

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 8 年 9 月 2 0 日現在

機関番号： 8 2 6 1 0

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2013 ~ 2015

課題番号： 2 5 8 6 1 7 0 0

研究課題名 (和文) 癒痕形成における上皮間葉作用に関する研究

研究課題名 (英文) The study of epithelial-mesenchymal interaction under scarring

研究代表者

今村 三希子 (IMAMURA, MIKIKO)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・形成外科・医員

研究者番号： 5 0 5 9 0 5 2 7

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,300,000 円

研究成果の概要 (和文) : 皮膚組織への周期的伸展刺激によって誘発されたケラチノサイト由来ET1が癒痕形成を促進させるという考えの基に、マウスの創部に周期的伸展刺激を付加する装置を作成した。同システム下に、創部への持続的な周期的伸展刺激を付加した結果、実験群において癒痕組織の幅の増加、弾性線維・膠原線維の増加をみとめ、肥厚性癒痕・ケロイドの形成傾向を確認した。また、実験群における真皮浅層でのET1分泌亢進や、表皮内ケラチノサイトの細胞分裂亢進、癒痕部への炎症細胞遊走の所見から、これらの細胞動態が周期的伸展刺激下での癒痕形成促進に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : It was reported that cyclic extension force change wounds to hypertrophic scar or keloid. Although there was no animal model which made appropriate condition under that cyclic extension force was applied to wounds on the animal body. I have designed the machine which can apply cyclic extension force continuously to mice wounds. Using this machine, wounds on both lateral sides of mice were extended and released for three weeks. Then in experimental group, wounds grew histological condition of hypertrophic scar or keloid. In addition to, I found that inflammatory cells run to the scar site, and keratinocyte in epidermis tend to grow under cyclic extension force.

研究分野： 形成外科

キーワード： 癒痕形成 形成外科 創傷治癒 線維芽細胞 上皮間葉作用 ケラチノサイト エンドセリン1

1. 研究開始当初の背景

(1) 形成外科領域では患者の QOL に大きな影響を及ぼす瘢痕形成の機序や治療法について、さまざまな研究が試みられてきたが、未だ明らかになっていない点が多い。近年では機械力 (mechanical force) その中でも張力が瘢痕形成に及ぼす影響が注目され、張力の刺激による、瘢痕形成下での細胞内外で引き起こされる変化について検討がなされているところである。

(2) 一方で、瘢痕形成の研究に際し、創部に周期的伸展刺激を与える動物モデルは過去に汎用性の高いものがなかった。形成外科領域の研究では、Aarabi S らによる創外固定器を利用したモデル (Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. FASEB J 2007 Oct;21(12):3250-61) や、Chin MS らによるサーボ制御装置を利用した周期的伸展刺激を付加するモデル (Analysis of neuropeptides in stretched skin. PRS 2009 Jul;124(1):102-13) が知られているが、前者は“周期的”な伸展刺激を付加するモデルではなく、後者は装置そのものが大がかりで高価であり、マウスを装置と連結させておかななくてはならないため、24~72 時間の装用が限度であり、数週間単位での研究は困難であった。マウスの活動を損ねることなく、生理的な瘢痕形成過程に近似した伸展刺激を周期的に付加するモデルがあれば、より理想的であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 「ケラチノサイトから分泌されるエンドセリン 1 (ET1) が創収縮に影響を及ぼす」、「ケラチノサイトへの周期的伸展刺激が、ET1 の分泌を促進させる」という過去の研究結果をふまえ、ケラチノサイトと線維芽細胞の相互作用 (上皮-間葉相互作用) を介した物理的刺激による瘢痕形成の促進に着目し、瘢痕形成に対する機序の解明と新しい治療法の開発を目的とした。

(2) 創部に周期的な伸展刺激を与え、瘢痕形成を促進させる動物モデルの確立を目的とした。モデルは従来のもの比べてより安価に作成可能で、数週間単位での連続した実験が可能であることを必要条件とした。

