

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770200

研究課題名(和文)哺乳類の成体真皮再生をめざしたマウス胚創傷治癒メカニズムの解明

研究課題名(英文)Wound healing in mammals and amphibians: Toward perfect skin regeneration in mammals

研究代表者

川住 愛子(Kawasumi, Aiko)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：80625484

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)：両生類の皮膚創傷治癒ではPrrx1を発現する再生芽細胞が出現し完全再生する。本研究ではマウス13.5～15.5日胚の創傷治癒で真皮の一部にPrrx1が発現し、それ以降の胚や新生仔・成体ではPrrx1が発現しないことを確認した。この「Prrx1発現を伴う創傷治癒」と「Prrx1発現を伴わない創傷治癒」は、前者では傷口へのマクロファージ集積がほぼ見られず、治癒完了した真皮には癒痕形成が見られなかった。一方、後者では傷口にマクロファージが集積し、治癒完了した真皮に癒痕形成が見られた。さらに、後者でマクロファージを欠損させた場合の創傷治癒を確認するためのクロドロン酸リポソームの投与条件を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Amphibian wound healing, in which blastema cells that express Prrx1 emerge as dedifferentiated cells, leads to a perfect restoration of tissue architecture and function. In this study, I found that mouse embryos at e13.5-e15.5 had a capacity to regenerate dermis after wounding, but wound healing in embryos at e16.5-e18.5 resulted in scar formation, as well as neonates and adults. The regenerating dermis (wounds at e13.5-e15.5) express Prrx1, but the incomplete healing dermis (wounds at e16.5-17.5, neonates and adults) doesn't. In addition, there is a little macrophages in the regenerating dermis, but a lot of macrophages in the incomplete healing dermis.

研究分野：発生生物学

キーワード：創傷治癒 真皮再生 癒痕 マウス胚 マイクロサージャリー

## 1. 研究開始当初の背景

両生類では臓器や四肢などの「器官の再生」が起こる。この現象は古くから多くの研究者の興味を引き、詳細に研究されてきた。その結果、両生類の器官再生において“位置情報の形成”と“位置情報を認識した細胞の分化状態の変化”ならびに“位置情報に基づいた形態形成”が自律的に起こることが分かってきた (Tamura K et al., 2010 Review)。一方、哺乳類はきわめて限定的な再生能力しか持たないため「器官の再生」は厳密には起こらない。哺乳類と両生類の器官再生能力には大きな隔たりがあり、哺乳類に両生類型の器官再生を起こすことは現状では不可能であると考えられてきた。ところが実は、哺乳類でも胎生期の再生能力は成体に比べて非常に高いことが知られており、マウス胚で真皮損傷を伴う程度の深い創傷が形成されても真皮の完全な再生を伴って治癒することが報告されている (McCallion and Ferguson, 1996)。この真皮再生能力は発生が進むにつれて減少し、生後の創傷治癒では失われた真皮が癒痕と呼ばれる繊維状組織に置き換わってしまう。以上のような現象が知られてはいるものの、マウス胚における真皮の完全再生を伴う創傷治癒メカニズムについてはほとんど分かっていないという状況だった。

一方、高い再生能力をもつ両生類の創傷治癒過程については最近研究が進み、傷口に幹細胞様の細胞が現れた後に分泌線などの付属器官や真皮が完全に再生することが明らかになった (Lévesque et al., 2010, Yokoyama H et al., 2011, Seifert et al., 2012)。傷口に出現する幹細胞様の細胞は、四肢や尾など、両生類の臓器・器官再生過程で傷口に現れる脱分化細胞の「再生芽細胞 (blastema)」と非常によく似た性質を有する。両者は単核で丸い形態を示し、転写因子 *Prrx1* を特異的に発現する (Suzuki M et al., 2007, Yokoyama H et al., 2011)。再生芽細胞は再生過程で自律的に分化して臓器・器官の形態形成を行って再生を完遂することが知られているので、恐らく皮膚においても同様の方法で再生を行っているのであろう。すなわち、哺乳類の傷ついた皮膚でも同様の幹細胞様の細胞が出現すれば、両生類型の完全再生が実現できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では両生類であるアフリカツメガエルにおける真皮完全再生を伴う創傷治癒の知見を参考に、アフリカツメガエル、マウス 13.5 日胚、マウス成体の三者で創傷治癒メカニズムを詳細に比較し、最終的にはマウス成体で真皮の再生が可能となる条件を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

