

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10959

研究課題名(和文) マクロファージを制し根治を目指す！新型電子顕微鏡での肥厚性瘢痕、ケロイドの研究

研究課題名(英文) Analysis of scars and keloids using a focused ion beam/scanning electron microscope differentiation between hypertrophic scars and keloids

研究代表者

古賀 憲幸 (Koga, Noriyuki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：30309851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肥厚性瘢痕(HS)とケロイドを電子顕微鏡FIB/SEMを用いて解析し三次元的な組織構築の違いをから両者の鑑別が可能か検討した。正常皮膚、成熟瘢痕、肥厚性瘢痕およびケロイドの4組織型から得た試料を用いて、線維芽細胞(Fb)とマクロファージ(M₁)両細胞間の接触の有無、接触様式を解析し4組織型の有意差の有無を統計解析した。接触の有無については、正常皮膚と成熟瘢痕との間に有意差があり、接触形態は正常皮膚と成熟瘢痕との間に有意差があった。したがって、肥厚性瘢痕とケロイドには電子顕微鏡で明確な組織構築の違いがあり、この手法を用いて両者の鑑別が可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The hypertrophic scars (HS) and keloids were analyzed using a new electron microscope FIB / SEM to investigate whether it is possible to distinguish the difference between three dimensional structures. The samples were obtained from 4 tissue types of normal skin, mature scar, hypertrophic scar and keloid. The statistical analysis was conducted on the significant differences of contact between both fibroblasts (Fb) and macrophage (M₁) cells, and the significant differences of contact mode in these four tissue type. Regarding the presence or absence of contact, there was a significant difference between normal skin and mature scar, and there was a significant difference between normal skin and mature scar contact form. Therefore, there was a distinct difference in tissue construction between hypertrophic scar and keloid under the electron microscope, and it was thought that it is possible to distinguish between them using this technique.

研究分野：創傷治癒

キーワード：ケロイド 肥厚性瘢痕 線維芽細胞 マクロファージ 集束イオンビーム観察装置付き走査型電子顕微鏡 三次元解析

1. 研究開始当初の背景

創は治癒した後、必ず瘢痕を生じる。その際多くは成熟瘢痕となるが、時に肥厚性瘢痕やケロイドを生じることがある。肥厚性瘢痕とケロイドの違いについては、以前よりさまざまな報告がなされているが、その鑑別は主として臨床所見によって行われる。肥厚性瘢痕では瘢痕部のみに発赤と隆起を認め、掻痒感が受傷後3～6ヶ月に最も強く現れその後自然消退する。一方ケロイドでは、病変が瘢痕部を超えて広がり徐々に悪化する傾向にあり、症状としては中等度から強度の疼痛が認められる。このように肥厚性瘢痕が自然消退する炎症的な特徴を持つのに比べ、ケロイドは治療抵抗性で再発しやすく周囲健康皮膚へ浸潤性に増殖するという腫瘍性的特徴を持つ。以上のように、二つには臨床明らかな違いを認める。しかし、光学顕微鏡や通常の電子顕微鏡による病理組織所見では、二つともに膠原線維の増生がみられ、二つの違いはその増生の程度の差といわれている。このため、実際には二つの鑑別は困難である。このように肥厚性瘢痕とケロイドは似て異なる疾患であるが、その病因や発生機序および病態が明確にされておらず、特にケロイドに関しては治療法についても確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

鑑別が困難な、肥厚性瘢痕とケロイドを focused ion beam/scanning electron microscope (FIB/SEM) を用いて、組織構築を解析し、細胞間接触様式の違いを三次元的に明らかにすることで二つの鑑別が可能か検討することを目的とする。

3. 研究の方法

患者本人に今回の研究に対する十分なインフォームドコンセントを行い、採取した組織を本研究に用いることについて同意が得られた患者のみを対象とした。また本研究の実施にあたっては、事前に久留米大学倫理委員会の審査と承認を得た(研究番号12139)。

正常皮膚(5例)、成熟瘢痕(5例)、肥厚性瘢痕(5例)およびケロイド(5例)の皮膚サンプルを得た。次いで導電染色を行い、標本の真皮網状層を観察することとし、この部位に対して、ガリウムイオンビームを照射することでその表面を100nm(0.1μm)の厚さで切削し、得られた切削面をFIB/SEMにて観察した。この表面切削とSEMによる観察を自動的に繰り返し行った。これによって得られた750枚の観察画像は画像ソフトを用いてスタッキングし、70×70×70μmの立方体の3Dデータを取得した。三次元解析はソフト(Amira, FEI)を用いて、線維芽細胞を緑色で、マクロファージを黄色で、肥満細胞を紫色で色づけし、それらの三次元構造を描写した。

以上のような手順で1サンプルあたりランダムに3カ所から連続画像を取得し解析を行った。正常皮膚、成熟瘢痕、肥厚性瘢痕およびケロイドの三次元画像をそれぞれ解析した。その解析の内容については、まず線維芽細胞とマクロファージの細胞間同士の接触の有無を確認し、次にその程度を面状(細胞の片面が約30%以上接触)、点状(約30%未満の接触)、無しの3段階で評価した。

