

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791922

研究課題名(和文) マウス発生過程の皮膚創傷治癒における様式変化の要因の検討

研究課題名(英文) The factors modulating type of skin wound healing in fetal mice

研究代表者

鳥海 正博(Toriumi, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20528210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類の胎生早期においては、皮膚損傷後に瘢痕を残さず再生することが知られているが、そのメカニズムの詳細については不明である。本研究では、胎生中期から後期にかけて、創傷治癒過程における血管およびリンパ管の新生様式がどのように変化するかに注目して検討を行った。胎生15日目以前には明らかな管腔構造をもつ血管やリンパ管構造が乏しく、創傷治癒過程においても同様であった。また、胎生15日目以前に創部へ集積するマクロファージはそれ以降のものと比較して大型であり、表面抗原にも相違を認めた。このことから胎生早期の創部では性質の異なるマクロファージが他の機能を補完している可能性が推測された。

研究成果の概要(英文)：In mammals, type of skin wound healing drastically change in the middle stage of fetus, from fetal-type regeneration into adult-type scarring, but underlying mechanism is yet to be elucidated. Here we focused on angiogenesis and lymphangiogenesis during wound healing process, using fetal skin wound healing model. Before embryonic day 15, there were seldom vessels and lymphatic vessels forming tube-like structures. We also found that the macrophages before embryonic day 15 were larger in size compared to the ones in later stage, and the proportion of cells expressing LYVE-1 was higher in earlier stage. These results suggest that they have some unique ability in skin wound healing and contribute to skin regeneration.

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：再生医学

1. 研究開始当初の背景

癒痕形成は現代医学上の大きな課題の一つである。傷跡として整容面で問題になるのみでなく、癒痕拘縮は身体機能を傷害し ADL を低下させる。また強皮症、肺線維症、肝硬変など生命予後を左右する重篤な疾患も癒痕形成や線維化と大きくかかわっている。再生医療の隆盛に伴って、癒痕形成に対する注目度は年々高まっている。

皮膚が全層にわたり損傷を受けると癒痕が形成される。しかし、哺乳類の胎生早期には癒痕を残さずに再生することが知られている。つまり、胎生中期から後期にかけての数日間に fetal-type から adult-type の癒痕様式へ大きな変化が起こる。

当教室ではこれまでに、マウス胎仔背部皮膚に全層切開創を作成し癒痕過程を観察することができる創傷癒痕モデルを開発した。本モデルを用いて観察を行い、マウスの発生に伴っていくつかの形態的变化が連続して起こることが分かった。まず、胎生 13 日までの胎仔背部皮膚に長さ 2mm の全層切開創を作成すると、24 時間以内に創は癒し、表皮の紋理も含めて皮膚が完全に元通りの構造をとるようになる。つまり、完全な皮膚の再生が起こる。しかし、胎生 14 日目の胎仔に同様の処置を行うと、表皮の紋理が乱された状態で癒し、完全な再生は起こらないことが分かった。また、胎生 16 日目以前では癒後の創部に毛包などの皮膚付属器が再生するのに対して、17 日目以降では癒痕組織で置換され、皮膚付属器が再生しなくなることが分かった(研究の方法: 図 1)。

このような癒痕様式の変化が起こる原因としては複数のメカニズムが想定されている。当教室の藤井らは創傷に伴う炎症反応の変化に着目し、特に好中球の創部への集積と癒痕形成との関連について研究を行っている。また、Ferguson らは TGF- β 3 の発現が胎生中期以降消失することから、これが癒痕抑制のために必要と考え臨床応用を試みた(Lancet, 2009 年)。このほかにも、創傷部位における線維芽細胞やケラチノサイトの増殖や遊走能、細胞外マトリックスの組成の変化、炎症反応の強弱とタイプ、血管やリンパ管新生の様式など様々な変化が発生に伴って起こると考えられるが、その詳細についていづれも不明な点が多く、十分に解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、胎生中期までの創傷部位においてリンパ管が比較的豊富に形成される点に着目し、特に発生に伴う血管およびリンパ管構造の変化に着目して皮膚再生との関連を検討することを目的とする。

