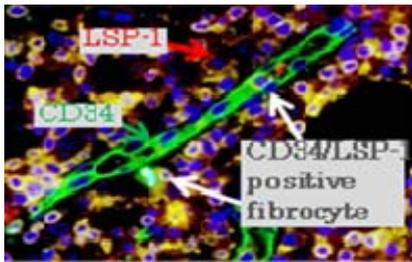


Fig. 1: 我々が同定したFibrocyteは肉芽組織の増減と一致する。蛍光法陽性のFb(上)(Inomata N, *Jpn J Plast Reconstr Surg.* 2012)

(2) 血管内(Circulating)Fbの発現特異性

各創傷治癒期において、血管内Fb発現変化を統計学的に解析すると、Procollagen-I/CD34およびProcollagen-I/LSP-1陽性Fbは各期で変動がなかった。1の結果を考慮するとFbは血管内外で全く異なる発現様式を示し、その由来や分化様式が異なることが示唆された。

(3) 血管内(Circulating)Fbの血管特異性

$\alpha$ -SMA染色から分類した毛細血管、細小動静脈、動脈のうち、血管内Fbは全てのグループの細小動静脈で発現増加し、Procollagen-I/CD34およびCD34/LSP-1グループでは細小動静脈で特異的に発現していた。

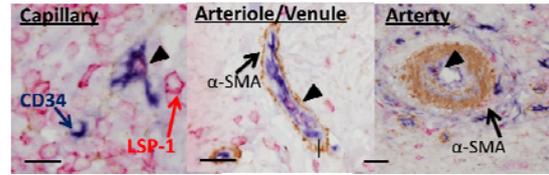


Fig. 2: 我々が同定した血管内(Circulating)Fbの血管特異性。免疫染色法陽性のFb(▲)(Inomata N, *Jpn J Plast Reconstr Surg.* 2012)

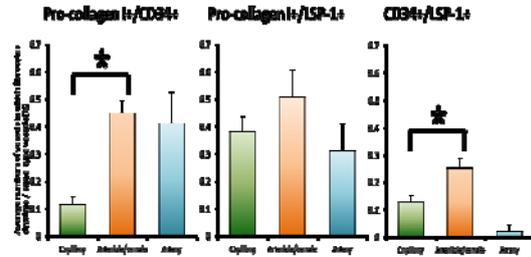


Fig. 3: 血管種類別にみた1血管あたりのFb発現頻度。血管内Fbは細小動静脈に特異的に発現した。(猪股直美, 癒痕・ケロイドジャーナル. 2012)

(4) ケモカイン発現における血管特異性

$\alpha$ -SMA染色から分類した血管の種類別にCXCL12, 6ckine, MCP-1の発現を解析した。CXCL12, 6ckineは血管内皮細胞に局在し、CXCL12は細小動静脈に発現増加したのに対し6ckineは毛細血管に発現増加が観察された。細小動静脈では血管内Fbの発現性が高いことから同細胞の誘導にCXCL12の関与が示唆された。

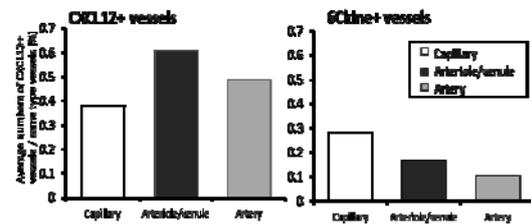
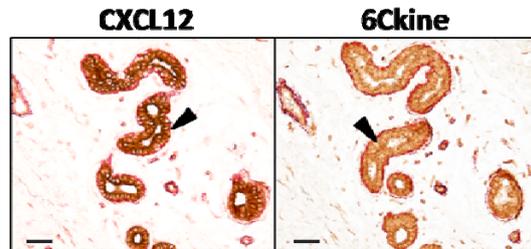


Fig. 4: 我々が同定したケモカイン発現(▲)。CXCL12は細小動静脈で発現増加を認めた。(Inomata N, *Jpn J Plast Reconstr Surg.* 2012)

