

## 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 7日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22657018

研究課題名（和文）有袋類ハイロジネズミオポッサムの未成熟期上皮組織修復能の解析

研究課題名（英文）Studies on the tissue repair capability of the epithelia of gray short-tailed opossums at their immature stage

研究代表者

猪原 節之介（IHARA SETSUNOSUKE）

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90101295

研究成果の概要（和文）：創傷治癒様式は胎児型から成体型への転換が，ラット等の真獣類では胎仔期に起こることが知られるが，真獣類に比べ未成熟で生まれる有袋類ハイロジネズミオポッサム（*Monodelphis domestica*）の新生仔期の皮膚の組織修復能を形態学的に検証したところ，そうした転換はオポッサムでは一律的ではなく，指標とする事象に左右されることが，in vivo, in vitro 両面の解析から明らかになった。組織修復能の構築については，生後1日目オポッサム新生仔の表皮では角質層分化が既に見られるというヘテロクロニーとの関連性を含め，有袋類の特殊性の有無の検証が俟たれる。

研究成果の概要（英文）：Previous studies show that, in placental mammals such as rats, the mode of wound healing transits from the fetal-type to adult-type during the fetal stage. This study aimed at morphological characterization in vivo as well as in vitro of the wound repair capability of the skin of a marsupial gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) which is known to be born in a very "premature" state, and revealed that the mode of healing depended on the events chosen as the evaluation criteria. Further analyses on the possible marsupial uniqueness, with respect to the heterochrony that one-day neonates already have a cornified epidermis, are promising for elucidation of the establishment of tissue repair ability in marsupials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：ハイロジネズミオポッサム，有袋類，創傷治癒，未成熟期，皮膚

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の上皮細胞（あるいは上皮組織）の

増殖性・分化能・可動性といった基本的な性質が胎生期，新生仔期，成体期にわたり刻々

と変動するという事実（例：Ihara et al., 1990, 1992）は、まず純粋に生物学的に興味深いだけでなく、その追究は医学応用に資する意味でも重要である。端的な例を挙げれば、多くの哺乳類の皮膚欠損は胎児期のように若い時期ほど速くしかも無瘢痕治癒する傾向を示す（Martin, 1997; Martin and Parkhurst, 2004）。胎児皮膚の無瘢痕治癒の原因究明は、ケロイドや肥厚性瘢痕といった難病の治療法の開発改良に繋がる基盤研究に他ならない。しかしながら、そうした未成熟期治癒様式の決定要因を知るべく行われている動物実験研究を瞥見して言えることは、細胞培養系など *in vitro* model 系での解析は進展するものの、*in vivo* での検証は、母胎中の胎仔への access の難しさから思うように捗ってはいないことである。いわば「未熟仔」出産する有袋類であるハイロジネズミオポッサム（以下オポッサムと略称する）は、実験動物としての以下の3つのアドバンテージを有することを考え合わせると、この難関を打開する絶好の「モデル動物」と位置づけることができる。（1）オポッサムは有袋類に属する点では他の哺乳類（真獣類）とは個体発生的特徴を異にするものの、上皮性器官を含む多くの器官（系）の構造・機能的特徴は基本的に哺乳類と共通であると考えられる。（2）オポッサムはおとなしい気性、個体の大きさ、年中繁殖が可能なこと（1個体は年3回出産可能）、成長の速さ（性的成熟：5-6ヶ月）等、マウス・ラットに劣らない利点が認められ、欧米ではすでに古くから実験動物として使用されている（例：Block, 1960）。（3）実験動物としての上述の評価を踏まえ、2006年には有袋類では初めてゲノム配列決定がなされ、今後は、哺乳類進化の解明に向け、有袋類の1スタンダードとして欠かせぬ研究対象となるだけでなく、ホモログ遺伝子の解析を介しヒトを含む哺乳類を対象とした多方面の研究のモデル系として大きく貢献するにちがいない（Mikkelsen et al., 2006）。

