

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11361

研究課題名(和文) 2光子励起顕微鏡を用いたケロイド内膠原線維のライブイメージングとその解析

研究課題名(英文) Live imaging of keloid collagen with two-photon microscopy

研究代表者

高成 啓介 (TAKANARI, keisuke)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80378190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトケロイド・肥厚性瘢痕・正常瘢痕、正常皮膚サンプルを合計24検体採取し、二光子顕微鏡によるコラーゲン繊維の観察を行った。得られた画像について繊維配向の解析を行ったところ、ケロイドは正常組織に比べて配向性の分散が少ないこと、配向性やその分散が体の部位によって異なること、これらは力学的刺激の影響を受ける可能性があることなどが示された。これらの結果はケロイドに対する部位特異的な表現形や力学的刺激による変化など、臨床で経験する現象の一端を示していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、ケロイドの様々な表現型が存在することがコラーゲン繊維の配向性や偏りに関係している可能性が示唆された。これはケロイドに対する力学的刺激に対する反応である可能性があると考えられる。今回の研究はケロイドの治療についての一つの足がかりになり、社会へ還元できる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this project period, we collected 24 samples of human keloid, hypertrophic scar, normal scar and normal skin samples. With two-photon microscopy imaging, we obtained unfixed and unstained collagen fiber images from samples. Analysis of fiber orientation in the obtained images revealed that 1: keloid has more aligned orientation of fibers compared to the normal skin, 2: orientation and its variance are differ between the locations in the body, 3: thus fiber orientation and variance are affected by mechanical stimulation to the tissue. These phenomenon may partially explain the variety of keloid phenotypes seen in the clinical practice.

研究分野：創傷治癒

キーワード：ケロイド 肥厚性瘢痕 コラーゲン エラスチン 二光子顕微鏡 第二高調波

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、外傷や手術などが原因で皮膚組織が線維増殖性に盛り上がる疾患であり、疼痛やかゆみなどを伴うため患者の QOL を著しく低下させる。治療はステロイド外用や局所注入、手術、電子線治療などが一般的に行われているが、再発率が高く難治性である。病態の一つとして、近年、ケロイド周囲の皮膚環境における物理刺激が重要な役割を担っていることが指摘されている。これにはケロイド内の膠原線維の異常産生や配向の乱れが関与していると考えられているが、詳細な病態の解明には至っていない。

2 光子励起顕微鏡は、1 つの蛍光分子が 2 つの光子を同時に吸収して励起状態となる非線形光学現象を利用しており、励起状態から安定状態に戻る際に放出されるエネルギーを可視化する顕微鏡である。この顕微鏡では Second harmonic generation(SHG)と呼ばれる現象を用いて化学的構造の違いにより特定の物質を染色せずに特異的に可視化することが可能であり、生物化学分野の新しい観察・診断ツールとして大きな期待が寄せられている。この分野のこれまでの研究から、皮膚組織のコラーゲン、エラスチン、毛包などを特異的に可視化することが可能であることが知られており (Zhu X et al., Scanning. 2011 Jul-Aug;33(4):195-200)、申請者らも以前に再生組織におけるコラーゲン観察を行っている (Takanari K et al., J Tissue Eng Regen Med. 2013 Dec 27)。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの申請者らの研究成果を応用して、2 光子顕微鏡を用いて、線維疾患であるケロイド組織での膠原線維の分布や配向の測定を行うことを目的とした。これにより、これまでに解明されなかったケロイドの病態の一端を明らかにすることができると考えた。最終的には本研究成果を臨床応用し、ケロイドの診断や、治療効果判定に役立つ診断ツールの構築を図る。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取

名古屋大学医学部附属病院において倫理承認を得て (2017-0071-10882) 研究を行った。手術時に廃棄される組織より正常皮膚、正常癒痕、肥厚性癒痕、ケロイドを合計 24 例採取し、2 光子顕微鏡による観察を行った。

(2) 2 光子顕微鏡による観察

2 光子顕微鏡は名古屋大学医学部附属病院共通実験機器 (多光子/共焦点レーザー顕微鏡 (正立), A1RMP, Nikon) を用いた。(1) で得られた組織を未固定のままプレパラートにのせ、頭尾側および左右方向を合わせた状態で観察を行った。励起光は 800nm を用い、コラーゲンの撮像は 400nm 前後のシグナルを用いた。エラスチンの撮像は TPEF を用いて行った。

(3) 繊維画像の解析

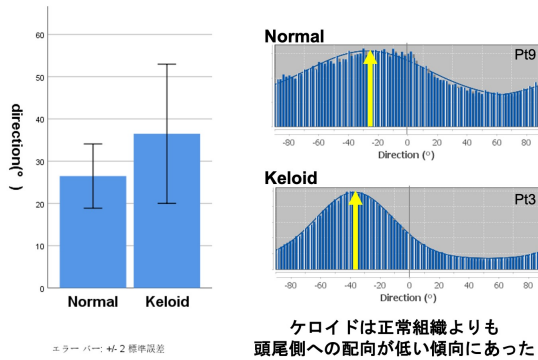
Image J を用いてコラーゲン繊維の配向解析を行った。第一グループでは 10 例の検体で採取した画像 (1 検体につき 60 枚程度) を用いて配向角度およびその分散の解析を行った。第二グループでは 24 例の検体で採取した画像 (1 検体につき 60 枚程度) を用い、細線化処理を行い、配向性および並列度の解析を行った。

4. 研究成果

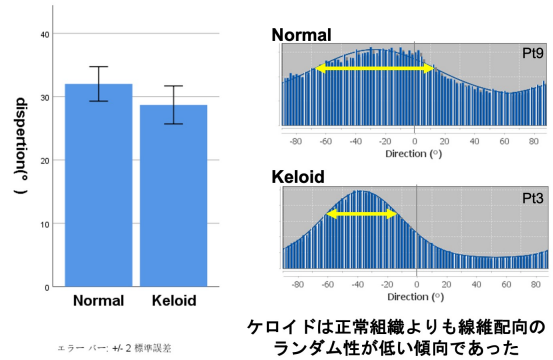
(1) 第一グループ (配向角度・分散)

- ・正常組織とケロイドの配向を比べたところ、ケロイドの方がやや頭尾側方向への配向が強い傾向にあった (結果 1)。また、ケロイドの方が正常組織に比べ繊維配向のランダム性が低い傾向にあった (結果 2)。
- ・ケロイドの部位による違いを見た所、体幹よりも耳垂でやや頭尾側方向への配向が強い傾向にあった (結果 3)。分散に関しては明らかな差はないと判断した (結果 4)。

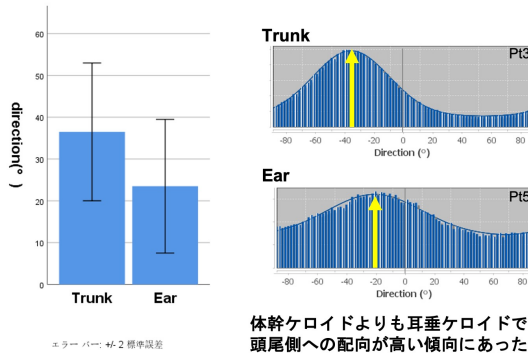
結果 1 : 正常組織 vs ケロイド (配向)



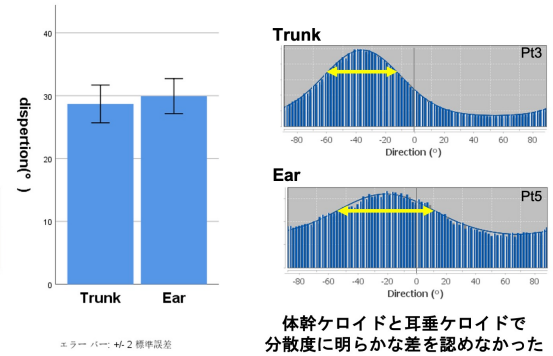
結果 2 : 正常組織 vs ケロイド(分散度)



結果 3 : ケロイド部位別 (配向)



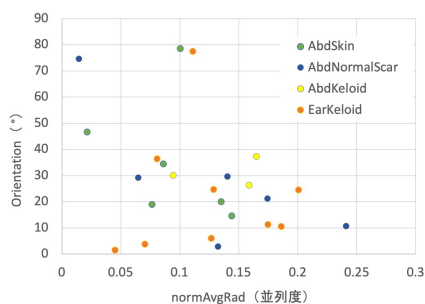
結果 4 : ケロイド部位別 (分散)



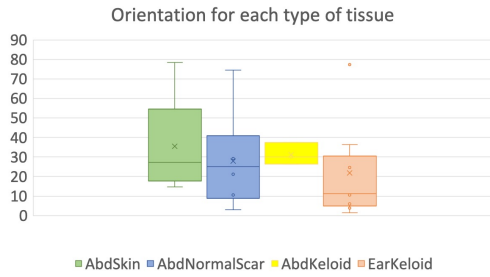
(2) 第二グループ (配向性・並列度)

- ・得られた 24 検体のコラーゲン繊維の配向性と並列度に関する分散図では、配向と並列性の間に相関は見られなかった (結果 5)。
- ・組織の配向性の解析ではケロイドは正常組織や瘢痕に比べてランダム性が低く、耳垂よりも腹部のケロイドの方がランダム性が低い傾向にあった (結果 6)。
- ・配向の並列度については正常組織、瘢痕、ケロイドの間に目立った傾向は認めなかった (結果 7)。

結果 5 配向性と並列度

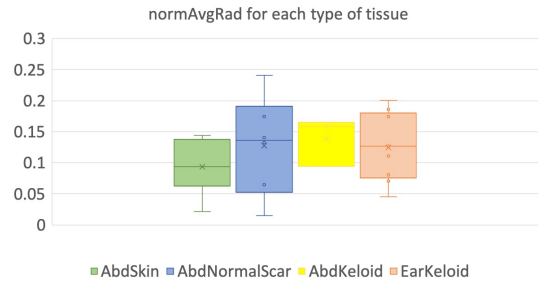


結果6 組織の配向方向



ケロイドは正常組織よりも線維配向のランダム性が低い傾向であった

結果7 配向の並列度



ケロイドと正常組織に大きな差を認めなかった。

考察

今回、臨床で得られたヒトのサンプルを用いて研究を行った。

今回の研究で得られた所見としてはケロイド組織のコラーゲン配向は正常組織や瘢痕に比べてランダム性が低い（揃っている）ことであった。これは、ケロイドの病理所見で見られるように、コラーゲン繊維が集まって collagen bundle と呼ばれる太い束を形成するため方向が一致しやすいことを表していると考えられる。また、正常組織に比べてケロイドは頭尾側への配向が少なく、ケロイド内でも耳垂よりも腹部のケロイドの方が頭尾側方向へ配向が少ない傾向が見られた。これはもともと人間の組織の成長が頭尾側方向に起こるため、頭尾側方向に配向しており、ケロイドが形成される際に起こる力学的刺激によりその方向が変わっていく可能性があると考えられた。ランダム性が低くなることと頭尾側への配向が低くなることが同時に起こっていることがこの仮説を支持すると考えられるが、今回の研究期間で得られた検体数が少ないことや、正常組織、ケロイドともに得られる検体の部位が比較的限られているため結論づけることが難しい。

今後さらに研究を続けて明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石真由美、高成啓介、中村優、内堀貴文、神戸未来、蛭沢克己、宮永亨、伊藤弘幸、亀井譲
2. 発表標題 2光子励起顕微鏡を用いたケロイド内コラーゲン繊維の特性解析
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石真由美、高成啓介、中村優、内堀貴文、神戸未来、蛭沢克己、宮永亨、伊藤弘幸、亀井譲
2. 発表標題 2光子励起顕微鏡を用いたケロイド内コラーゲン線維の特性解析
3. 学会等名 第13回瘢痕・ケロイド治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高成啓介
2. 発表標題 外科領域における光診断技術
3. 学会等名 医工連携・医光融合 ミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亀井 譲 (Kamei Yuzuru) (10257678)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 優 (Nakamura Yutaka) (00739724)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	蛭沢 克己 (Ebisawa Katsumi) (20397459)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	中村 亮太 (Nakamura Ryota) (40761060)	静岡県立静岡がんセンター（研究所）・医学部附属病院・研究員 (83802)	
研究分担者	神戸 未来 (Kanbe Miki) (50597862)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	内堀 貴文 (Uchibori Takafumi) (30625760)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	