

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20321

研究課題名(和文) マウス胎仔皮膚再生とWntシグナルの関係

研究課題名(英文) The relationship between skin regeneration of fetal mice and Wnt signaling

研究代表者

高田 圭以子 (Takada, Keiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80624460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔の皮膚再生モデルを用いて、さまざまな発生段階のマウス胎仔に創傷を作成し、その治癒過程とWnt遺伝子発現の関連を観察したところ、Wnt3a,5,10とその他のWnt関連タンパクが胎生13日の創傷部では発現が認められなかったが、胎生15日、17日と胎生後期になるに従い、創傷部での発現の増強が観察された。これらのことから、差瘢痕形成とWntシグナルの相関性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：By using mice fetal wound healing model, we made cutaneous wounds at various developmental stages of mice fetuses. Then the relationship between the expression of Wnt signaling and wound healing was observed. It was shown that in embryonic (E)13 wounds, no Wnt signals were over expressed. But when the wounds were made at later developmental stages, Wnt signals including Wnt 3a, 5, 10 and so on were over expressed at the margin of the wounds. From these results, it was supposed that the scarring and over expression of Wnt signals are co-related.

研究分野：形成外科

キーワード：fetal mice Wnt wound

### 1. 研究開始当初の背景

生物学における再生とは、損傷を受けた組織や器官、四肢などを復元する現象のことである。古くから、特に再生能力の強いものはこの分野のモデル生物として用いられている。特に有名なのがヒドラとプラナリアで、これらは条件がよければ100-200分の1からも全身を再生することが出来る。脊椎動物では、イモリが特に再生力に優れており、尾や足などを切断しても完全に元に戻る。これらの再生においては、パターンニングが関与していることが知られている。

発生に伴う形態形成では分泌性シグナル分子を介した相互作用が細胞間コミュニケーションの方法として使われており、この細胞間シグナル分子の中で中心的な作用を及ぼす因子として Wnt ファミリーがある。この中には17種以上のメンバーがあり、線虫、昆虫などの下等生物からマウス、ヒトに至るまでの高等動物において、Wnt 遺伝子群は発生のさまざまな局面で時間的、位置的に特異的な発現を示し、形態形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖分化の調節因子として機能していることが知られている。

哺乳類の皮膚に関しては、ある発生段階までは皮膚の再生能を有していることがわかっているが、さまざまな胎仔創傷治癒の研究がなされているにも関わらず、その原因は解明されていない。マウス胎仔を用いた研究では、これまでに報告されたほとんどの研究は、胎生15日のマウス胎仔を皮膚再生モデルとして用いている。しかし、実際には胎生15日のマウス胎仔に作成した創傷は外から見てわかる傷跡が残っており、完全な皮膚の再生ということはできない。

慶應義塾大学形成外科学教室では、独自に開発した胎仔手術法を基に、マウス胎生13日までの創の作成に成功している。マウス胎仔の皮膚に創傷を作成し創傷治癒を観察することで、創傷部に皮膚付属器を含めて完全

に皮膚が再生する時期から、成獣と同様に瘢痕を残す時期に切り替わる時期を発見した。即ちマウスでは胎生13日までは皮膚は完全に再生するが、胎生14日以降では皮膚は再生しなくなることを見出した。

これらのことから、成獣ならびに皮膚が完全に再生する時期からしなくなる時期には、Wnt シグナルの変化が関与している可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、本研究室が独自に開発したマウス胎仔の皮膚再生モデルを用いて、さまざまな発生段階のマウス胎仔に創傷を作成し、その治癒過程と Wnt 遺伝子発現の関連を観察することを目的とする。

