

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05494

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたマウス胎仔皮膚再生の解明

研究課題名(英文) Mechanism of fetal skin regeneration

研究代表者

貴志 和生 (KISHI, KAZUO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：40224919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎生13日までの胎仔に作成した創傷は、瘢痕を残すことなく完全に再生し、胎生15日以降に作成した創傷は、肌理は再生せず、また真皮が線維化し瘢痕を残して治癒する。創傷作成後の組織切片からレーザーマイクロダイセクションとマイクロアレイを用いて詳細に発現遺伝子の比較を行い、再生を促すあるいは瘢痕形成を起こさせる因子の絞り込みを行った。同時に皮膚が完全に再生するマウス胎生13日の創傷部位に特異的に発現が認められたtwist2のノックアウトマウスを購入し、飼育して繁殖させ、これらの妊娠マウスを使用し、胎生13日および胎生15日胎仔マウスに創傷を作成し、創傷作成後の創閉鎖、形態の変化を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マウス胎仔皮膚再生に関与する分子が、皮膚の再生に関与している可能性が示唆された。今後、これら进行操作することで、瘢痕を抑制する分子の開発につながる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Wounds created in the fetus until the embryonic day (E) 13 mouse embryo completely regenerates without leaving scars, wounds created after E15 fetus do not regenerate texture, and the dermis becomes fibrous and heals leaving scars and healing. From the tissue sections after wound preparation, the expression genes were compared in detail using laser microdissection and a microarray to narrow down factors that promote regeneration or cause scar formation. At the same time, the mouse completely regenerates the skin, and mice with twist2 specifically expressed at the wound site of E13 are purchased, and bred, and these pregnant mice are used. Wounds were created on E13 and E15 fetal mice, and changes in morphology were examined.

研究分野：形成外科

キーワード：皮膚 再生 胎仔

1. 研究開始当初の背景

癒痕をなくし、皮膚を再生させようという研究は再生医学の研究の発展に伴って、世界的にも非常に注目されている。しかし、これまで行われたさまざまな癒痕を抑制させることを目的とした研究は、どの程度真皮の線維化が抑制されたかという点に主眼が置かれ、その結果明瞭な結果が出ないことがほとんどであった。その中で、胎子を用いた皮膚再生の研究は、発生の途中で皮膚が完全に再生する時期からしない時期にわずかな期間で急速に変化するので、癒痕形成と皮膚の完全再生の差異を検討するモデルとしては理想的である。胎子皮膚再生モデルを用いて、皮膚の再生メカニズムに迫ろうとすると、再生する時期としない時期の比較を厳密に行う必要があるが、マウス胎子手術は技術的に困難であった。われわれは独自に開発したマウス胎子創傷モデルを用いて、胎生 13 日と 14 日のわずかに 1 日で、創傷後の皮膚が再生する状態から再生しない状態に切り替わることを見出した。胎子の創傷では、創傷治癒と発生が同時に進行するが、その後の研究で、胎生 14 日の創傷部位も創作成後 24 時間までは、胎生 13 日と同様の再生的な動態を示すことが明らかとなり、その結果、胎生 13 日と胎生 15 日の創傷後 24 時間の創傷部辺縁と正常組織の、表皮・真皮別の比較を行った。それらのデータを詳細に解析することで、それぞれの創閉鎖過程で特異的に発現する遺伝子を絞り込むことができた。さらに、これらの遺伝子を siRNA 試薬を用いてノックダウンすることで、胎生 13 日や胎生 15 日の皮膚再生をコントロールすることに成功した。

2. 研究の目的

(1) マウス胎生 13 日までの胎子に作成した創傷は、創作成後 72 時間の段階で確認する限りでは、癒痕を残すことなく完全に再生し、胎生 15 日以降に作成した創傷は、肌理は再生せず、また真皮が線維化し癒痕を残して治癒する。そのメカニズムを解析すべく、創傷作成後の組織切片からレーザーマイクロダイセクションとマイクロアレイを用いて詳細に発現遺伝子の比較を行い、再生を促すあるいは癒痕形成を起こさせる因子の絞り込みを行うことを目的とした。またその中から抽出し、絞り込んだ遺伝子に対して、それらが *in vivo* で皮膚再生に影響することを証明し、またそのメカニズムを解析することを目的とした。これまで、マウス胎子創作成後の組織を用いた解析を行ってきたが、さらに最新のマイクロアレイを用いて同様にマイクロアレイによる発現遺伝子の差異の絞り込みを行うことで、遺伝子発現の細粒的な変化を観察し、これにより、皮膚の再生を司っている遺伝子の、更なる遺伝子の絞り込みを行うこととした。

