

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11380

研究課題名(和文) KIAA1199の皮膚・創傷における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of KIAA1199 in skin wound healing

研究代表者

荒牧 典子 (ARAMAKI, Noriko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80365311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、新規ヒアルロン酸分解酵素であるKIAA1199のノックアウトマウスを用いた成獣および胎仔創傷治癒過程を検討することで、皮膚・皮膚創傷におけるKIAA1199の機能解析を行うこととした。創傷治癒過程におけるKIAA1199の機能解析を行った報告はこれまでになく、今回の我々の研究結果から、KIAAの欠損が創傷治癒過程、特に癒痕形成期に影響を与えることが示唆された。今回の研究では、血管新生についての検討がまだなされていないため、今後解析の必要があると考えているが、今後癒痕抑制などの治療応用への可能性が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性創傷や癒痕は、形成外科分野での解決すべき臨床課題である。今回の我々の研究成果からKIAA1199が創傷治癒過程や癒痕形成期に関与していることが示唆され、またその抑制が癒痕形成の抑制につながる可能性が示された。今後研究を進めていくこと行くことで、将来的な臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyze the function of KIAA1199 in skin and cutaneous wounds by investigating the healing process of adult and fetal wounds using knockout mice of the new hyaluronan degrading enzyme KIAA1199. There have been no previous reports of functional analysis of KIAA1199 in the wound healing process, our data suggested that KIAA deficiency affects the wound healing process, especially the stage of scar formation. Since we have not conducted research on angiogenesis in this study, it is thought that future analysis is necessary, but it is expected to be applied to treatments such as scar management in the future.

研究分野：創傷治癒

キーワード：ヒアルロン酸 創傷治癒 癒痕 KIAA1199

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生体におけるヒアルロン酸は、皮膚真皮や軟骨に多く存在することが知られ、ヒアルロン酸の産生・代謝は、生体内で重要な役割を果たしていると考えられている。皮膚では、胎仔創傷治癒過程の scarless wound healing の一因として、高濃度のヒアルロン酸の存在が報告されている (Kishi K. et al. *Keio J Med.* 2012)。また通常マウスと同じ大きさでありながら、長寿であり、がん化耐性の能力を持っているハダカデバネズミは、ヒアルロン酸が沈着していることがその理由との報告もなされており (Tian X. et al. *Nature.* 2013)、ヒアルロン酸の産生・代謝は大きな注目を集めている。

これまで、生体内のヒアルロン酸の分解には、ヒアルロン酸受容体 (CD44) やヒアルロン酸分解酵素 (hyaluronidase:HYAL1-3) などの分子が重要な役割を果たすことが報告されているが、ヒト線維芽細胞を用いた実験系で、KIAA1199 遺伝子を抑制したところ、ヒアルロン酸分解が著明に低下し、この低下はこれまで知られていた HYAL とは無関係に起こることが報告された (Yoshida H. et al. *PNAS.* 2013)。KIAA1199 は、もともと内耳で高発現し、非症候性先天性難聴患者で遺伝子変異が報告された遺伝子である (Abe S. et al. *J Hum Genet.* 2003)。ヒトの線維芽細胞のみならずヒト正常皮膚組織でその発現が認められ、KIAA1199 分子は HYAL などの他のたんぱく質とのアミノ酸配列の相同性を示さず (Csoka A.B. et al. *Matrix Biol.* 2001)、様々な分子量のヒアルロン酸と特異的に結合する (Yoshida H. et al. *FASEB Open Bio.* 2014)。

KIAA1199 の疾病への関わりとして、ヒト関節液中のヒアルロン酸分解を担い、関節リウマチ患者の滑膜細胞や滑膜組織では健常人に比べ KIAA1199 の発現が亢進しているという報告 (Yoshida H. et al. *PNAS.* 2013) や、胃がんや大腸がんでの高発現が報告されている (Matsuzaki S. et al. *Ann Surg Oncol.* 2009, Birkenkamp-Demtroder K. et al. *Br J Cancer.* 2011)。しかし、皮膚創傷治癒過程や癒痕などの病的状態において、その発現がどのように変化し、機能を持つか否かの報告はこれまでない。