これにより皮膚再生のメカニズムの一端を明らかにすることができれば、それを出生後の創傷癒痕に応用することにより癒痕形成を抑制する治療方法の開発に寄与するこ

とができると考えられる。更には、皮膚の過剰な線維化を特徴とする肥厚性癒痕・ケロイドや他臓器の線維化を主体とする疾患に関する新たな知見が得られる可能性もあると考えている。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔の皮膚創傷癒痕モデル

これまでの研究で我々が開発したマウス胎仔皮膚創傷癒痕モデルを主に用いて研究を行う。

妊娠 13 日目~17 日目の母体マウスに吸入麻酔薬による麻酔をかけて鎮静・鎮痛を行う。下腹部に縦 1cm の長さで開腹し、切開創より子宮を体外へ引き出す。子宮壁を通して透見される胎仔の側腹部の子宮壁、羊膜を小さく切開し、胴部からマイクロ鉗を用いて胎仔側腹部に長さ 2mm の皮膚全層切開創を作成する。9-0 ナイロン糸で羊膜および子宮壁を縫合し、腹腔内へ還納する。

同様の操作を繰り返し、数匹の胎仔に全層切開創を作成する。母体マウスの腹膜および皮膚を 5-0 ナイロン糸で縫合し閉創する。

術後、技術的な問題がなく手術操作が終了した場合には、8 割以上の胎仔が生存可能であることが分かっている。胎仔の創傷は 24 時間程度で上皮化が完了し癒する。

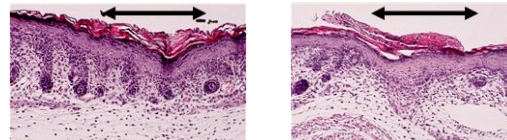


図 1. マウス胎生期の皮膚創傷癒痕

左図(胎生 16 日目マウス創傷作成後 72 時間)では創傷作成部位にも毛包が再生しているのに対して、右図(胎生 17 日目マウス創傷作成後 72 時間)では創傷作成部に一致して毛包が再生せず癒痕組織に置換されている。

(2) 創傷部組織の観察

胎仔手術を行った胎仔について、一定時間経過後に組織の回収を行う。回収した組織は 4% パラフォルムアルデヒドで固定後に凍結切片を作成、あるいは whole mount 染色により免疫組織染色を行う。

凍結切片の作成にあたっては創部組織を含む胎仔を 4℃、overnight で固定し、その後 20% スクロースを 6 時間浸透させる。OCT compound に包埋し、ドライアイス上で凍結させる。cryostat を用いて、皮膚と垂直な断面の創部を切り出し、厚さ 8 μ m の切片を作成する。炎症細胞(好中球、マクロファージ、リンパ球)、血管(CD31)、リンパ管(LYVE-1)などに対する抗体を用いて免疫染色を行い創部組織の解析を行う。

創部組織の whole mount 染色を行うにあたっては、創傷作成後の胎仔を回収後に創部皮膚組織を顕微鏡視下に切り出し、皮膚および皮下組織のみ分離する。これを 4℃、

overnight で固定後、triton-X100 を含む緩衝液中で切片の免疫染色と同様に各抗体を用いて染色を行う。いずれも共焦点顕微鏡で創部組織を観察・解析する。

(3) 創部組織のフローサイトメトリー

胎生 13 日目～生後 1 日目の胎仔および新生仔について、創傷作成後 24 時間の時点で創部組織を回収し、皮膚および皮下組織（直径 4mm 程度）を切りだす。これを PBS で洗浄後、コラゲナーゼおよびディスパーゼを加えて 37、30 分消化する。分解された組織をピペティング後に 40µm フィルターでフィルタリングし、個別の細胞に分解して回収する。蛍光色素でラベリングされた各種抗体を用いて細胞を染色し、FACS により創部組織に存在する炎症細胞の解析を行う。