(2) 同時にこれまでのわれわれの遺伝子解析の研究から明らかにされた、皮膚が完全に再生するマウス胎生 13 日の創傷部位に特異的に発現が認められた *twist2* のノックアウトマウスを購入し、飼育して繁殖させ、これらの妊娠マウスを使用し、胎生 13 日および胎生 15 日胎子マウスに創傷を作成し、創傷作成後の創閉鎖、形態の変化を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胎生 13 日と 15 日のマウス胎子体幹部の皮膚に創傷を作成し、12、24、48 時間後に創を含めた組織と、反対側正常皮膚を採取する。急速凍結後に 20 μ m の凍結切片を採取し、レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて、創縁および正常皮膚の表皮、真皮別にそれぞれ組織を採取し、ここから RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて発現遺伝子の網羅的解析を行った。

ICR マウス胎生 13 日と 15 日の胎子に胎子手術を施し、側胸部に長軸方向に長さ約 2 mm の、皮膚肉様筋に至る皮膚全層切開創を作成した。創作成後 12、24、48 時間に動物を安楽死させ、体幹部を創を含めて輪切りにしたのち組織を RNAlater (Quiagen 社) に浸漬し、その後 OCT コンパウンドに包埋し、急速冷凍し -80 で保存した。清潔にしたクライオスタットで、凍結標本から厚さ 20 μ m の凍結切片を作成し、RNase free のスライドグラスで組織切片を回収した。直後にレーザーマイクロダイセクションシステム PALM MicroBeam (カールツァイスマイクロイメージング社) を用いて、創辺縁部の表皮、真皮、反対側正常体幹部の表皮、真皮を別々にモニター上で切り出し、光ピンセットを用いて回収し、total RNA を回収した。

胎生 15 日に作成した創傷に関しても同様の処置を行った。その後、reverse transcriptase を用いて cDNA に変換し、マイクロアレイ Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix 社) を用いて、全発現遺伝子に対して網羅的検索を行った。クラスター解析を行い、正常部位に対して 2 倍以上発現している遺伝子の確認を行った。

マイクロアレイを用いた網羅的観察により、胎生 13 日創傷部の辺縁と正常部位の表皮、胎生 15 日創傷部辺縁と正常部位の表皮の 4 点を創傷作成後様々な時間の後に創部を含めた組織を採取しマイクロアレイで比較することで得られた、胎生 13 日創傷部位でのみ発現している遺伝子、または胎生 15 日の創傷部でのみ発現している遺伝子の発現が正しいか否かを、レーザーマイクロダイセクションで局所の組織から RNA を採取し real time PCR により、発現とその変化を定量的に調べた。また、同様に 4% パラフォルムアルデヒドで固定したサンプルから、パラフィン切片を作成し、*in situ hybridization* 法で発現の局在と、確かに該当する部位で発現しているか否かを確認した。

(2) 同時に、これまでの遺伝子解析の研究から明らかにされた、皮膚が完全に再生するマウス胎生 13 日の創傷部位に特異的に発現が認められた *twist2* につき、ノックアウトマウスを購入し、増殖させ、胎子

の創傷を作成した。twist2 ノックアウトマウスのさまざまな発生段階の胎子の体幹部に皮膚全層切開創を作成し、創傷作成後 72 時間後に回収し、その形態変化を観察した。また、創傷作成後 12 時間、24 時間、48 時間で同様に組織を採取し、その形態変化、遺伝子発現の変化を観察した。twist2 ノックアウトマウスの homo は、出生後に死亡するが、胎生期は生存する。このため、胎子を用いた創傷モデルとしての利用は可能である。さらに、それぞれの遺伝子改変マウスから採取した、胎生 13 日、15 日の真皮線維芽細胞を培養し、in vitro での遺伝子ノックアウトによる機能評価を行った。Scratch assay, MTT assay などで細胞増殖能、遊走能を確認した。さらにこれまで当研究室で行ってきた免疫不全マウス背部への表皮細胞との混合移植で、皮膚の再構築を試み、皮膚再生に与える変化を確認した。

また、twist2 の強制発現マウス線維芽細胞株を、独自にピギーバックシステムを用いて行い、培養した。これらの細胞が twist2 タンパクの発現が高いことを確認した。マウス胎子真皮下に培養細胞を 30 G 注射針で移植を行い、皮膚の発生に与える変化を観察した。また、移植直後に創傷を作成し、皮膚再生に及ぼす変化を観察した。

4. 研究成果

(1) ICR マウス胎生 13 日と 15 日の胎子に創傷を作成した手術について、胎生 13 日の胎子に関しては、致死率 60%、胎生 15 日の胎子の致死率は 5%であった。