猪原は、1986年以来、未分化段階の表皮の外傷に対する修復能がいかなるものかという基本課題に興味を持ち、ラット胎仔、新生仔、アフリカツメガエル胚、ニワトリ胚を用いて *in vivo*, *in vitro* 両系による解析を重ね、ラット胎仔期の中で創傷治癒様式が胎仔型から成体型に転換することの発見（Ihara et al.: *Development* 110, 671-680, 1990; Ihara et al.: *Development* 114, 573-582,

1992）をはじめ、最近では、ラット新生仔ケラチノサイトの細胞移動に細胞接着分子 P-cadherin が関与すること（Koizumi et al., *Cell Tissue Res.* 315, 187-195, 2004; Koizumi et al., *Dev. Growth Differ.* 47, 75-85, 2005）、またアフリカツメガエル胚表皮の創閉鎖速度が上皮の物理的移動速度として最速レベルであること（Yoshii et al., *Dev. Growth Differ.* 47, 553-561, 2005; *ibid.* 563-571, 2005）を明らかにした。こうした一定の成果を踏まえ、また、他者による関連研究の知見を合わせ現時点で総括すると、上皮の細胞運動の本質は、細胞接着を保ち“シート状態（=隣接細胞との接着）”を保ったままの“集団運動”であり、その本質を解明するには、そういった運動性の高い幼若期の上皮細胞の *in vivo* 系による解析が可能で、かついまやゲノム解析の知見を利用する道が開けたオポッサムを研究対象とすることが至極タイムリーであることが頷ける。オポッサムの創傷治癒についての先行研究は、英国の Armstrong et al. (*Developmental Biology* 169, 242-260, 1995) に限られ、示唆に富むが、データを記載が粗雑なパイオニアワークに留まる内容である。

## 2. 研究の目的

オポッサムは、種々の生理・形態的形質が真獣類\*に類似する一方で、真獣類では胎仔期半ばに相当する未成熟な発生段階の新生仔を出産するという特性を持つ。そこで本研究は、オポッサム新生仔が「(真獣類の)胎仔モデル」たり得る可能性に着目し、以下の目的を設定する。すなわち、オポッサムの皮膚形成過程を把握した上でその組織修復能の個体発生的変遷の有無を、システマティックな形態学的解析を遂行することにより明らかにし、ラットでの先行研究結果（Ihara et al. 1990, 1992）である胎仔型から成体型への治癒様式の転換が胎生中に起こるといふ事実の検証に繋げたい。

## 3. 研究の方法

### (1) 生後 15 日目皮膚全層欠損創の創傷治癒過程の *in vivo* 解析

研究開始当初、ラットについての知見から成体型創傷治癒様式を示すことが予想された、生後 15 日目のオポッサム新生仔をまず取り上げ、新生仔を麻酔後、ダーマルパンチを用いて、直径 1 mm の皮膚全層欠損創を施し、治癒経過を外観観察と組織学あるいは免疫組織化学的手法により解析した。

表皮の解析としては、ヘマトキシリン・エオシン染色、表皮の厚さの計測、細胞面積の計測、Br dU 標識による細胞増殖頻度計測を

行い、また、抗体染色により K14 keratin, K10 keratin, E-cadherin, Vimentin 発現を調べた。

真皮の解析としては、ヘマトキシリン・エオシン染色、マッソン-トリクローム染色、真皮の厚さの計測を行い、また抗体染色により  $\alpha$ -smooth muscle actin, PECAM 1 発現を調べた。TUNEL 解析も行った。

(2) 生後 1 日目皮膚切創の創傷治癒過程の *in vivo* 解析

ラット等の真獣類では胎仔に相当することが考えられる生後 1 日目のオポッサム新生仔を取り上げ、その背部皮膚に長さ 1mm の切創を施し、マッソン・トリクローム染色と抗 K14 keratin 抗体染色を行った。

