

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 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：15K20323

研究課題名(和文)ホールマウント染色による胎仔皮膚創傷治癒組織の解析

研究課題名(英文)Visualizing fetal skin wound tissue by whole-mount immunohistochemistry.

研究代表者

崎尾 怜子(Sakio, Reiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70723261

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)：胎生期の無瘢痕性創傷治癒のメカニズムを探るために、ホールマウント染色標本を用いて創傷治癒組織の解析を行った。胎生13.5日目に作成した皮膚創傷組織を24時間後に回収して観察したところ、創部中心に向かって盛んに血管新生が行われている様子を捉えることができたが、胎生15.5日目以降になると、有意にその血管新生は減少していた。また、胎生13.5日目の創部には小型のマクロファージが表面を覆うように多数存在していたが、胎生15.5日目以降の創部ではほとんど認められなかった。同細胞が血管新生と皮膚の再生に關与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To explore the mechanism of scarless wound healing, fetal skin wounds were created and analyzed using whole-mount immunohistochemistry. In the wound tissue of E13.5 embryos, numerous endothelial cells were observed extending their filopodia towards the center of the wounds, whereas after E15.5 seldom endothelial cells were observed in the superficial layer of the wounds. The surface of E13.5 wounds were covered with numerous macrophages, which were no longer observed after E15.5. These features may be related to the potential of skin wound to heal without scarring. Further morphological analysis in conjunction with genetic modification of animals will elucidate new insights into the mechanism of skin wound healing.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 再生 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚の創傷治癒に関連して、「傷をいかにきれいに治すか(quality of wound healing)」という問題は皮膚科・形成外科領域における最大の関心事のひとつである。ケロイドや肥厚性瘢痕は、その quality を低下させる原因の最たるものである。部位や人種にもよるが、外科手術後1年の時点で約3割に肥厚性瘢痕を認めるとの報告がある(Mahdavian Delavary et al 2012)。現行の創傷治療の現場においては、「傷をいかにして迅速に治すか」という点に重きが置かれており、直接命に関わることのない治癒後の quality に関しては軽視される傾向にある。しかしながら、患者の Quality of Life を鑑みると、皮膚の瘢痕形成をいかに抑制するかという問題は現代医療における重要な課題であるにも関わらず、その詳細なメカニズムには依然として不明な点が多く、有効な予防手段が存在しない。

ヒトをはじめとする哺乳類の皮膚は、通常その修復過程において多かれ少なかれ瘢痕形成を伴う。その一方、胎生中期以前は、イモリの切断肢や魚類の切断尾同様、瘢痕を残さず元通りに完全に再生することが知られている(Martin et al 1992)。これまでわれわれは、マウス胎仔皮膚創傷治癒の解析において、胎生13日目と14日目の間にこの「治癒様式の転換」があることを見出している(Kishi et al Br J Plast Surg 1999; Wound Repair Regen 2006; Shimizu et al Dermatol Surg 2011)。つまり、胎生13日目以前の皮膚に全層切開創を作成すると治癒後は表皮紋理を含めすべての構造が周囲健全皮膚と同等に再生するのに対して、14日目以降では表皮紋理の再生が起こらず、瘢痕組織が形成されるこれまでの研究において、従来の薄切切片を用いた観察法では血管や神経線維などの線維状構造は断片化されてしまい、その三次元的なネットワーク構造を把握することができなかった。そこで、網膜血管を中心に詳細な形態学的観察の手法が確立されているホールマウント染色によって創部を解析することとした。本法は、ある程度の厚みをもつ組織を全体として染色して可視化する免疫組織化学的手法である。そこで、本研究においては胎仔皮膚創部組織のホールマウント染色標本作製し、特に血管やリンパ管などの脈管、神経線維などに着目して創傷治癒のメカニズム、とりわけ胎生期の scar less wound healing のメカニズムに迫るべく研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス胎仔・新生仔をモデルに皮膚創部組織のホールマウント染色標本作製し、創傷治癒過程における血管やリンパ管、神経の変化を経時的に観察することで、そのメカニズムに関する新規の知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