受精後 13.5 日以降のマウス胚皮膚に母体内微小手術 (胎盤-母体間の結合を保ったまま

子宮内ならびに子宮外にて胚の手術を行う) で人為的に創傷を形成させ、加えて生後 1 日齢と成体の皮膚に対しても肉眼下での剪刀による創傷形成を行い、マウスの胚から成体までの全ての段階における創傷治癒過程において以下の項目を比較・解析した。

アフリカツメガエル創傷治癒過程の真皮再生細胞では、*Prrx1* 遺伝子の発現と *Prrx1* 遺伝子上流域に存在する種間で高く保存されたエンハンサー (CR1-CR2 領域) の活性化が特異的に見られる。マウス胚から成体の創傷治癒過程においてもこれらの現象が見られるかを確認する。

マウス胚から成体までの全ての段階における創傷が治癒完了した後の皮膚切片を作成し、癒痕の形成が見られるかどうかを「ワンギーソン染色」「I 型ならびに III 型コラーゲンの免疫染色」「走査電子顕微鏡による形態観察」によって確認する。

マウス胚の創傷治癒過程で見られる真皮再生細胞の由来・性質を明らかにする。両生類であるアホロートルの四肢再生にマクロファージが必要であることが報告されたため (Godwin JW et al., 2013)、マウス胚と成体でもマクロファージを欠損させた状態で創傷を形成し、項目 1～3 を確認することでマウスの創傷治癒過程におけるマクロファージの役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

マウス皮膚が作られ始める受精後 13.5 日から 15.5 日の胚に作った傷口で *Prrx1* 遺伝子発現が見られることを確認した。一方、16.5 日以降の胚と生後に作った傷口では *Prrx1* 遺伝子発現が見られないことを確認した。(図 1)

マウス *Prrx1* 遺伝子上流域に存在する種間で高く保存されたエンハンサー (CR1-CR2 領域) を GFP につなぎ Transgene としてアフリカツメガエルに導入すると、創傷治癒部位においてエンハンサーの活性化を示す GFP 発現が見られる (Yokoyama et al., 2011)。しかし同じエンハンサーを Transgene としてマウスに導入すると、マウス胚から成体のいずれの創傷治癒過程においてもエンハンサーの活性化は見られなかった。(図 1) 創傷治癒過程で *Prrx1* 遺伝子発現が見られる時期 (13.5～15.5 日胚) と見られない時期 (16.5～18.5 日胚、新生仔、成体) につけた傷を完全に治癒させると、*Prrx1* 遺伝子発現が見られなかった時期につけた傷を完治させた皮膚でのみ「ワンギーソン染色」「走査電子顕微鏡による形態観察」によって癒痕を確認することができた。マウス成体の創傷完治部位では免疫染色による「I 型コラーゲンの特異的な

集積」を確認することができたが、マウス胚と新生仔の創傷完治部位では無傷の皮膚と同程度のⅠ型/Ⅲ型コラーゲンしか見られなかった。新生仔については「ワンギーソン染色」や「走査電子顕微鏡による形態観察」で癒痕形成が確認されていることより、胚や新生仔の癒痕をⅠ型/Ⅲ型コラーゲンの局在パターンによって判別することはできないことが分かった。

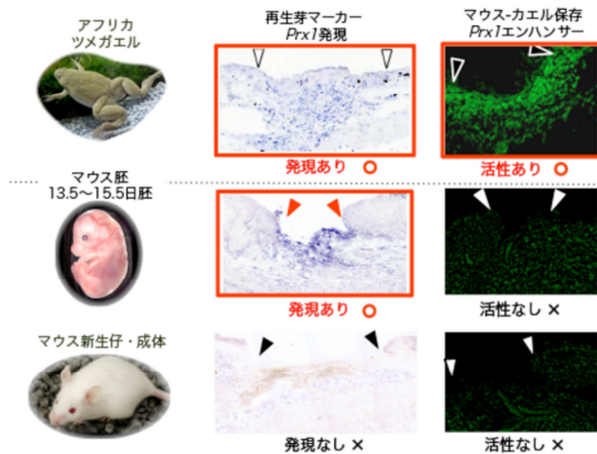


図1 アフリカツメガエル、マウス胚、マウス新生仔・成体における *Prrx1* 発現と *Prrx1* エンハンサー活性

マウス 13.5~15.5 日胚の創傷部位における *Prrx1* 発現細胞がどの組織由来の細胞であるかについて調べるため、組織特異的のマーカの免疫染色を行った。その結果、真皮細胞が *Prrx1* 発現細胞となることが明らかになった。アフリカツメガエル創傷治癒においては創傷部位直下の筋組織が分解した後生じる単核の細胞が *Prrx1* を発現することが報告されているが、今回のマウスの結果はそれとは一致せず、マウス創傷治癒部位では筋細胞の分解も起こらないことが明らかになった。ただし、アフリカツメガエル創傷治癒において創傷部位周辺の真皮細胞が *Prrx1* を発現しているかどうかについては明らかになっていない。