(4) 創部組織における遺伝子発現解析

胎生 13 日目～生後 1 日目の胎仔および新生仔について、創傷作成後 24 時間の時点で創部組織を回収し、皮膚および皮下組織（直径 4mm 程度）を（3）と同様に切り出す。剪刀を用いて組織を細断した後、RNeasy Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出する。抽出した RNA を cDNA に変換後、PCR により各種遺伝子の発現を解析する。

4. 研究成果

(1) 胎仔創部組織の免疫染色による解析

胎生 13 日目～生後 1 日目の胎仔および新生仔の創部組織を回収し、凍結切片を作成して炎症細胞および血管/リンパ管に関する免疫染色を行った。

胎生 13 日目から既に創部へ F4/80 陽性のマクロファージが盛んに集積している様子が観察された。胎生 13 日目および 15 日目と比較して、胎生 17 日目以降の組織に集積するマクロファージはより小型であった。また LYVE-1 陽性のマクロファージは胎生 15 日目以前では高率であったが、胎生期の進行とともに減少する傾向があった。（図 2）

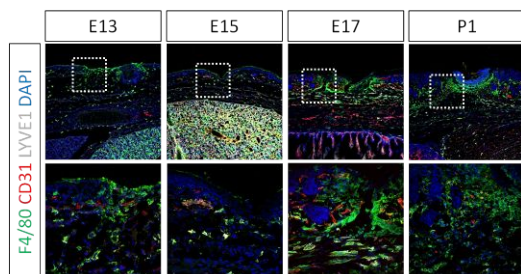


図 2. 胎仔および新生仔創部の解析
胎生 13 日目から創部へ F4/80 陽性のマクロファージが集積している様子が観察される。これらの結果から、胎生中期以前に創部へ集積するマクロファージと、それ以降のもの

とでは性質が異なる可能性が示唆された。

また、胎生 13 日目および 15 日目の創部組織においては、皮下浅層までの組織には明らかな管腔構造を呈する血管やリンパ管は認められず、胎生期の進行に伴って組織の厚みが増すとこれらが形成されるようになることが考えられた。胎仔期皮膚においては角化層がほとんど形成されていないことが分かっているが、上記の所見とあわせて、胎生中期以前の皮膚創部組織においては、羊水の浸透などにより周囲組織から栄養が供給され、創傷治癒過程が進行すると推測された。

(2) FACS による胎仔創部組織炎症細胞の解析

胎生 13 日目～死後 1 日目の胎仔および新生仔について、創傷作成後 24 時間の時点で創部組織を回収し、皮膚および皮下組織に集積する炎症細胞の解析を行った。創傷治癒急性期において集積する炎症細胞の主たるものは、好中球およびマクロファージである。胎生期の創部における特徴をしらべるために FACS による解析を行った。図 3 に示す通り、胎生 15 日目以前の創部組織においては Gr-1 陽性の好中球が集積せず、マクロファージのみが集積することが分かった。胎生 17 日目以降になると盛んに好中球が集積することが分かった。

創部へ集積するこれら炎症細胞のプロファイルの相違が、治癒結果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、胎生中期以前には明らかな管腔構造を呈する血管やリンパ管がほとんど認められない事がこれら炎症細胞の集積の違いの原因となっていることが推測された。

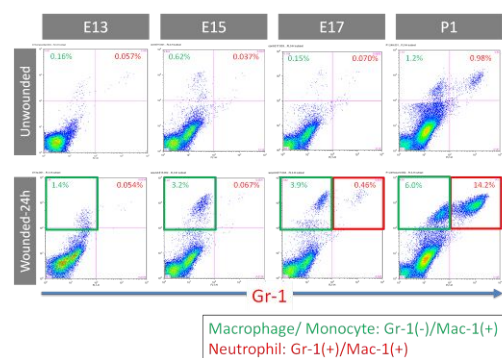


図 3. 創部へ集積する炎症細胞の FACS による解析

胎生 15 日目以前の創部へ集積する炎症細胞はほとんどがマクロファージであるが、胎生 17 日目以降になると好中球が盛んに集積するようになることが分かる。

(3) 胎仔創部組織の whole mount 染色による解析

胎生 13 日目、胎生 15 日目の創部組織を回収し、whole mount 染色により創部における血管新生および炎症細胞集積の様子を観察した。

図 4 に示す通り、創縁を観察すると、皮下深層より F4/80 陽性のマクロファージおよび PECAM-1 陽性の血管内皮細胞が集積し、肉芽組織を形成している様子が観察された。