マウス胎仔・新生仔の背部皮膚に全層切開創を作成して一定時間経過後に回収して解析を行う。ホールマウント染色標本作製し、血管、リンパ管および神経線維について皮膚全層の観察を行い、創傷治癒過程における変化、互いの関連性について検討する。

また、胎齢によってその治癒様式が変化するかどうかについて調べる。

### (1) マウス胎仔の皮膚創傷治癒モデル

妊娠マウスに対して顕微鏡視下に胎仔手術を行う方法はこれまでの研究で確立されている。

マウスは産仔数が多いICRマウスを用いて実験を行った(三共ラボサービスより購入)。妊娠13日目から17日目の母体マウスに全身麻酔(イソフルレンによる吸入麻酔)をかけ、腹部をエタノール清拭した後、下腹部正中に約1cmの長さで開腹する。切開創より胎仔を容れた子宮を体外へ脱出させる。子宮壁と羊膜を通して透見される胎仔の側胸部上の子宮壁、羊膜を小さく切開し、同部からマイクロ剪刀を用いて胎仔側腹部に長さ約2mmの皮膚全層切開創を作成する。9-0 ナイロン糸で羊膜および子宮壁を縫合し、腹腔内へ還納する。同様の操作を繰り返し、数匹の胎仔に全層皮膚切開創を作成する。母体マウスの腹膜および皮膚を4-0 ナイロン糸で閉創する。妊娠17日目のマウスについては子宮頸管の縫縮を行う。術後、技術的な問題なく手術が終了した場合には8割以上の胎仔が生存可能であることが分かっている。胎仔の創傷は約48時間で上皮化が完了し治癒する。出生後1日目の新生仔についてもマイクロ剪刀を用いて側腹部に同様の創傷を作製し、24時間後に創部組織を回収する。

### (2) 創部組織のホールマウント染色

一定時間経過後に組織の回収を行う。回収した組織は4%PFAで一晩固定し、切り出した後にホールマウント染色を行う。PBS + 0.1% TritonX-100を混合した溶液に1次抗体を添加し4で一晩反応させる。使用した抗体は、抗F4/80抗体(Rat monoclonal, AbD, clone#A3-1)、抗CD31抗体(Hamster monoclonal, AbD, clone#2H8)、抗NF抗体(Mouse, monoclonal, GeneTex)、抗Iba-1抗体(Rabbit polyclonal, Wako)、抗LYVE-1抗体(Rabbit, polyclonal, RELIA)、抗CXCR4抗体(Rabbit polyclonal, アブカム, ab7199)、抗SDF1/CXCL12抗体(mouse monoclonal, R & D systems, clone#79018)である。PBS + TritonX-100で洗浄後、各二次抗体と反応(4、3時間+室温1時間)させ、さらにPBS + TritonX-100で洗浄する。水分を拭いた後、退色防止封入剤(Prolong, ThermoFisher) 150 μl/スライドで封入し、遮光のもと封入剤が乾燥するまで室温で安置する。

共焦点顕微鏡(FV1000, Olympus)で観察、撮影し、Fluoview(Olympus)およびPhotoshop(CS5, Adobe)で画像を調整した。

### (3) 免疫染色

ホルマウント染色の標本と同様に、固定後に創部組織を切り出した後、30%スクロースに置換し、4℃で24時間浸漬させる。OCT compound に包埋してドライアイスで凍結する。Cryostat(Laica)で厚さ10μmの切片を作製する。室温で30分間乾燥後、染色を開始する。ホルマウント染色標本と同様に一次抗体、二次抗体で反応させ、共焦点顕微鏡で観察した。

