

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15753

研究課題名(和文) 線維増殖性癒痕における血球由来 型コラーゲン産生細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment for the treatment targeted collagen-producing cells in fibroproliferative scar

研究代表者

加持 秀明 (Kamochi, Hideaki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10586366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞に由来する細胞が赤色蛍光色素を、型コラーゲン産生細胞が緑色蛍光色素を発現するマウス(Tie2Cre;Ai14;COL/EGFPマウス：以下TAGマウス)を作製した。TAGマウスの背部に肥厚性癒痕を作製し、癒痕内の組織を観察したところ、癒痕内の型コラーゲン産生細胞は全て造血幹細胞由来であることがわかった。続いて癒痕内の細胞をフローサイトメトリーで解析することを試みたが、少数のTAGマウスからでは解析に必要な細胞数を得ることができなかった。そのため、TAGマウスを大量生産できる系を確立したが、系の確立に時間を要した。

研究成果の概要(英文)：We established a transgenic mouse line in which we could trace the fate of hematopoietic stem cells with tdTomato and visualize collagen type 1-producing cells with EGFP. In hypertrophic scar model using the mice, all collagen type 1-producing cells derived from hematopoietic stem cells. Next, we tried profiling the cell in hypertrophic scars with flow cytometry, but failed due to lack of the transgenic mice. So, we re-established a transgenic mouse line to gain enough number of the mice.

研究分野：形成外科学

キーワード：細胞系譜追跡

### 1. 研究開始当初の背景

ケロイドや肥厚性瘢痕などの皮膚線維増殖性瘢痕はしばしば治療に難渋するが、それらに対する新規治療法の開発は進んでいない。その原因の一つとして、皮膚の創傷治癒が多種類の細胞の関与する非常に複雑な系であり、関与している細胞の局在や形質の変化を生体内で追跡することが困難であるため、治療ターゲットを絞りきれないことが挙げられる。我々は遺伝子改変マウスを用いた先行研究により、皮膚創傷治癒において造血幹細胞由来の細胞がコラーゲン産生に関わっていることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚線維増殖性瘢痕におけるコラーゲン産生細胞を標的とした新規治療法を開発することである。具体的には、細胞の系譜追跡 (Lineage tracing) という手法を用いて線維増殖性瘢痕内における造血幹細胞由来の型コラーゲン産生細胞を分離し、組織局在線維芽細胞との遺伝子発現プロファイルの相違を網羅的に解析することにより、造血幹細胞由来型コラーゲン産生細胞特異的なマーカーを同定し、型コラーゲン産生細胞を標的とした線維増殖性瘢痕に対する新規治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

造血系幹細胞のマーカーである Tie2 特異的に Cre recombinase を発現する Tie2Cre マウスと Cre recombinase を発現したことのある細胞特異的に tdTomato を発現する ROSA26-LSL-tdTomato マウス (Ai14 マウス)、コラーゲン type1 発現細胞特異的に EGFP を発現する COL/EGFP マウスを交配することにより、Tie2 発現細胞に由来する細胞が赤色蛍光を、コラーゲン type1 発現細胞が緑色蛍光をそれぞれ発現する triple transgenic mouse : Tie2Cre;Ai14;COL/EGFP マウス (以下

TAG マウス) を作製した。作製した TAG マウスを用いて瘢痕モデルを作製し、形成された瘢痕組織を免疫蛍光染色によって解析した。次に、瘢痕組織を酵素処理によって単細胞化し、フローサイトメトリーによる解析を試みた。

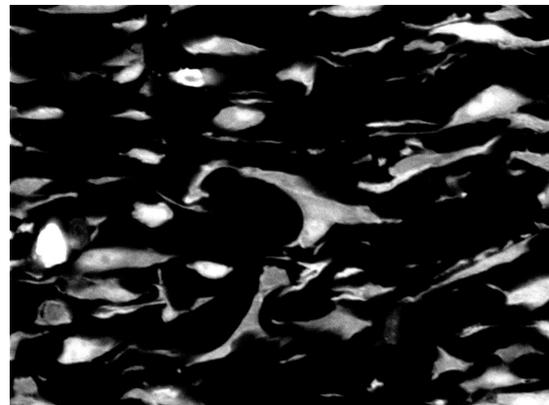
### 4. 研究成果

TAG マウスの肥厚性瘢痕モデルにおいて、瘢痕内の細胞はほぼ全て tdTomato 陽性であった。また、瘢痕内の EGFP 陽性細胞は全て tdTomato も陽性であったため、創傷治癒初期における瘢痕内コラーゲン産生は、造血幹細胞由来の細胞がになっていることが明らかになった。(下図)