組織修復における線維芽細胞の起源は、血球由来間葉系前駆細胞(Fb)、血管内皮細胞、血管周皮細胞などが報告されているが一定

の見解は未だ得られていない。Fbの分化様式も不明な点が多く、Pillingらは骨髄造血前駆細胞(precursor)の一部が血管内でFbに分化する一方、多くは前駆細胞の段階で組織に移行し、組織内でFbに分化すると提唱している。今回同定されたFbは血管内外で発現頻度や発現様式が全く異なるので、組織修復期のFb誘導メカニズムは血管内外で異なる可能性が考えられ、Pillingらの説の関与が示唆された。

各治癒期で発現する血管は、肉芽組織を形成する増殖期以降で細小動静脈が増加し、血管内Fbは細小動静脈で特異的に発現していた。この過程でCXCL12は細小動静脈で発現が増加しており、そのレセプターCXCR4はCD34陽性Fb様細胞での発現が確認された。よって血管内Fb誘導機構に細小動静脈で構成されるCXCL12-CXCR4の相互作用の重要性が示唆された。

#### 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5件)

- ① Inomata N(1番目), Okada E(3番目), Imaizumi R(4番目), Maruyama Y(5番目), 他1名. Fibrocyte behavior relative to blood vessels under skin wound healing. Jpn J Plast Reconstr Surg. 査読有. 135: 24-28 (2012)
- ② 猪股直美(1番目), 今泉りさ(3番目), 岡田恵美(4番目), 丸山優(5番目), 石井壽晴(6番目), 他2名、皮膚創傷治癒におけるFibrocyteの発現誘導とその微小環境の解析、癬痕・ケロイドジャーナル、査読有、6: 25-28 (2012)
- ③ Imaizumi R(1番目), Inomata N(3番目), Okada E(4番目), Maruyama Y(5番目), Ishii T(6番目), 他1名. PROMOTED ACTIVATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP)-2 IN KELOID FIBROBLASTS AND INCREASED EXPRESSION OF MMP-2 IN COLLAGEN BUNDLE REGIONS. Wound Repair Regen. 18: A4 (2010) (査読無)
- ④ Inomata N(1番目), Imaizumi R(3番目), Okada E(4番目), Maruyama Y(5番目), Ishii T(6番目), 他1名. CD34/LSP-1-POSITIVE FIBROCYTES IN SKIN WOUND HEALING. Wound Repair Regen. 18: A2 (2010) (査読無)

- ⑤ Akasaka Y, Imaizumi R(8番目), Inomata N(9番目), Ishii T(14番目), 他11名. The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing. The Journal of Pathology 221 (3) :285-299, 2010 (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① 猪股直美、Fibrocyte behavior relative to blood vessels under skin wound healing、第42回日本創傷治癒学会学術集会、2012年12月4日、かでの2.7(北海道)
- ② 猪股直美、創傷治癒における血管構造に関連した血球由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の発現性、第21回日本形成外科学会基礎学術集会、2012年10月4日、ホテルリステル猪苗代湖(福島)
- ③ 猪股直美、皮膚組織修復における血球由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の誘導メカニズムの解析、第41回日本創傷治癒学会学術集会、2011年12月5日、ウインクあいち(愛知)
- ④ 猪股直美、皮膚創傷治癒におけるFibrocyteの発現誘導とその微小環境の解析、第6回癬痕・ケロイド治療研究会、2011年8月28日、パレスサイドビル(東京)
- ⑤ 猪股直美、血管内外における血球由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の発現特異性、第19回日本形成外科学会基礎学術集会、2010年9月16日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑥ 猪股直美、皮膚創傷治癒における血球由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の発現性、第99回日本病理学会総会、2010年4月27日、京王プラザホテル(東京)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

丸山 優 (MARUYAMA YU)  
東邦大学・医学部・名誉教授  
研究者番号：00101931

##### (2) 研究分担者

石井 壽晴 (ISHII TOSHIHARU)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：30101893

岡田 恵美 (OKADA EMI)  
東邦大学・医学部・講師  
研究者番号：50318242

今泉 りさ (IMAIZUMI RISA)  
東邦大学・医学部・准修練医  
研究者番号：20453847

猪股 直美 (INOMATA NAOMI)  
東邦大学・医学部・シニア・レジデント  
研究者番号：10439937

(3)連携研究者 該当なし