(3) 動物モデルおよびヒト検体を用いて物理的刺激条件下でのケラチノサイト由来の ET1 の挙動を明らかにし、瘢痕形成の過程におけるケラチノサイト由来 ET1 の寄与についての検証を目的とした。

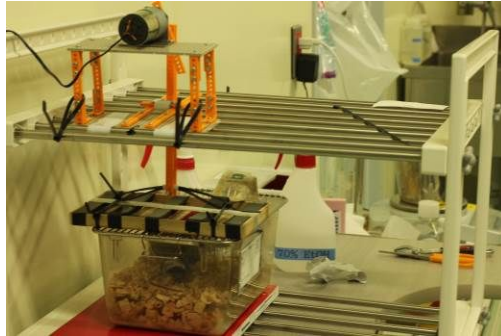
(4) 新しい治療法の開発としては、ET1 が瘢痕形成に影響を及ぼすという仮定に基づき、すでに肺高血圧症の治療薬として臨床で使用されている、エンドセリン受容体拮抗薬 (一般名: ボセンタン、商品名: トラクリア) の瘢痕形成抑制作用について評価を行い、エンドセリン受容体拮抗薬が抗瘢痕形成的な作用を有するかの検証を最終目的と定めた。

3. 研究の方法

(1) 周期的伸展刺激装置の作成

創部に周期的な伸展刺激を加える手法として、動物内に埋め込んだネオジウム磁石を、体外に設置した磁石で牽引する装置【図 a】を作成した。装置の骨格には市場で簡単に入手できる、機械工作のパーツを利用した。一般的な動物飼育室で使用されるケージ内にマウスを飼育し、ケージ外に装置を設置することで、マウスの活動性を損なうことなく、マウスの創部に周期的な伸展刺激を 2~3 週間連続して付加することが可能であった。

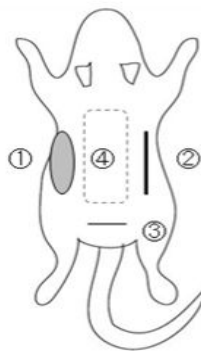
【図 a】周期的伸展刺激装置



(2) 動物モデルの作成

7~8 週齢の B6 オスのマウスを使用した。ドミトール、ミダゾラム、ベトルファール 3 剤混合麻酔薬を腹腔内に投与し、マウスの両側腹部より 10x25mm の皮膚を全層切除【図 b(1)】し、6-0 ナイロン糸で単結節縫合を行った【図 b(2)】。尾部付け根の皮膚小切開【図 b(3)】より、マウスの背部正中に皮下ポケットを作成し、シリコンコーティング・滅菌処理済のネオジウム磁石を埋め込み四隅を背部皮膚と縫合固定した【図 b(4)】。

【図 b 動物モデルのシェーマ】



(3) 実験プロトコル

手術から 4 日目に抜糸し、創部の癒合を確認した上で実験開始した。3 週間連続して周期的伸展刺激を創部に付加した。伸展刺激の周期はおおよそ 20 回/分、強さは 0.2N であった。刺激付加終了後、創部を含めた皮膚を採取し、組織学的な評価 (ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・ワンギーソン染色、各種免疫染色) を行った。

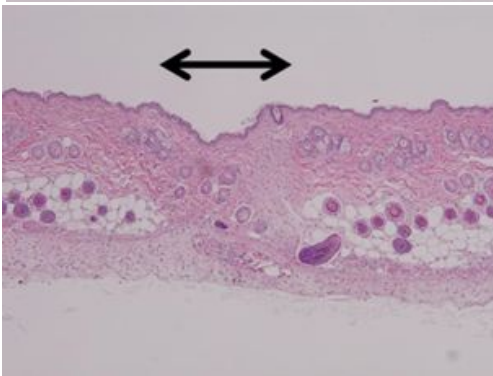
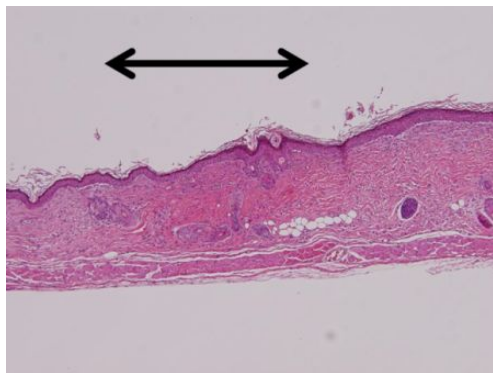
4. 研究成果