上記と同様の方法でマウス 13.5 日胚と 17.5 日胚の皮膚に人為的に創傷を形成させた上で、クロドロン酸リポソーム (Clo-Lipo) をそれぞれの胚の腹腔に注射して 24 時間発生を進め、Clo-Lipo 注射の有無で創傷治癒の状態が異なるかどうかを確認した。まずはマクロファージマーカー F4/80 と CD68 の免疫染色を行い、マウス胚でマクロファージを可視化した。その結果、真皮再生する 15.5 日胚では創傷の有無にかかわらずマクロファージはほとんど見られなかった。ただし創傷部位の一部には少量のマクロファージ集積が見られた。一方、癒痕を伴う創傷治癒をする 18.5 日胚、新生仔ではマクロファージが大量に存在し、創傷形成によって

さらにその量が増加した。(図 2) 次に 17.5 日胚でマクロファージを欠損させるための Lipo-Clo 注射条件を検討し、15  $\mu$ g/体重 g の腹腔内投与によってマクロファージを大幅に減少させることを明らかにした。現在、この条件下において 17.5 日胚の創傷治癒がどのように変化するかを解析中である。

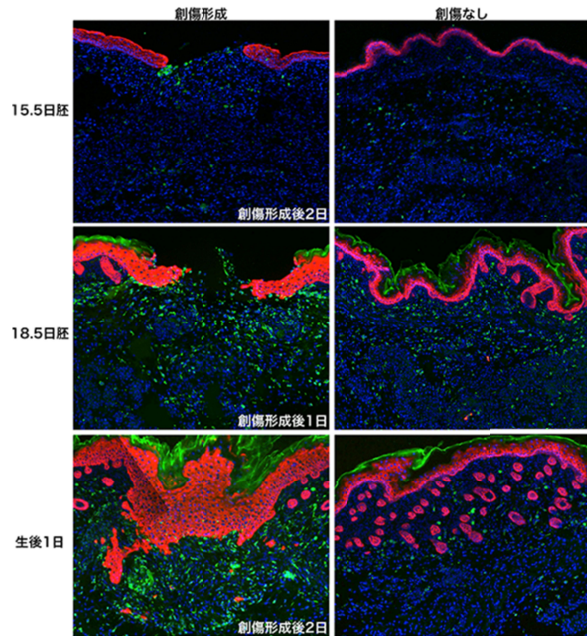


図2 マウス胚と新生仔の創傷部位におけるマクロファージ局在。緑：CD68(マクロファージ)、赤：Kelatin14(表皮基底細胞)、青：DAPI(核)

## 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1件)

Kawasumi A, Sagawa N, Hayashi S, Yokoyama H, Tamura K.

Wound healing in mammals and amphibians: Toward limb regeneration in mammals.

*Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer, 査読有, vol.367, 2013, pp.33-49, DOI: 10.1007/82\_2012\_305

[学会発表](計4件)

Aiko Kawasumi, Toshinori Hayashi, Sinichi Hayashi, Yasuhiro Kamei, Yoshihiro Morishita, Koji Tamura, Hitoshi Yokoyama.

Infrared laser-evoked gene operator (IR-LEGO) method is applicable to study organ morphogenesis in anuran and urodele amphibian development and regeneration

**発生生物学会**

茨城県つくば市, 6月3~5日 2015年(口頭・ポスター発表) [査読無]

亀井保博, 横山仁, 川住愛子, 森下喜弘, 林利憲, 木村英二, 島田敦子, 竹内秀明

赤外線による局所遺伝子発現法( IR-LEGO )  
の様々な生物種への応用

**日本動物学会第 85 回仙台大会**  
**宮城県仙台市, 9 月 11~13 日 2014**

(口頭発表)【査読無】

川住愛子, 横山仁, 貴志和生, 田村宏治

アフリカツメガエルとの比較によるマウス胚創傷治癒メカニズムの解析

**第 13 回日本再生医療学会総会**  
**京都府京都市, 3 月 4~6 日 2014**

(ポスター発表)【査読無】

川住愛子, 横山仁, 貴志和生, 田村宏治

アフリカツメガエル創傷治癒メカニズムとの比較によるマウス胚創傷治癒メカニズムの解析

**日本動物学会第 84 会岡山大会**  
**岡山県岡山市, 9 月 26~28 日 2013 (口頭発表)【査読無】**

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川住 愛子 (KAWASUMI, Aiko)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号: 8 0 6 2 5 4 8 4