そして、それらの接触の程度について、それぞれの組織間で有意差があるかないかをFisher 正確検定を用いて統計学的に検討した。

4. 研究成果

線維芽細胞とマクロファージとの接触の有無については、正常皮膚では、15カ所全て

の観察部位で線維芽細胞とマクロファージの接触がみられ、その接触の程度は全て面状（100%）であった。成熟癒痕では、接触有りが15カ所中13カ所（87%）で、その接触の程度については面状が12カ所（80%）と点状が1カ所（7%）であり、接触無しは2カ所（13%）であった。肥厚性癒痕では、接触有りが15カ所中12カ所（80%）で、その接触の程度については面状が3カ所（20%）と点状が9カ所（60%）であり、接触無しは2カ所（20%）であった。ケロイドでは接触有りが15カ所中2カ所（15%）で、その接触の程度については面状が1カ所（7.5%）と点状が1カ所（7.5%）であり、接触無しは13カ所（85%）であった。線維芽細胞とマクロファージの接触の有無については、正常皮膚と成熟癒痕および肥厚性癒痕の3種類の組織間に有意差は認められず、それら3種類の組織とケロイドとの間には全て有意差が認められた。すなわち、それら3種類の組織では2つの細胞がほとんど接触しているのに対し、ケロイドではほとんど接触していないという結果であった。接触有りと判定されたそれら3種類における接触の程度（面状と点状）については、正常皮膚と成熟癒痕との間に有意差は認められず、それら2種類の組織と肥厚性癒痕との間には有意差が認められた。すなわち、正常皮膚と成熟癒痕では両者の接触は面状で、肥厚性癒痕ではその接触が点状になっているという結果であった。

肥厚性癒痕とケロイドの違いについては、以前よりさまざまな報告がなされ、また現在までに多くの組織学、病理学、生理学（Growth factor およびサイトカインなど）遺伝子学的アプローチの研究が行われてきた。しかし、いずれにおいても原因や発生機序が明らかにされておらず、特にケロイドでは治療についても未だ確立されていないのが現状である。

今回我々は、正常組織において多くのマクロファージが線維芽細胞と頻りにダイレクトコンタクトを持ち、そのコンタクトは極めて密であることに着目し、FIB/SEM を用いて正常皮膚、成熟癒痕、肥厚性癒痕およびケロイドにおける線維芽細胞とマクロファージの細胞間同士の接触の有無とその程度を観察した。その結果、正常皮膚と成熟癒痕では線維芽細胞とマクロファージが密に接しており、肥厚性癒痕では疎な接触となり、さらにケロイドではそれらの細胞同士が完全に離れていることが明らかとなった。

以上により、今回の研究成果は、肥厚性癒痕とケロイドとの鑑別の有用な一手法となり得るだけでなく、その治療法の開発のための重要なヒントになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

FIB/SEM を用いた癒痕及びケロイドの解析：右田 尚、力丸 由起子、古賀 憲幸、太田 啓介、中村 桂一郎、清川 兼輔. 日本医時新報 臨床各科差分解説、査読有、No.4871、p53 (2017.9.2)

〔学会発表〕(計5件)

ケロイド・肥厚性癒痕における線維芽細胞やマストセルの再認識 電子顕微鏡による三次元解析で見えてきた、肥厚性癒痕とケロイドの違い：右田 尚. 第60回日本形成外科学会総会・学術集会、ランチョンセミナー18 (2017.4.14)

集束イオンビーム観察装置付走査型電子顕微鏡を用いた癒痕およびケロイドの解析：右田 尚、力丸 由起子、古賀 憲幸、太田 啓介、中村 桂一郎、清川 兼輔. 第25回日本形成外科学会基礎学術集会(2016.9.15)

シンポジウム「革新技術が切り開く発生・再生医学研究の最前線」FIB/SEM tomography

を用いた皮膚の病態生理解析の新手法：力丸 由起子、太田 啓介、金澤 知之進、東 龍平、都合 亜記暢、岡山 聡子、中村 桂一郎。
第 121 回日本解剖学会総会(2016.3.28-3.30)

ケロイドおよび肥厚性瘢痕の三次元微細構造解析 ～正常皮膚と成熟瘢痕との比較検討～：力丸 由起子、太田 啓介、金澤 知之進、東 龍平、都合 亜記暢、岡山 聡子、中村 桂一郎。第 71 回日本解剖学会九州支部学術集会 (2015.10.31)

集束イオンビーム観察装置付走査型電子顕微鏡を用いた瘢痕およびケロイドの解析：右田 尚、力丸 由起子、古賀 憲幸、太田 啓介、中村 桂一郎、清川 兼輔。第24回日本形成外科学会基礎学術集会 (2015.10.8-9)

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古賀 憲幸 (KOGA, Noriyuki)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：30309851

(2)研究分担者

- ・太田 啓介 (OHTA, Keisuke)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：00258401
- ・力丸(西)由起子(RIKIMARU-NISHI, Yukiko)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：90368960
- ・右田 尚 (MIGITA, Hisashi)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：80412518