(1)動物モデル(マウス)の創部に対して3週間持続して周期的な伸展刺激を付加した結果、癒痕形成が促進される傾向を確認した。同装置は、比較的安価に、用意に入手できる材料で作成でき、なおかつ小規模であるという点で、過去に報告されている動物に対する伸展刺激負荷モデルとは、一線を画する。研究期間内に装置を2つ作成し、40x50x40(cm)のスペースで2匹のマウスに同時に伸展刺激を付加することが可能であった。本システムでは動物へ過剰なストレスを与えることなく、数週間単位での実験が可能であり、今後の当分野の研究において、幅広く応用できる可能性を有する。

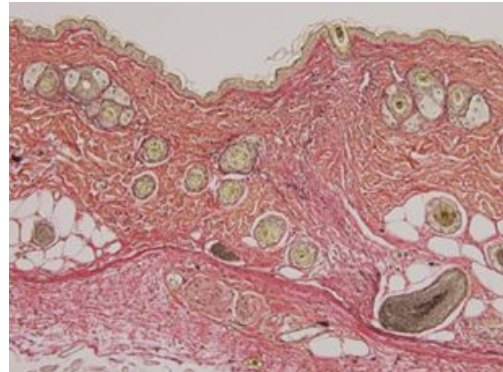
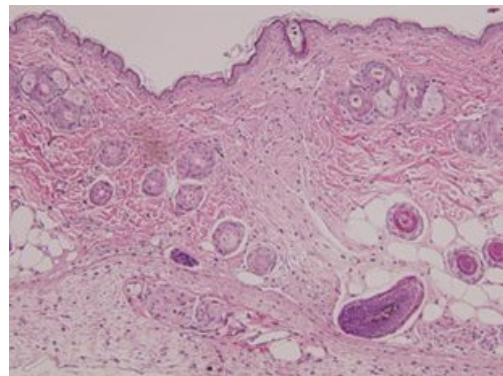
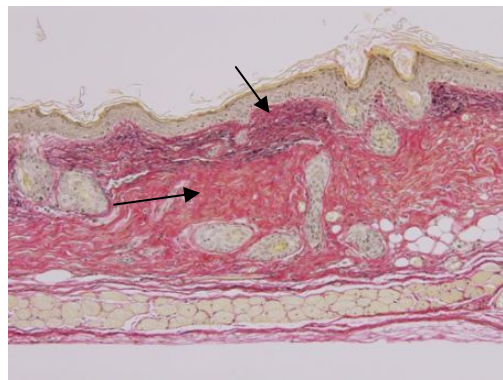
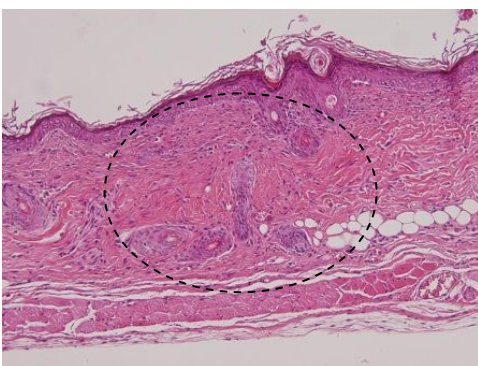
(2)周期的伸展刺激付加の結果、実験群において、癒痕組織の幅の増加【図c】、弾性線維・膠原線維の増加【図d】が見られた。採取組織の一部では渦巻き状に増殖する膠原線維をみとめ、肥厚性癒痕・ケロイドに近い病態を呈していた。