そこで、今回我々は、KIAA1199 ノックアウトマウスを用いた成獣および胎仔創傷治癒過程を検討することで、皮膚・皮膚創傷における KIAA1199 の機能解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、2013 年にヒアルロン酸分解に関与する新たな分子であることが報告された KIAA1199 が、創傷治癒過程や癒痕形成においてどのような意義をもたらすのかを検討する。これまで、生体内のヒアルロン酸の分解には、ヒアルロン酸受容体 (CD44) やヒアルロン酸分解酵素 (hyaluronidase:HYAL1-3) などの分子が重要な役割を果たすことが報告されているが、これらの系を介さない新たなヒアルロン酸分解を司る KIAA1199 分子が報告された (Yoshida H. et al. *PNAS.* 2013)。そこで我々は、KIAA1199 ノックアウトマウスを用い、創傷治癒モデル (成獣および胎仔) を作成・検討し、更にヒトの癒痕やケロイド組織を用いた KIAA1199 の発現検討を並行して行い、皮膚や創傷治癒における KIAA1199 の役割を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) KIAA1199 ノックアウトマウス (KIAAKO) における胎仔創傷治癒過程の検討

#### 創傷の作成及び組織採取

KIAAKO マウス妊娠 13, 15, 17 日及び wild type (WT) マウス妊娠 15, 17 日に対して、イソフルレン吸入麻酔下において開腹術を行った。子宮、羊膜を切開後、マイクロサージャリー手術用剪刀を用い、各々の発生段階の胎仔背部に長軸方向に沿った皮膚全層切開創を作成し、その後、妊娠 13 日マウスに関しては羊膜のみ縫合、妊娠 15, 17 日マウスに関しては、子宮壁を含めて縫合する。また創傷作製直後、創傷部に DiI 蛍光色素を塗布することで、採取時に創部を同定することができるようにした。創傷作成 72 時間後に胎仔を回収し、実体顕微鏡下で創部の観察を行った。胎生 17 日は創傷部背部皮膚を採取し、4% PFA 固定後パラフィン包埋し、パラフィン切片を作成した。

### (2) KIAAKO マウスにおける成獣創傷治癒過程の検討

#### 創傷の作成及び組織採取

生後 8 週齢のオス KIAAKO マウスと WT マウスの背部皮膚を除毛後、左右に直径 5mm の全層皮膚欠損を作成し、フィルム保護し湿潤環境で創傷治癒過程を観察した。創傷作成日を day0 として day1, 4, 7, 10 の創傷治癒過程を写真に記録した。また、day4, 7, 10, 14 において、組織を回収し、4% PFA 固定後パラフィン包埋し、パラフィン切片を作成した。

#### 創収縮評価

記録した写真は縮尺を合わせ、image j software にて創傷部分の面積を測定した。Day0 の面積を 100% として、day1, 4, 7, 10 にての創収縮率 (%) を算出した。

Dermis	
A.Collagen fiber orientation	
0	Normal basket-weave pattern
1	< 25% abnormal
2	26 - 50% abnormal
3	51 - 75% abnormal
4	76 - 100% abnormal
B.Collagen fiber density	
0	normal fiber bundle density
1	< 25% abnormal
2	26 - 50% abnormal
3	51 - 75% abnormal
4	76 - 100% abnormal
C.Collagen fiber maturity	
0	normal fiber bundle density
1	< 25% abnormal
2	26 - 50% abnormal
3	51 - 75% abnormal
4	76 - 100% abnormal
SCORE RANGE: 0-12	

### 創部の組織学的評価

Day14 における両群の切片を Hematoxin-Eosin(HE)染色、Masson trichrome(MT)染色、Elastica van Gieson(EVG)染色を用い、癒痕について評価した。また、定量的な癒痕評価を行うため、Manchester scar scale<sup>10)</sup>を一部修正したスコアリング方法(表1)を用いて、day14のMT染色の切片を用いて癒痕評価をおこなった。スコアリングは、正常部と比べて癒痕部の 膠原線維の向き、細胞密度、組織の成熟度(膠原線維が網状に形成されているか)の3点をスコアリングしているものである。

### 免疫染色

抗  $\alpha$ SMA 抗体、抗 Hyaluronan Binding Protein(HABP)抗体にて染色を行い、創傷部を1サンプルにつき4箇所20倍でランダムに撮影し、 $\alpha$ SMA 陽性の紡錘形細胞数をカウント、比較検討をおこなった。