### (4) RT-PCR

胎仔手術後24時間で組織を回収した。顕微鏡視下に創部を含めた皮膚および皮下組織をマイクロ剪刀で切り出した。対照として、創傷を作成していない胎仔の側腹部皮膚および皮下組織を採取した。採取した組織をハサミで細断した。RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用い、製造元のプロトコルに則りRNA抽出を行った。350μlのRLT bufferで組織を溶解し、最終的に40μlのDEPC水に溶解したRNAを得た。続いてReverse transcriptionを行いcDNAへ変換した。抽出したRNAサンプル8μlとRT enzyme mix 2μl、緩衝液12μlを混合し、25℃(10分間) 50℃(30分間) 85℃(5分間) 4℃でRNaseH 1μl添加 37℃(20分間) 4℃でTE bufferを添加、合計41μlのcDNAを得た。Taqman probeを用いて定量PCRを行った。相対定量法(Ct法)により遺伝子発現の定量を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 発達に伴う皮膚の血管・神経の形成

まず、胎仔手術を行わない正常皮膚組織を用いてホルマウント染色を行い観察した。図1に示すように、胎生11日目の胎仔では、側胸部の肋間に一致する部において深部から血管と神経が皮膚へ垂直に侵入している様子が観察された。

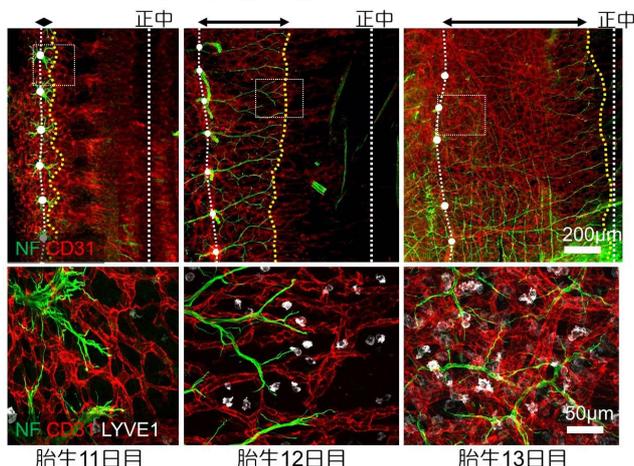


図1. 発達に伴う皮膚の血管・神経の形成

以後、胎生12日目、13日目になると血管および神経線維のネットワークの範囲が拡大し、胎生13.5日目で背部正中に到達する様子が観察された。血管と神経の先端部はほぼ一致していたが、走行については一致しておらず、血管・神経いずれか一方のネットワークを鋳型として他方が形成されるというメカニズムは否定的であった。増殖因子など形成を誘導する因子を共有している可能性はあると考えられた。

また、LYVE-1陽性のマクロファージと思われる小型の細胞が胎齢の進行とともに徐々に増加し、間質に万遍なく分布する様子が認められた。明らかなリンパ管構造は見いだせなかった。

このように、マウス胎仔の皮膚組織を用いてホルマウント染色標本を観察することによって血管や神経網が描出されることが分かった。

### (2) 胎仔創部皮膚の血管新生

次に、胎仔手術を行い、一定時間経過後に創部組織を回収して同様にホルマウント染色を行い観察した。創傷を作成した胎仔はいずれの胎齢でも約8割が生存し、組織の回収が可能であった。

胎生13日目に創傷を作成し24時間後に回収してホルマウント染色を行った結果を図2に示す。Neurofilament陽性の神経線維は創縁に沿って密に分布し、創底部にも多く存在することが分かった。CD31陽性の血管内日は、創縁のやや深部から創部中心の方向へ伸長する様子が観察された。創底部から垂直方向に伸長する血管は観察されなかった。また、LYVE1陽性のマクロファージと思われる小型で類円形の細胞が創表面を覆うように多数存在することが分かった。