このような癒痕形成傾向が複数の例でみとめられ、実験の再現性が確認できた。

【図c】上：実験群 下：対照群

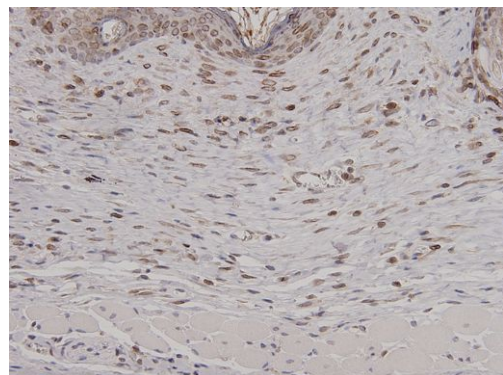


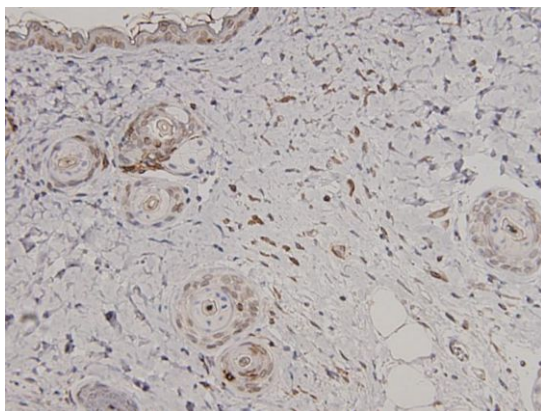
【図d】上2枚：実験群 下2枚：対照群



加えて、CD45 免疫染色により、実験群では表皮内ケラチノサイトの細胞分裂亢進、癒痕部への炎症細胞遊走の所見がみられた【図e】。これらの細胞動態が周期的伸展刺激下での癒痕形成促進に関与することが示唆されたが、確たる裏付けのためにはリアルタイムPCR などの細胞組織の定量評価が必要である。

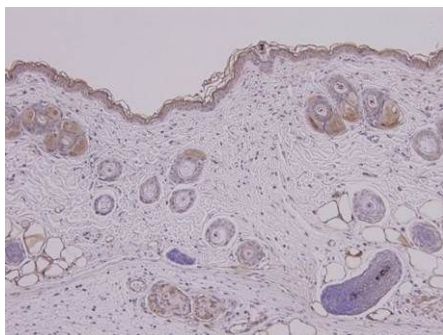
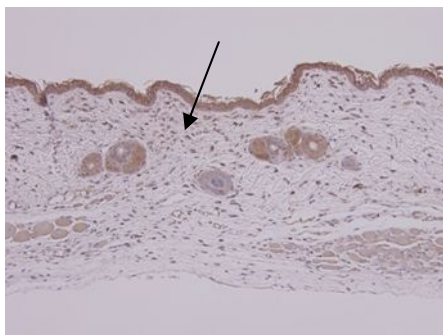
【図e】上：実験群 下(次頁)：対照群





in vitro の先行実験では、周期的伸展刺激付加下での培養細胞における、ケラチノサイト由来のエンドセリン 1(ET1)上昇が明らかになっている。また一方で周期的伸展刺激によりケラチノサイトから分泌された ET1 により、線維芽細胞含有コラーゲンマトリクスの収縮が促進される結果が得られている。また、今回 in vivo の実験において、周期的伸展刺激を加えた創部組織内では、表皮近傍の層に ET1 が増加する傾向がみられた【図 f】。これらの知見に基づき、周期的伸展刺激下でのケラチノサイトの動態、ET1 の瘢痕形成に及ぼす影響についての詳細な分析を行う計画であったが、実験の再現性の確認や、実験条件の最適化を優先的に取り掛かったため、ウエスタンブロッティング・リアルタイム PCR 等、細胞動態の定量的な解析については未着手である。研究者は後続の研究計画として、「周期的伸展刺激による瘢痕形成動物モデルの構築と装置の実用デバイス化」を立案し、研究費を既に獲得している。これまでに達成できなかった項目については、今後も引き続き研究を継続する所存である。

【図 f】上：実験群、下：対照群



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 1 件)

日本形成外科学会基礎学術集会(2015 年 10 月 9 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

今村 三希子 (Imamura Mikiko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・形成外科・医員

研究者番号：50590527

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：