さまざまな時間のうちに、採取し作成した凍結切片から、20 μ m の凍結切片を作成し、直後にレーザーマイクロダイセクションシステム PALM MicroBeam (カールツァイスマイクロイメージング社)を用いて、創辺縁部の表皮、真皮、反対側正常体幹部の表皮、真皮を別々にモニター上で切り出し、光ピンセットを用いて回収し、total RNA を回収した。表皮に関しては、マイクロアレイに耐えうる十分なサンプル量が確保できなかったため、真皮のみの回収を行った。代わりに表皮から真皮に至る全量の組織採取を行い、マイクロアレイ Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix 社)を用いて、全発現遺伝子に対して網羅的検索を行った。クラスター解析を行い、正常部位に対して 2 倍以上発現している遺伝子の確認を行った。その結果、胎生 13 日の正常部に比較して創傷部辺縁で発現が増強しているが、胎生 15 日の創傷部では、胎生 15 日の正常皮膚に比べて変わらないか減弱している遺伝子はひとつに絞り込むことが可能であった(遺伝子 X)。逆に、胎生 15 日の正常部に比較して創傷部辺縁で発現が増強しているが、胎生 13 日の創傷部では、胎生 15 日の正常皮膚に比べて変わらないか減弱している遺伝子は 235 個存在した。

そこで、遺伝子 X について更なる解析を行った。レーザーマイクロダイセクションで局所の組織から RNA を採取し real time PCR により、発現とその変化を定量的に調べた。また、同様に 4%パラホルムアルデヒドで固定したサンプルから、パラフィン切片を作成し、in situ hybridization 法で発現の局在と、確かに該当する部位で発現しているか否かを確認したところ、確かに胎生 13 日の創傷部で強い発現を認め、また定量的にも発現が上昇していた。次に、siRNA 試薬 (Dharmacon 社)を用いて胎生 13 日、15 日の胎創傷部位に発現している当該遺伝子のノックダウンを行った。胎生 13 日および 15 日の胎子に胎子手術を施し、直後に羊水内に siRNA 試薬を注入し、遺伝子発現の抑制を行ったところ、肌理の再生が乱された。

(2) twist2 ノックアウトマウスを米国 Jaxson lab から導入を行い、飼育して増殖させた。

組織学的に皮膚の形態は、homo で厚さが薄くなり、また毛包の形成が抑制されていた。in situ hybridization で twist1,2 の発現を観察したところ、homo で twist2 の発現は認められなかったが、twist 1 の発現は、wild type に比較して増強していた。胎生 13 日および胎生 15 日のノックアウトマウスに、創傷を作成し、創傷治癒の変化を調べたところ、wild, hetero, homo の胎子ともに、wild type のマウスと同様の生存率で、胎子手術後も生存したが、創傷作成と回収は可能であったが、多くにリンパ管形成不全を認めた。約半数にうっ血様の形態を認め、多くに高度の浮腫を認めた。このため、創傷部位の肌理を含めた皮膚が完全に再生したか否かの判定は困難であった。リンパ管形成不全に twist2 の発現の有無の相関の有意差は存在しなかったため、これは background によるものであると考えられた。組織学的な観察は可能であったが、胎生 13 日、胎生 15 日の創傷部位は、浮腫は存在するものの、通常の wild type の創傷部位と変化は見られなかった。

そこで、Twist2 ノックアウトマウスから採取した、胎生 13 日、15 日の真皮線維芽細胞を培養し、in vitro での遺伝子ノックアウトによる機能評価を行った。Scratch assay, MTT assay などで細胞増殖能、遊走能を確認したところ、twist2 ノックアウトマウスで、優位に増殖能は減少弱し、遊走能は上昇しているという現象を見出した。さらにこれまで当研究室で行ってきた免疫不全マウス背部への表皮細胞との混合移植で、新生仔の wild と homo の胎子の表皮と真皮を酵素により分離、浮遊させ、表皮/真皮の組み合わせが、それぞれ wild/wild, wild/homo, homo/wild, homo/homo となるように混合移植を行った。皮膚の再構築を試みた。その結果、wild/wild では皮膚の再生が認められたが、ノックアウトマウス由来の真皮線維芽細胞を

用いた再構築モデルでは、表皮が、wild,homoいずれの場合でも毛包再生は認められなかった。

また、twist2 の強制発現マウス線維芽細胞株を、独自にピギーバッグシステムを用いて作成し、行い、培養した。これらの細胞が twist2 タンパクの発現が高いことを確認した。マウス胎仔真皮下に培養細胞を 30G注射針で移植を行い、皮膚の発生に与える変化を観察した。また、移植直後に創傷を作成し、皮膚再生に及ぼす変化を観察したが、本細胞を移植することで完全な皮膚の再生を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 北崎奈々子,高田 和裕,石神彩夏,岡部 圭介, 荒牧 典子,酒井 成貴,金澤 秀子, 貴志 和生・マウス胎仔皮膚再生におけるK16,K17 の関連、第48回日本創傷治癒学会、2018

2) 石神彩夏,高田 和裕,北崎 奈々子,岡部 圭介, 荒牧 典子,酒井 成貴,金澤 秀子, 貴志 和生・マウス胎仔皮膚再生と actin cable の関係、第48回日本創傷治癒学会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：久保田 義顕
ローマ字氏名：KUBOTA, Yoshiaki
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：50348687

研究分担者氏名：荒牧 典子
ローマ字氏名：ARAMAKI, Noriko
所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：80365311

研究分担者氏名：岡部 圭介
ローマ字氏名：OKABE, Keisuke
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：50445350

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。