

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659371
研究課題名（和文）骨髄由来血管内皮前駆細胞は皮膚損傷の受傷後経過時間判定のための指標となり得るか？
研究課題名（英文）Are bone marrow-derived endothelial progenitor cells a potential marker for wound age determination?
研究代表者
近藤 稔和 (KONDO TOSHIKAZU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70251923

研究成果の概要（和文）：骨髄由来の血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell, EPC）は、皮膚創傷治癒にも関与している。CCR5 遺伝子欠損マウスでは、損傷部局所における EPC 数が少なく、創傷治癒が遅延していた。以上、皮膚創傷治癒では、CCR5 を介したシグナルが EPC の動員を制御していることを明らかにした。また、法医実務的にヒトの皮膚損傷試料では、EPC が受傷後経過時間判定の有用な指標であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：BM-derived endothelial progenitor cells (EPCs) are critical and essential for neovascularization in wound repair. Ccr5<sup>-/-</sup> mice showed delayed skin wound healing with the reduction of EPC accumulation at the wound sites. These observations implied that CCR5-mediated signal can regulate EPC recruitment from the bone marrow. Moreover, the detection of EPCs in human skin wounds could be a useful marker for wound age determination in forensic practices.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：骨髄前駆細胞, EPC, ケモカイン, 皮膚損傷, 受傷後経過時間

## 1. 研究開始当初の背景

法医実務において、皮膚損傷の受傷後経過時間判定は必須である。これまで受傷後経過時間判定のために、皮膚損傷治癒に関与する様々な細胞や分子（増殖因子やサイトカイン）の探索が行われてきた。近年、骨髄には多分化能を有する様々な幹細胞が存在することが明らかにされている。特に骨髄由来の血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell, EPC）は、皮膚損傷治癒にも関与していることが明らかにされつつある。しかしながら、皮膚損傷治癒過程における EPC の動態は十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

EPC に着目し、皮膚損傷治癒過程において損

傷部局所での EPC の検出にチャレンジし、EPC の動態を明らかにすると共に、この細胞の動態が皮膚損傷受傷後経過時間判定のための有用な指標となり得るか否かについて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) EPC におけるケモカインレセプターの発現解析

① C57BL/6 マウスから骨髄細胞を採取して、密度勾配遠心法により骨髄単核細胞のみを単離する。単離した単核細胞を 5% 胎児ウシ血清を含む EBM-2 BulletKit medium で 4 から 7 日間培養し浮遊細胞を除去した後、さらに 7 日培養する。

② 培養 EPC から RNA を抽出し、逆転写反応を

行う。続いて、PCR法でケモカインレセプター (CCR1, CCR2, CCR5 及び CXCR4) を検出する。さらに発現が認められたレセプターに対する遊走活性を検討する。

(2) 損傷治癒過程における EPC の動態解析

① ペントバルビタール (腹腔内投与; 50mg/kg) にて、直径 4mm の打ち抜き損傷を計 6 個作製する。

② 経時的に皮膚損傷組織を採取し、EPC の細胞表面抗原に対する異なる 2 組の抗体を組み合わせ (抗 CD34 抗体と抗 Flk-1 抗体および抗 c-kit 抗体と抗 Tie-2 抗体)、フローサイトメーターにより EPC を検出する。

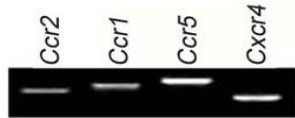
(3) ヒト皮膚損傷試料について、抗 Flk-1 抗体および抗 CD34 抗体を用いた蛍光二重染色で EPC 集積を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) マウス皮膚創傷治癒における EPC 集積とケモカインシグナルについて

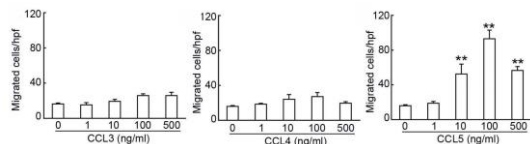
① EPC のケモカインレセプターの発現

培養 EPC について CCR1, CCR2, CCR5 および CXCR4 のケモカインレセプターの発現を認めた。特に、CCR5 は EPC の約 40% と最も高頻度で発現を認めた。



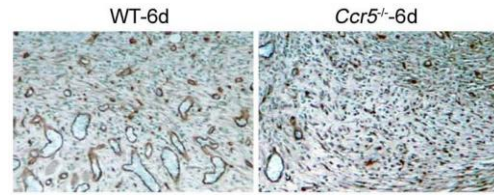
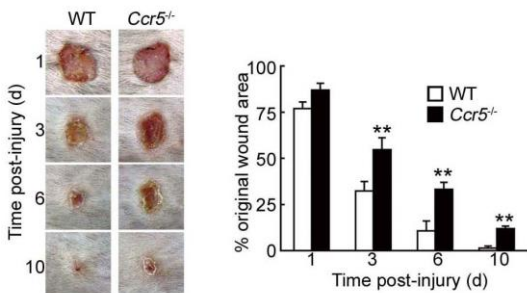
② CCR5 シグナルを介した EPC の遊走

CCR5 のリガンドである CCL3, CCL4, CCL5 の 3 つのリガンドについて EPC の遊走活性を検討したところ、CCL5 についてのみ EPC に対する遊走活性を認めたことから、CCL5-CCR5 のケモカインシグナルが EPC の遊走に重要であることを認めた。

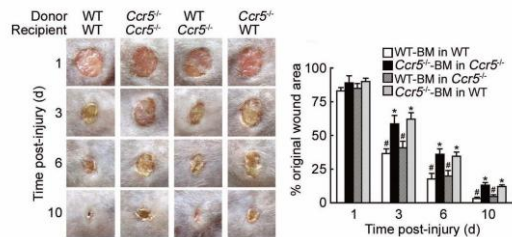


③ 皮膚創傷治癒における CCR5 の役割

CCR5 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して肉眼的に創傷治癒が遅延しており、病理組織学的には血管新生が減弱していた。

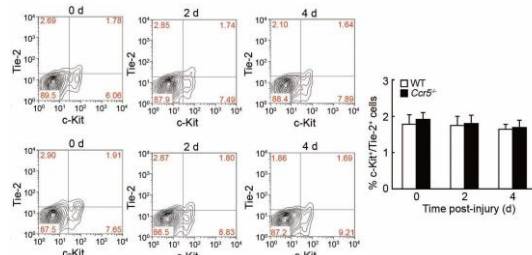


一方、CCR5 遺伝子欠損マウスの骨髄細胞を移植された野生型マウスでは、CCR5 遺伝子欠損マウスと同様に血管新生が減弱し、創傷治癒が遅延していた。逆に野生型マウスの骨髄細胞を移植された CCR5 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと同程度に創傷治癒が回復していた。



④ マウス皮膚創傷部における EPC 集積

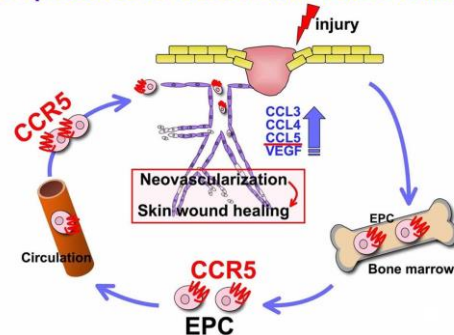
皮膚創傷部における EPC 集積をフローサイトメトリーで検索したところ、CCR5 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて、EPC 集積が有意に減少していた。



⑤ まとめ

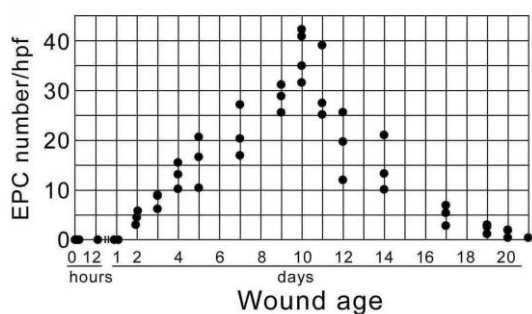
マウス皮膚創傷治癒では、骨髄由来の EPC が血管新生に関与しており、その EPC の遊走には CCL5-CCR5 を介したケモカインシグナルが重要であることが明らかとなった。

#### Proposed role of CCR5 in skin wound healing



(2) ヒトの皮膚損傷における EPC 集積と受傷後経過時間判定

受傷後経過時間の判明しているヒト皮膚損傷試料について、抗 Flk-1 抗体および抗 CD34 抗体を用いた蛍光二重染色で EPC 集積を検討したところ、受傷後 1 日以下の皮膚損傷では EPC は検出されず、受傷後 2 日目の損傷から EPC の検出が可能となった。さらに、任意に選択された 10 視野の EPC の平均合計が 25 個以上であれば、受傷後 9 から 11 日であることを示唆した。以上のことから、EPC の検出が皮膚損傷の受傷後経過時間推定に有用であることが明らかとなった。



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 4 件)

1. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest*. 査読有 2012;122:711-721. doi: 10.1172/JCI43027.
2. Kimura A, Ishida Y, Inagaki M, Nakamura Y, Sanke T, Mukaida N, Kondo T. Interferon- $\gamma$  is protective in cisplatin-induced renal injury by enhancing autophagic flux. *Kidney Int*. 査読有 2012; 82:1093-1104. doi: 10.1038/ki.2012.240.
3. Lu P, Li L, Liu G, Baba T, Ishida Y, Nosaka M, Kondo T, Zhang X, Mukaida N. Critical role of TNF- $\alpha$ -induced macrophage VEGF and iNOS production in the experimental corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53:3516-3526. doi: 10.1167/iovs.10-5548.
4. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and

VEGF expression in mice. *J Clin Invest*. 査読有 2011; 121: 2911-2920. doi: 10.1172/JCI40782.

[学会発表] (計 10 件)

1. 近藤稔和, 石田裕子. 皮膚創傷治癒の分子メカニズム-Part1: サイトカインのシグナルクロストークについて. 第 42 回日本創傷治癒学会, 札幌, 2012.12
2. 近藤稔和, 石田裕子. 皮膚創傷治癒の分子メカニズム-Part2: 骨髄由来前駆細胞の役割について. 第 42 回日本創傷治癒学会, 札幌, 2012.12
3. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. Essential role of CX3CR1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of bone marrow-derived fibrocyte infiltration. 10th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, Geneva, Switzerland, 2012.9
4. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Kawaguchi T, Hama M, Abe M, Eisenmenger W, Kondo T. Detection of endothelial progenitor cells in human skin wounds and its application for wound age determination. 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Verbindung mit 1st Symposium on Interpersonal Violence in Social Proximity, Freiburg, Germany, 2012.9
5. Kondo T, Ishida Y, Mukaida N. Pathophysiological roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chemical-induced skin carcinogenesis. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012.9
6. Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Kimura A, Kondo T. Forensic pathological study on dynamics of intrathrombus IFN- $\gamma$  for age determination of intravenous thrombi. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM2012), Istanbul, Turkey, 2012.7
7. 近藤稔和, 石田裕子, 木村章彦, 國中由美, 松島綱治, 向田直史. The essential involvement of CCR5 in EPC recruitment during skin wound healing. 第 33 回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.7.
8. 石田裕子, 木村章彦, 野坂みずほ, 國中由美, 川口真理子, 近藤稔和. Pivotal role of the CCL5-CCR5 axis for recruitment

of endothelial progenitor cells in wound healing. 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 静岡, 2012. 6

9. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 川口真理子, 國中由美, 近藤稔和. A role of IFN- $\gamma$  in the pathogenesis of pressure overload-induced heart failure. 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 静岡, 2012. 6
10. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. Experimental Biology 2011, Washington D.C., Amereica, 2011.4

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 海洋深層水を原料とする外用剤  
発明者: 溝口 訓弘, 常山 幸一, 八田 秀樹, 小泉 桂一, 齋藤 勝彦, 赤津 裕康, 近藤 稔和, 水上 惟文  
権利者: 五洲薬品株式会社, 公立大学法人和歌山県立医科大学  
種類: 特許権  
番号: 特許第 5207048 号  
取得年月日: 平成 25 年 3 月 1 日  
国内外の別: 国内

[その他]

近藤稔和: 「皮膚の傷治療 幹細胞で素早く」  
日本経済新聞, 2012. 1. 16

**皮膚の傷の治療  
幹細胞で素早く**  
和歌山県立医大など解明

和歌山県立医科大学の近藤稔和教授と金沢大の向田直史教授らは、骨髄で作られ血管のもととなる幹細胞が傷ついた皮膚を素早く治すのに役立つことを突き止めた。寝たきりの患者などに多い床ずれや、糖尿病が原因で起る皮膚の傷などの早期治療につながる成果だ。

米医学誌ジャーナル・オブ・クリニカル・インベストイゲーション(電子版)に掲載された。傷ついた皮膚では血管が新しくでき、栄養分などを運び傷の修復を促す。この際、骨髄の中にある「血管内皮前駆細胞」が移動して血管に成長するが、患部にとどまらずに骨髄に集まるか未解明だった。

研究チームはこの前駆細胞の表面にある「CCR5」と呼ぶタンパク質「CCR5」の働きで、前駆細胞を患部に呼び寄せた。この仕組みを調節できれば、皮膚の傷を素早く治せる可能性がある。

R5」というたんばく質に着目。この物質を作れなくした遺伝子欠損マウスは、皮膚の傷の治るスピードが通常の約半分に下がるのをみつけた。欠損マウスは前駆細胞の患部への集まり具合も約半分にとどまっていた。

正常マウスの骨髄を欠損マウスに移植すると、傷の治り方も通常に戻った。CCR5に結合するたんばく質「CCR5」の働きで、前駆細胞を患部に呼び寄せた。

研究者番号: 70251923

(2)研究分担者

木村 章彦 (KIMURA AKIHIKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60136611  
石田 裕子 (ISHIDA YUKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10364077

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 稔和 (KONDO TOSHIKAZU)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授