### 3. 研究の方法

成獣はオス ICR8 週令を用いて、背部に長さ1cmの長軸方向に沿った皮膚全層切開創を作成した。1,3,5,7,14日後に創部を採取した。胎仔は ICR 妊娠13,14,15日のマウスを用い、全身麻酔下に顕微鏡下で胎仔側胸部に皮膚全層切開創を作成する。創傷作成後、24時間後に胎仔を採取した。採取した組織を OCT コンパウンドに包埋し、急速凍結後に7 $\mu$ mの凍結切片を作成した。乾燥させた後、アセトンで10分間、室温で固定し、免疫染色を行う。使用する抗体は、1次抗体は Wnt1,3A,5A および、Wnt のシグナル伝達系である Phospho-LRP6, Dvl3, Naked1, Naked2, Axin 1 を用いた。

2次抗体以降は VECTASTAIN elite ABC KIT (VECTOR LABORATORIES. INC) を用いて DAB 発色または蛍光発色を行った。

in situ hybridization は、Affymetrix 社の QuantiGene ViewRNA システムを用いて、Wnt 1,3a,5a,10b など毛包再生に関係しているものを中心に行った。

免疫染色と in situ hybridization で確認された皮膚の再生する時期としない時期で発現に差のあった Wnt 関連因子につき Real

time RTPCR を行い、定量的に発現量の確認を行った。

その後、Wnt の発現を小分子を用いて発現の抑制と増強を試み、マウス胎仔の皮膚再生に及ぼす影響について観察した。具体的には、Wnt シグナルを増強させる BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime)、減弱させるには IWP, IWR を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 主な研究成果

胎生 13、15、17 日マウス胎児に手術を施し、24 時間後に創を採取し、免疫染色と in situ hybridization で Wnt 関係分子の発現の変化を観察した。免疫染色では、胎生 17 日の創傷部で、Wnt 1 の発現が観察されたが、他の発生段階のマウス胎児では、創傷部で発現が見られなかった。Wnt1 は、2 重染色で発現している細胞を観察すると、創に集積する単球・マクロファージの一部に発現が認められることが観察された。また、in situ Hybridization では、Wnt3a, 5, 10 で胎生 13 日の創傷部では発現が認められなかったが、胎生 15 日、17 日と胎生後期になるに従い、創傷部での発現の増強が観察された。このため、レーザーマイクロダイセクションを用いて、凍結切片の創傷部と正常皮膚から組織を個別に採取し、RNA を採取、cDNA に置換し、real time PCR で定量的に発現の評価を行ったところ、in situ hybridization の結果と同様に、胎生 13 日の創傷部では発現の増強が認められなかったが、胎生 15 日、17 日と胎生後期になるに従い、創傷部での増強が確認された。また、胎生 13 日の胎仔では、正常部分においても Wnt の発現は見られなかった。皮膚が完全に再生する胎生 13 日の創傷部では、Wnt の発現増強が見られず、皮膚表面の構造が乱れる胎生 15 日の創傷部位や、線維化が起こる胎生 17 日の創傷部位で正常部に比較しても発現が増強していることから、Wnt の発現が皮膚の再生を見出し、

場合によっては線維化を更新させている可能性が示唆された。

また、Wnt 関連因子の発現では、免疫染色で、Dvl3, Naked1, Naked2, Axin 1 の発現が、in situ hybridization の結果と同様に、胎生 15 日、17 日の創傷部位で発現更新が認められた。また、in situ hybridization の結果では、Axin 1 の発現更新が確認された。

さらに、胎生 15 日の胎仔羊水内に投与した Wnt の活性を抑制する低分子化合物を投与すると、皮膚が完全に再生することはなかったものの、瘢痕の度合いが改善する傾向にあった。

##### (2) 日本国内での状況とインパクト

ある種の Wnt の過剰発現が、毛包再生を誘導するという研究はこれまでもなされてきたが、瘢痕との関係では、これまで研究はなされてこなかった。本研究で、Wnt の過剰発現と瘢痕の増悪が相関している傾向にあり、瘢痕形成メカニズムを新たな視点で研究できるものと考えられる。

##### (3) 今後の展望

Wnt がどのようなメカニズムで、キメの形成や線維化に関わってくるか、そのメカニズムの研究を行ってゆきたい。

#### 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

高田 圭以子 (Takada Keiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80624460