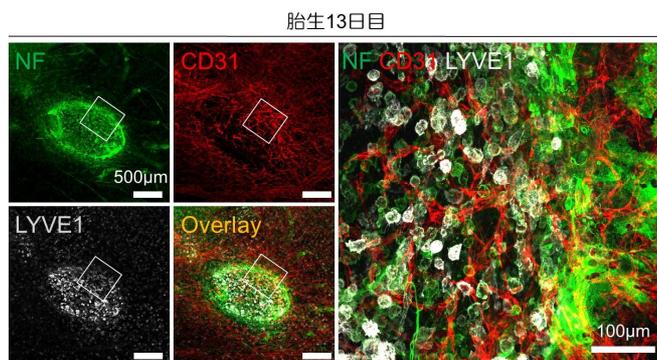


図2. 胎生13日目に創傷作成後24時間後の創部の所見

皮膚の再生が可能な胎生13日目の創部における血管新生と、再生が不可能な胎生15日目の創部における血管新生を比較するために、図3のように3次的に血管網を観察して比較した。

胎生13日目創部においては、創縁から創部中心方向へ多数のfilopodiaを伸ばすtip cellと呼ばれる血管内皮細胞が多数存在し、

sprouting angiogenesis によって創部に血管新生が起こっていることが示唆された。一方、15 日目の創部においてはこれらの細胞がほとんど観察されず、創の内部への血管新生は緩慢であることが分かった。イモリの再生肢やゼブラフィッシュの再生尾においては血管新生が再生の起点となるとの知見があることから、本所見は皮膚の再生の有無を反映している可能性があると考えられた。

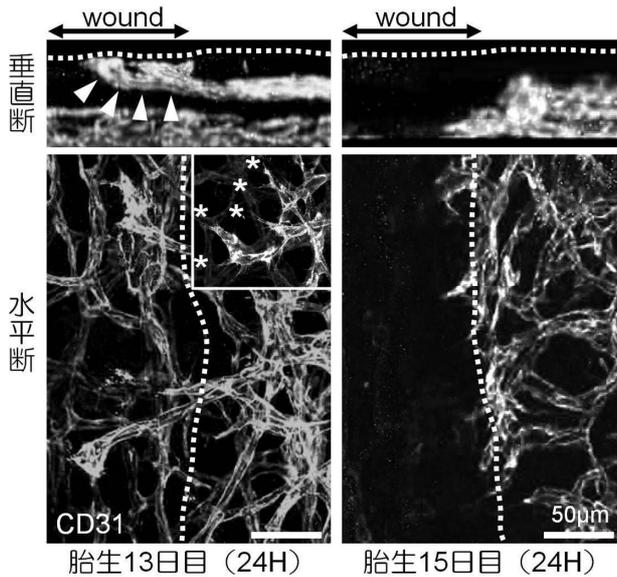


図3. 胎齢による創部血管新生の違い

#### (4) 創部における CXCR4 の発現

皮膚の再生が可能な胎生 13 日目の創部において特異的に高発現する遺伝子を検索した以前の研究の結果、CXCR4 がその一つに含まれることが示唆された。そこで、ホルマウント染色標本によって CXCR4 の発現を可視化すべく実験を行った。すると、図 4 に示す通り、胎生 13 日目の創部近傍において染色性が高いことが分かった。さらに CXCR4 を発現する細胞は小型・類円形であり、創部に集積したマクロファージである可能性が高いと考えられた。

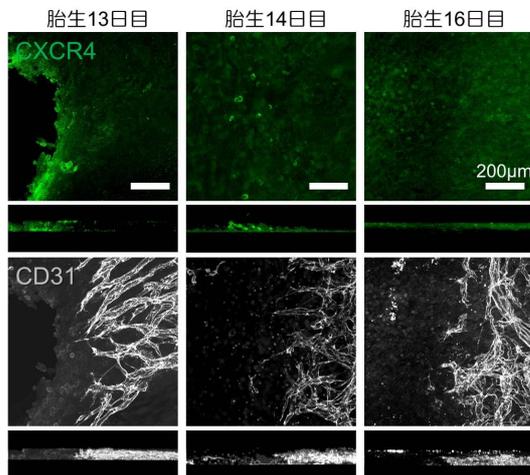


図4 胎仔創部組織における CXCR4 の発現(ホルマウント)