また、創部における血管網の所見から、血管新生は皮下深層から主に創内へ侵入しており、皮膚直下の皮下浅層からの侵入はほとんど認められないことが分かった。これは、胎生期において真皮下血管網の発達が未熟であることと関連していると考えられた。

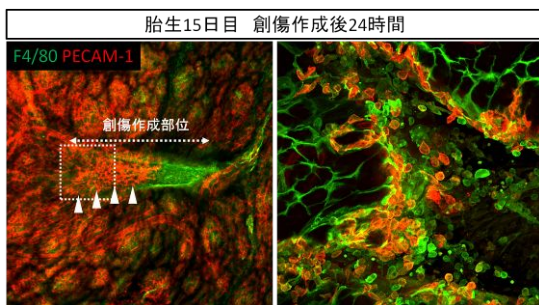


図 4.胎生 15 日目創部組織の whole mount 染色による解析

創縁を観察すると、皮下深層よりマクロファージおよび血管内皮細胞が集積し、肉芽組織を形成している様子が観察される。皮下浅層からの血管形成は少ない。

(4) 胎生期創部組織の遺伝子発現解析

胎生 13 日目～生後 1 日目までの創部組織および創傷を作成していない対照の個体組織を回収して RNA を抽出した。Quantitative RT-PCR により細胞外マトリックスに関連する遺伝子、炎症反応に関連する遺伝子の発現解析を行った。

Mmp-9、Mmp-13 の発現は創部組織で著明に亢進していたが、胎生期の進行による明らかな変化の傾向は示さず、治癒様式の変化との関連は乏しいものと考えられた。

同様に炎症反応の指標となる TNF の発現についても、創部組織において著明に亢進していたものの、胎生期の進行との相関は認められなかった。

また、低酸素環境との関連をしらべるために Hif-1 および Epas-1 (Hif-2) の発現を調べたが、対照組織と比較して創部組織で発現が有意に変化している所見は得られなかった(図 5)。

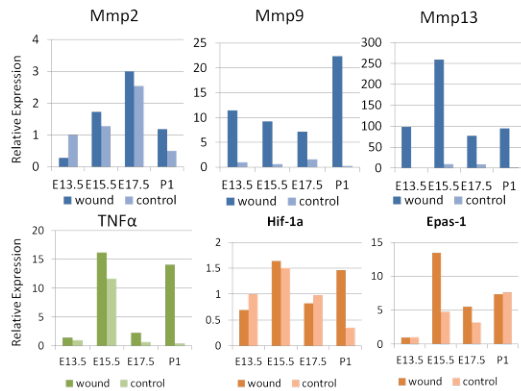


図 5.創部組織における遺伝子発現解析

Mmp-9、Mmp-13、Tnf については創部組織において著明な発現の亢進を認めたが、胎生期の進行(治癒様式の変化)との関連は乏しいと考えられた。

以上の結果より、集積する炎症細胞のプロファイル、および血管やリンパ管の局在については、胎生 15 日目以前と胎生 17 日目以降とで大きな変化が起こっていることが示唆された。

胎生 15 日目以前には明らかな管腔構造を呈する血管やリンパ管構造が乏しく、創傷治癒過程においても同様であった。また、胎生 15 日目以前に創部へ集積するマクロファージは、それ以降のものと比較して大型であり、また LYVE-1 を発現している頻度が高い傾向があった。このことから、胎生 15 日目以前の創部においては、胎生後期以降とは異なる性質のマクロファージが創部へ集積し、他の機能を補完している可能性が推測された。その点については今後さらに検討が必要である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

烏海 正博 (TORIUMI MASAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20528210