(3) 新生仔期表皮細胞の増殖・分化能の *in vitro* 解析

生後 3 日目、15 日目オポッサム新生仔と、コントロール群として生後 1 日目ラット新生仔、成体オポッサム、成体ラットそれぞれの皮膚から、定法により表皮細胞画分を調製し、マウス表皮細胞の初代培養用に CELLn TEC 社が開発された CnT-07 (増殖用)、CnT-02 (分化用) 培地を用いて初代培養を行った。経時的に細胞を固定し、ヘマトキシリン・エオシン染色 および抗 K14, K10 keratin 抗体染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 生後 15 日目オポッサム新生仔皮膚欠損創における再表皮化の解析について

ヘマトキシリン-エオシン染色による形態学的解析から、作創 72 時間後に殆どの個体で再表皮化が完了することが示された。また、ラットと比べ、創閉鎖過程で表皮の肥厚化が表皮移動開始時からと早く、作創 72 時間後の創部では正常表皮の厚さの約 6 倍に達するまでの顕著な表皮の肥厚化が見られた。K14, K10 keratin の発現を経時的に観察したところ、肥厚部の細胞は基底細胞に特異的に発現する K14 のみが発現していたことから、基底細胞様細胞であることが示唆された。抗 BrdU 抗体染色による細胞増殖の解析より、作創 72 時間後は作創直後に比べ細胞増殖頻度が高かった。加えて、抗 E-cadherin 抗体染色により細胞輪郭を可視化した上で細胞容積計測を行った結果、作創 72 時間後では細胞容積の増加が認められた。以上から生後 15 日目のオポッサム新生仔に特有と思われる顕著な表皮肥厚化には細胞増殖頻度の増加と細胞容積の増加がともに関与することが考

えられた。生後 3 日目新生仔の結果も同等な手法で調べ比較するべきであるが、未検討である。

(2) オポッサム皮膚欠損創における肉芽形成の解析について

オポッサムにおいて創傷治癒過程で生じる肉芽組織が、どの発生ステージから、あるいは作創後のどの時期から形成されるようになるかについての詳細な知見はない。そこで、創傷治癒の過程で真皮側に生じる肉芽組織のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin

( $\alpha$ -SMA) の発現を調べた。いずれは詳細な検証が必要だが、真獣類の知見や Armstrong らによるパイオニア研究 (Armstrong et al. 1995) による知見を基に、ここでは仮に、生後 3 日目新生仔 (3 dNBO) を胎児型創傷治癒モデルとし、生後 15 日目新生仔 (15dNBO) を成体型創傷治癒モデルとして用い、背部皮膚に皮膚全層欠損創を施し、形態学的解析を試みた。また、治癒様式を比較するためにモデル動物として、ラット生後 1 日目新生仔 (1 dNBR) を用いて同様に実験を行った。その結果、3 dNBO, 15dNBO, 1 dNBR は作創後 2 日目に炎症反応が起きており、作創後 4 日目に肉芽組織が出現、6 日目に創部の膠原繊維の発現が上昇、作創後 8 日目では抗原繊維量の増加が確認された。また、3 dNBO のみ創部は正常域と同様の厚さになっていた。作創後 22 日目では 3 dNBO, 15dNBO, 1 dNBR のいずれかにおいても癒痕の特徴は微弱であり、生後 2 年以降のオポッサム成体では顕著な癒痕の特徴が示されたことと対照的であった。免疫染色の結果より、3 dNBO, 15dNBO, 1 dNBR も作創後 2 日までは創内で  $\alpha$ -SMA の発現が見られなかった。 $\alpha$ -SMA 陽性細胞は、作創後 6 日目の創部で一番多く検出され、作創後 4 日目でわずかに検出されるものの大半が血管平滑筋であった。作創後 8 日目では  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の発現が減少するという結果が得られた。TUNEL 解析の結果では 3 dNBO, 15dNBO, 1 dNBR も創内部の真皮では死細胞は検出されず、表皮上層で検出された。以上のように、オポッサム生後 3 日目、生後 15 日目新生仔の皮膚創傷では、いずれも成体期に典型的な癒痕はみられず、当初の予想に反し、調べた指標についてみる限り、オポッサムの異なる発生ステージ間での治癒様式の差異は見られなかった。さらに、ラット生後 1 日目個体と治癒傾向に大きな違いが見られず、また、