この仮説を検証すべく、胎仔創部組織の薄切片標本を作製し、免疫染色を行い観察した。すると、図 5 に示すように胎生 13 日目の創部においては、創縁の真皮直下に集積する F4/80 陽性のマクロファージにおいて CXCR4 の発現が認められることが分かった。胎生 15 日目以降の創部組織でも、集積するマクロファージにおいて発現が認められたが、その染色性は胎生 13 日目と比較して明らかに減弱していた。

さらに、胎仔創部組織から RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、胎生 13 日目の創部組織において発現が高いことが示された(図 5-I)。

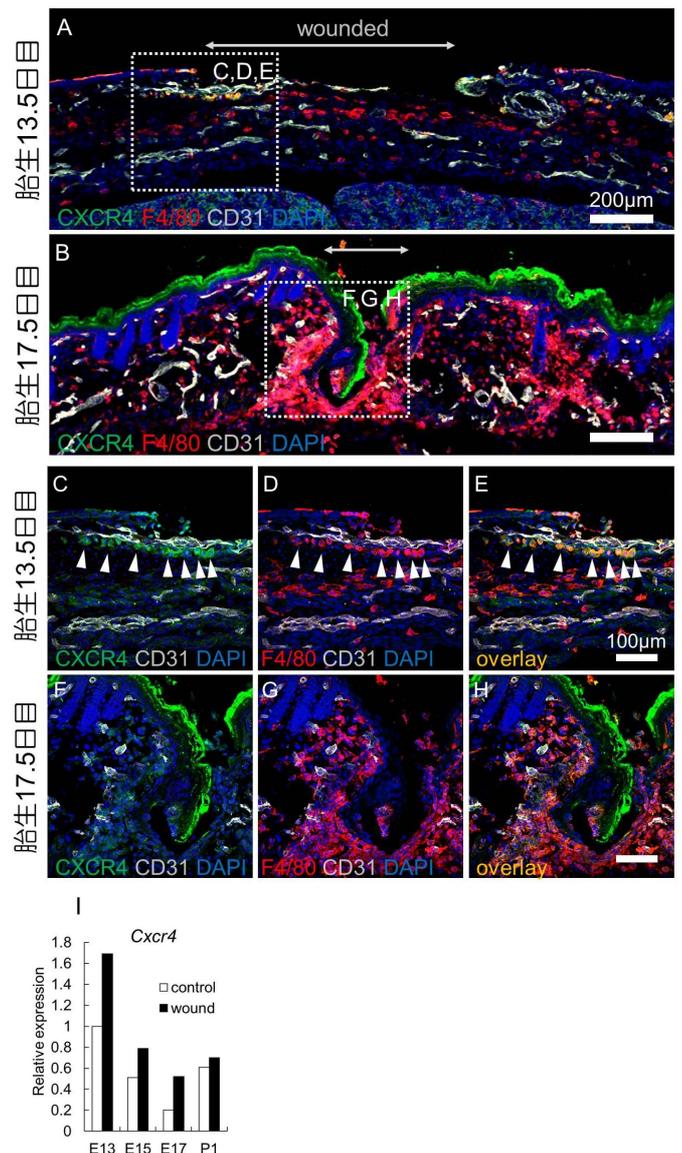


図5 胎仔創部組織における CXCR4 の発現(薄切片・qRT-PCR)

以上の結果から、皮膚の再生が可能な胎生 13 日目の創部組織においては、受傷後早期より創内への旺盛な血管新生が認められること、CXCR4 陽性・LYVE1 陽性の小さなマクロファージが創部浅層に集積することが分かった。この細胞集積と血管新生との関連につ

いては現時点では不明だが、発生段階においてマクロファージが血管新生を調節する現象は皮膚以外でも複数報告があるため、今後明らかにする必要があると考えられる。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

崎尾 怜子 (SAKIO, Reiko)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70723561

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

貴志 和生 (KISHI, Kazuo)