表1 Modified Manchester Scar Scale

## 4. 研究成果

### (1) KIAAKO マウスおよび WT マウスにおける胎仔創傷治癒過程の検討

#### 胎生 13 日-72 時間後

これまでの報告<sup>1)</sup>から胎生 13 日以前の創傷は傷跡を残さず治癒することが報告されており、観察を行った。KIAAKO 胎仔創傷も 13 日では傷跡を残さず、治癒していた(図1)。

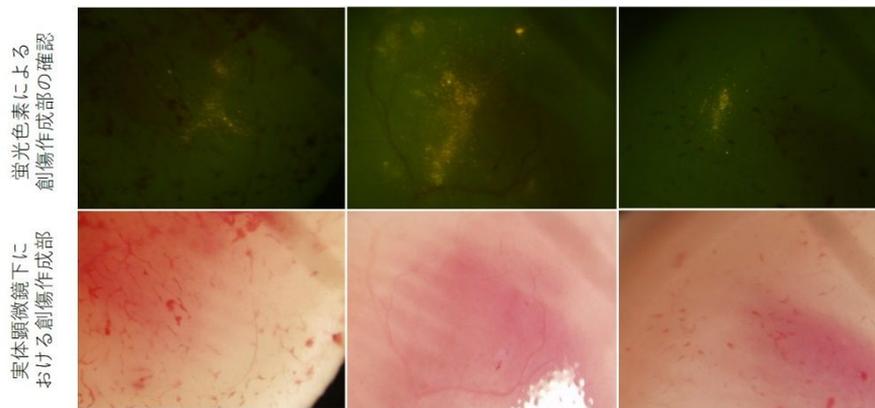


図1 KIAAKO マウス胎生 13 日創傷作成後 72 時間後の創部

#### 胎生 15 日-72 時間後

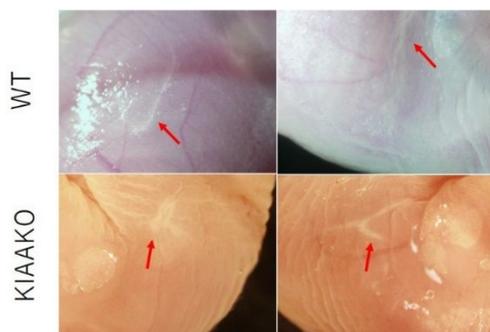


図2 胎生 15 日創傷作成後 72 時間後の創部  
(上段: WT マウス, 下段: KIAAKO マウス)

KIAAKO マウス、WT マウスともに肉眼的に創傷(赤矢印)を確認することができ、明らかな差は認めなかった(図2)。

## (2) 成獣 KIAAKO マウスにおける創傷治癒過程の検討

### 成獣創傷治癒過程におけるマウスの創傷面積の減少について

創傷作成日の day0 での創傷面積を 100%として day1,4,7,10 の創部の面積を相対的に評価した(図3)。Day1 および day4 において、WT に比べ KIAAKO マウスでは創収縮が有意差を持って早い傾向にあった( $p < 0.05$ )が、day7 以降での創収縮に有意差は認めなかった( $n=12$ )。