肉芽中の筋繊維芽細胞は、作創後4日目以降で確認されるが、まだ未熟であり、6日目をピークに筋繊維芽細胞はその後量的に減少するがアポトーシスによる消失ではないことが明らかとなった。

総じて、用いた指標による検証からは、オポッサムの少なくとも生後15日の間には真皮では、胎児型から成体型への創傷治癒様式の顕著な転換は認められないと言える。

(3) 生後1日目皮膚切創の創傷治癒過程の *in vivo* 解析について

生後1日目オポッサム新生仔の背部皮膚に長さ1mmの切創を施し、マッソン・トリクローム染色と抗K14 keratin抗体染色により創傷治癒過程を形態学的に解析した。

本研究で施した切創は、マッソン・トリクローム染色の結果から、作創後6時間では作創直後よりも創部が拡張したが、作創後12時間では創縁両端の表皮が創部中央へ近づいて創部は縮小し、作創後24時間前後で創閉鎖が完了した。

生後1日目オポッサム新生仔皮膚の創閉鎖過程において、正常時や作創後12時間までは表皮の基底層1層でのみ発現したK14が、作創後24時間の創部と創周囲では表皮全有核層において発現がみられた。K14の発現領域の拡大は創閉鎖完了後の作創後48時間でも観察され、作創後72時間では正常時の発現パターンへの回復がみられた。

生後1日目新生仔皮膚の創閉鎖過程における、上述の表皮の形態変化およびK14発現パターンの変化は、生後1日目ラット新生仔の創傷治癒過程とよく似た結果となった。すなわち、猪原自身による先行研究により、ラットでは胎生16日から18日の間に創傷治癒様式が胎児型から成体型に転換することが明らかにされている (S. Ihara et al. 1990, 1992) が、形態変化とK14発現の様相の時間経過という二つの指標でみる限り、オポッサム生後1日目新生仔の創閉鎖様式は、成体型の様式に類することが示唆された。

(4) 新生仔期表皮細胞の増殖・分化能の *in vitro* 解析

用いた市販培地 (CnT-07, CnT-02) がオポッサム表皮細胞に適合するか否かの検証が不十分なままでの検討結果になるが、例えば一定播種密度での比較で *confluent* 到達速度が生後3日目オポッサム > 生後15日目オポッサム > 生後1日目ラットという差異がある (成体オポッサム、成体ラットは *confluent*

に達しない) など興味深い事実が明らかとなった。さらに、このことに関連して、*in vitro* の挙動では胎児モデルと見なせる生後3日目 (のみならず1日目も) オポッサム新生仔の表皮の最外層はなんと角質層であるという興味深い事実が明らかとなった。このことはオポッサム固有の進化 (ヘテロクロニー) の一端を示唆していると考えられる。

## 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)

[学会発表] (計4件)

1. 胎児期創傷モデルとしての有袋類ハイロジネズミオポッサム新生児の使用. 足立達哉・松崎貴・武智眞由美・山田高也・猪原節之介. 日本動物学会第82回大会, 2011年9月21日, 旭川市大雪クリスタルホール (旭川)

2. 初代培養系によるハイロジネズミオポッサム表皮細胞の増殖・分化能の解析. 宮原明泉・猪原節之介・松崎貴. 日本動物学会第82回大会, 2011年9月21日, 旭川市大雪クリスタルホール (旭川)

3. ハイロジネズミオポッサム皮膚全層欠損創における創閉鎖の解析. 林愛之・松崎貴・猪原節之介. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京大学 (東京)

4. 有袋類ハイロジネズミオポッサム新生児皮膚全層欠損創における肉芽形成の解析. 足立達哉・松崎貴・猪原節之介. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京大学 (東京)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪原 節之介 (IHARA SETSUNOSUKE)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号: 90101295