

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11540

研究課題名（和文）XVIII型コラーゲンの機能解析から皮膚創傷治癒への応用に向けた基礎研究

研究課題名（英文）Functional analysis of type XVIII collagen and its application in skin wound healing

研究代表者

米澤 朋子（Yonezawa, Tomoko）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30304299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外マトリックスの働きは皮膚の創傷治癒に必須であると考えられているが、生物学的な役割はまだ未解明な点も多い。マウス皮膚創傷治癒において、XVIII型コラーゲンは再生する上皮下に早期に出現することが明らかとなった。また、発現するXVIII型コラーゲンのアイソフォームの種類は再上皮化が進むにつれて変化することが分かった。XVIII型コラーゲンは再生上皮の基底膜の形成や安定化、再上皮化の制御に働くと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の創傷治癒における表皮基底膜へのXVIII型コラーゲンの発現やその時期、アイソフォームによる違いが初めて明らかになった。また、正常で見られる成熟型の基底膜が形成される前に発現する成分であると考えられた。本研究の成果はXVIII型コラーゲンの機能を解析するうえで重要な知見となる。さらにXVIII型コラーゲンの機能が詳細に解明できれば、創傷治癒の促進や制御に応用することで治癒困難な潰瘍などの治療に役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：The function of the extracellular matrix is thought to be essential for skin wound healing, but the biological role remains unexplored. In mouse skin wound healing, collagen XVIII was found to appear early in the basement membrane zone beneath the newly forming epidermis. The type of isoform of collagen XVIII was found to change as re-epithelialization progressed, suggesting that collagen XVIII is involved in the formation and stabilization of the basement membrane and regulation of the re-epithelialization.

研究分野：細胞外マトリックス

キーワード：皮膚 コラーゲン 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は人体最大の臓器であり、外界からの最初のバリアである。皮膚の障害は熱傷、外傷、褥瘡、糖尿病性潰瘍など多岐に渡る。皮膚の創傷治癒において、細胞外マトリックスの関与は大きい。再上皮化における基底膜の再形成や、創収縮における結合組織成分の働きに関する理解は、難治性の治癒を促進するような効果的な治療の開発に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

マウス皮膚創傷治癒モデルの作製とその解析方法を確立し、再上皮化における XVIII 型コラーゲンの機能解析を行う。そして、治癒を促進させる効果的な治療に役立つ新しい知見を得る。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚創傷治癒モデルの作製

8 週齢、C57BL/6 マウスを用いて、Galiano RD らの方法 (Wound Repair Regen, Jul-Aug 2004; 12(4):485-92.) を参考に皮膚創傷治癒モデルを確立した。麻酔下で背部を除毛し、シリコン製のハの字型のスプリントを固定、縫合した。その後、スプリントの中央に、皮膚生検パンチを用いて皮膚全層欠損を作製した。ドレッシングフィルムを巻き、創傷部を保護した。マウスの処置や管理は「岡山大学実験動物指針」「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、岡山大学動物実験委員会の承認を受けて適切に行った。

(2) マウス皮膚創傷治癒の組織学的解析

目的の日数が経過した後、創傷治癒の過程を解析するために創傷部を採取した。組織は OCT コンパウンドに包埋し、クライオスタットを用いて凍結切片を作製した。アセトンで固定後、ブロッッキング処理し、一次抗体、二次抗体を常法に従い順次反応させ、蛍光減衰防止剤を含むマウンティングメEDIUM で染色切片を封入し、蛍光顕微鏡で観察、解析を行った。また、一部の切片は、10% ホルマリンで固定後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、光学顕微鏡で観察、解析を行った。

(3) 電子顕微鏡を用いた形態学的解析

3 日もしくは 6 日後の創部を採取し、グルタルアルデヒドとホルムアルデヒドを含む固定液で浸漬固定し、常法に従って組織を包埋、超薄切片を作製した。電子染色を行い、透過型電子顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) マウス皮膚創傷治癒モデルの作製と評価

創傷後 15 日間、創傷治癒の経過を肉眼で観察した。また、3 日おきに組織を採取し、創の中央付近の切片を作製、HE 染色を行って組織を観察した。創部の収縮の経過は再現性良く、9 日までに創の表面積は約半分となり、再生上皮は創表面全体を覆った。以上のことから創傷治癒の過程を詳細に解析することができるモデルを作製できた。

(2) 表皮基底膜の再生に関する電子顕微鏡解析

創傷後 3 日目と 6 日目の組織を採取し、透過型電子顕微鏡を用いて再生上皮下に形成される基底膜の超微細構造を観察した。両サンプルともに、再生上皮の先端側と創のエッジ側とは基底膜の形態が大きく異なっていた。創のエッジ側は正常と同様の構造で、連続的な線状のラミナデンサを認めた。一方、再生上皮の先端側はヘミデスモソーム下に形成されたラミナデンサが不連続性に認められる特徴的な形態であった。6 日目では 3 日目よりも不連続なラミナデンサの割合が少なくなっていた。再生上皮の形成過程では、初めに表皮基底膜は不連続なラミナデンサとして出現し、時間経過とともに連続的なラミナデンサを形成していくと考えられた。解析後、我々は 1980 年に Hirone and Taniguchi によって、培養系での基底膜の再生について透過型電子顕微鏡を用いた解析結果が既にあることを知った。我々の結果は、*in vivo* においても同様の経過で基底膜が形成されることを示している。

(3) マウス皮膚創傷治癒における XVIII 型コラーゲンの発現

創傷後 3 日、6 日の組織を採取し、XVIII 型コラーゲンに対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。これまでの報告から、XVIII 型コラーゲンは上皮細胞や血管内皮細胞の基底膜の成分であることが分かっている。我々は、再上皮化の際に再形成される表皮基底膜領域に出現する XVIII 型コラーゲンに着目した。そして、表皮基底膜の代表的な成分として知られる、ラミニン 332、IV 型コラーゲンの発現パターンと比較した。3 日目の組織を用いた解析から、ラミニン 332 は再生上皮の最先端部に早期に出現する基底膜成分であるが、XVIII 型コラーゲンも同様の発現パターンを示すことが明らかとなった。一方、IV 型コラーゲンは 3 日目の組織ではほとんどその局在を確認できなかった。6 日目には再生上皮の基底膜領域に IV 型コラーゲンの発現を認めしたが、最先端部には認められなかった。XVIII 型コラーゲンはラミニン 332 と同様に、上皮の再生過程の早い段階から必要な成分であると考えられた。

(4) マウス皮膚創傷治癒における XVIII 型コラーゲンアイソフォームの発現

XVIII 型コラーゲンのアイソフォーム特異的な抗体を用いて、再生上皮の基底膜への発現を解析した。XVIII 型コラーゲンには N 末端側のドメイン構成が異なる 3 種類のアイソフォーム (short, medium, long) がある。今回使用した抗体は、medium と long の両方を認識する抗体、及び C 末端側にエピトープがあり全てのアイソフォームを認識するという 2 種類の抗体を用いた。両抗体の表皮基底膜領域への反応性を再生上皮の先端側とエッジ側で比較したところ、再生表皮の先端部で早期に出現するアイソフォームは short isoform であり、その後に medium/long isoform が発現することがわかった。それぞれの isoform の機能の違いが、再生上皮の基底膜の形成や再生上皮の形成や安定化などに関与すると考えられた。

今後は再上皮化や皮膚の創傷治癒における XVIII 型コラーゲンの機能について詳細に解析し、皮膚の創傷治癒の促進に役立てたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yonezawa T, Momota R, Iwano H, Zhao S, Hakozaki T, Soh C, Sawaki S, Toyama K, Oohashi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Unripe peach (<i>Prunus persica</i>) extract ameliorates damage from UV irradiation and improved collagen XVIII expression in 3D skin model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of cosmetic Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jocd.12841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Maeba T, Yonezawa T, Ono M, Tomono Y, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Inagawa K, Oohashi T	4. 巻 73
2. 論文標題 Collagen XVIII Deposition in the Basement Membrane Zone beneath the Newly Forming Epidermis during Wound Healing in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 135,146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/56649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前場崇宏、米澤朋子、大野充昭、友野靖子、Ritva Heljasvaara, Taina Pihlajaniemi, 稲川喜一、大橋俊孝
2. 発表標題 Collagen XVIII deposition in the basement membrane zone beneath the newly forming epidermis during wound healing in mice
3. 学会等名 日本結合組織学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前場崇宏、米澤朋子、大野充昭、大橋俊孝、稲川喜一
2. 発表標題 マウス皮膚創傷治癒モデルにおけるXVIII型コラーゲンについて
3. 学会等名 第26回 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米澤朋子、前場崇宏、Tang Shaoying、大野充昭、百田龍輔、稲川喜一、大橋俊孝
2. 発表標題 マウス皮膚創傷モデルにおけるXVIII型コラーゲンの解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子医化学分野 http://www.okayama-u-mbb.jp/

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	大橋 俊孝 (Ohashi Toshitaka) (50194262)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	稲川 喜一 (Inagawa Kiichi) (90268615)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

	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
研究協力者	前場 崇宏 (Maeba Takahiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	唐 劭えい (Tang Shaoying)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィンランド	University of Oulu			
ノルウェー	University of Bergen			
米国	Harvard School of Dental Medicine			