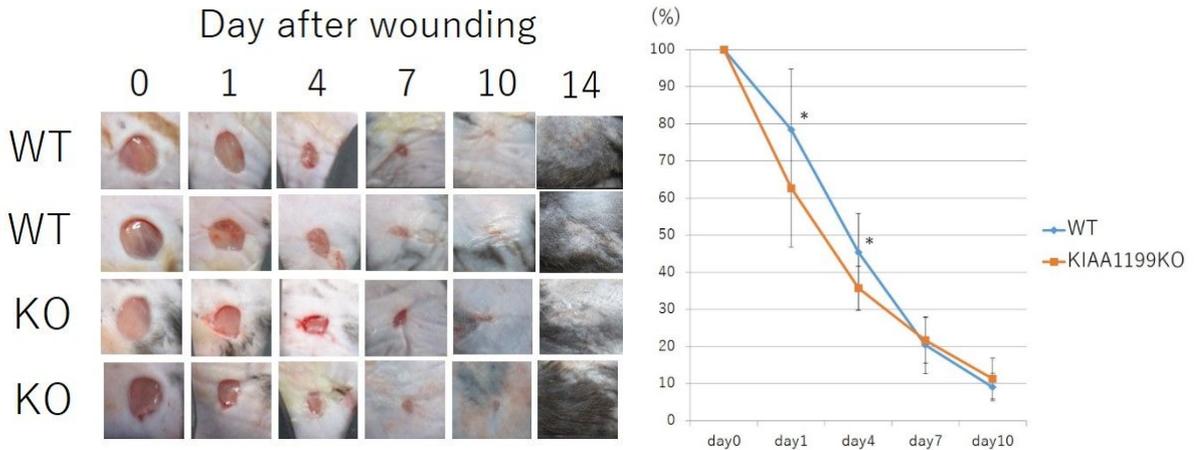


図3 WT マウス(青)および KIAAKO マウス(オレンジ)の創傷治癒比較

### 膠原線維の検討 (MT 染色), Modified Manchester Scar Scale による癒痕評価

MT 染色での比較では、WT マウスに比べ、KIAAKO マウスでは癒痕における細胞数が少なく、膠原線維の配列が正常に近い傾向であった。また、Modified Manchester Scar Scale の結果では、KIAAKO マウス( $n=5$ )ではスコア  $7.2 \pm 2.3$  に対し、WT マウス( $n=6$ )では、スコア  $10.5 \pm 1.73$  と有意差を持って、スコアが低く、癒痕が正常部に近い状態であることが示された

### 弾性線維の検討 (EVG 染色)

KIAAKO マウスでは WT マウスより癒痕が狭く厚みのある印象であったが、ばらつきも多かった。強拡大像では、KIAAKO マウスでは一部に紫黒色に染色された弾性線維が認められたのに対し、WT マウスでは弾性線維の出現が認められなかった。また赤色に染色された膠原線維は、WT マウスでは平行に走行している傾向であるのに比べ KIAAKO マウスでは、蛇行して走行している傾向であった。

### 成獣創傷治癒過程における筋線維芽細胞の発現の比較

Day4,7,10,14 における筋線維芽細胞の発現を検討するため、創部の  $\alpha$ SMA 染色陽性の紡錘形細胞数を比較検討した。Day4 および day7 では WT および KIAAKO 群で有意差はなかったが、day10 では KIAAKO 群における発現が増加して、逆に day14 では KIAAKO 群では発現が減少し、WT 群における発現が増加していた。

### ⑤ KIAAKO マウス及び WT マウスにおけるヒアルロン酸沈着の比較

HABP 染色の結果では、WT マウス、KIAAKO マウスともに正常部に比べ創部での発現が強く認められた。また、day7,10,14 全てにおいて、WT マウスに比べ KIAAKO マウスで発現が強い傾向であった。

創傷治癒過程における KIAA1199 の機能解析を行った報告はこれまでになく、今回の我々の研究結果から、KIAA の欠損が創傷治癒過程、特に癒痕形成期に影響を与えることが示唆された。KIAAKO マウスについてのこれまでの報告では、生存や生殖能に異常は認められないが、長幹骨が WT マウスに比べ短いことが報告されている<sup>11)</sup>。KIAAKO マウスでは、生後 4 週間まで成長板の肥大帯が延長しており、KIAA1199 によるヒアルロン酸代謝が、血管新生や破骨細胞の動員を介して軟骨内骨化に関与していると結論付けているが、皮膚についての言及はない。今回の研究では、血管新生についての検討がまだなされていないため、今後解析の必要があると考えているが、今後癒痕抑制などの治療応用への可能性が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒牧典子、貴志和生
2. 発表標題 ケロイド・肥厚性瘢痕の病態形成 細胞外マトリックスの関与について
3. 学会等名 第61回日本形成外科総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒牧典子、岡部圭介、酒井成貴、貴志和生
2. 発表標題 ケロイド・肥厚性瘢痕組織におけるKIAA1199の発現比較検討
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	貴志 和生  (KISHI Kazuo)  (40224919)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授    (32612)	
研究分担者	下田 将之  (SHIMODA Masayuki)  (70383734)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授    (32612)	