肥厚性瘢痕内の EGFP 陽性細胞  
(= 型コラーゲン産生細胞)



肥厚性瘢痕内の tdTomato 陽性細胞  
(=造血幹細胞由来細胞)



続いて癒痕組織内の tdTomato 陽性細胞・EGFP 陽性細胞をフローサイトメトリーによってプロファイリングするために、TAG マウス 3 匹の癒痕組織をコラゲナーゼ処理したが、癒痕組織の単細胞化に難渋し、解析に必要な細胞数を得ることができなかった。

当初 TAG のマウスの作製には、Tie2Cre マウスのヘテロマウスの(c/w) 、Ai14 マウスのホモマウスの(a/a) 、COL/EGFP マウスのヘテロマウスの(g/w) を用いていた。具体的には、まず(g/w) と(a/a) を交配して生まれてくる仔マウス(g/w,a/w)と(w/w,a/w)から、genotypingにより(g/w,a/w)を選別する。次に、(c/w) と(g/w,a/w) を交配して生まれてくる仔マウスから、genotypingにより、TAG マウスすなわち(c/w,g/w,a/w) を選別して実験に使用していた。

しかし、理論上(c/w) と(g/w,a/w) の交配ペアからTAGマウスの が生まれてくる可能性は1/16であるが、実際は1/60程度の確立でしか生まれてこず、癒痕からフローサイトメトリーが可能となる細胞を得ることができる頭数のTAGマウスを同時に作製することは非常に困難(10匹のTAGマウスを得るために600匹の仔マウスが同時に必要)と考えられた。そのため、TAGマウスの生産系を見直し、それぞれの遺伝子改変アレルを可能な限りホモとして交配する戦略とした。

まず、Tie2Creマウスは、では全細胞にCreが発現してしまい使用不可であり、(c/c)にすると明らかにsickとなったため、(c/w) は変更できなかった。そのため、(g/w,a/w) の代わりに(g/g,a/a) を作製することを試みた。しかし、Ai14のgenotypingではaとwのアレルを区別可能であるため(a/a)と(a/w)と(w/w)の区別は容易であるが、COL/EGFPのgenotypingではgとwのアレルを区別できないため、(g/g)と(g/w)のアレルを区別できない。そのため、まず(g/w,a/w)の と を交配し、genotypingにより(g/?,a/a)もしくは

(g/?,a/w) (以下(g/?,a/a-w))を選別し、(g/?,a/a-w) とwild、もしくはwild と(g/?,a/a-w) を交配した。そして生まれてきた仔マウスが、2回の出産かつ20匹以上全てで(g/?,a/a-w)であった場合に、親マウスを(g/g,a/a-w)であると認定することとした。(もし、親(g/?,a/a-w)が(g/g,a/a-w)であれば仔マウスは全て(g/?,a/a-w)となるが、親(g/?,a/a-w)が(g/w,a/a-w)であれば理論上(g/w,a/a-w)と(w/w,a/a-w)が半々で生まれてくるはずである。親(g/?,a/a-w)が(g/w,a/a-w)の場合、仔マウスが20匹全て(g/?,a/a-w)となる確立は約100万分の1となるため、ほぼ否定できると考えた。)このようにして同定した(g/g,a/a-w)の と を交配し、生まれてきた仔マウスからgenotypingにより(g/g,a/a) を選別、さらにこれらを交配することにより(g/g,a/a)の系統を確立した。

以上のようにして作製した(g/g,a/a) を(c/w) と交配することにより、1/4の確立で(c/w,g/w,a/w) が生まれてくる系を確立することが出来た。しかし、膨大な時間を要し、系を作製した時点で研究期間終了となった。今後は大量生産可能となったTAGマウスを用いて、癒痕組織より分離した単細胞をプロファイリングしたうえで、セルソーティングによって形質ごとに分離し、遺伝子発現解析を行う予定である。

## 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）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加持 秀明 (Kamochi Hideaki)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10586366

(2) 研究分担者

須永 中 (Sunaga Ataru)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00406117

宇田 宏一 (Uda Hirokazu)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20337306

吉村 浩太郎 (Yoshimura Kotaro)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60210762

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )