

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11560

研究課題名(和文) 肥厚性癬痕、ケロイドへ継続発展する慢性感染の分子基盤解明

研究課題名(英文) Fundamental Molecular analysis of chronic infection leading to hypertrophic scars and keloids

研究代表者

大慈 弥 裕之 (Ohjimi, Hiroyuki)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：60160488

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)：癬痕病変を発症する疾患として肥厚性癬痕やケロイドがある。しかし、これらを摸する動物モデルはない。癬痕病変の発生因子として張力が重要とされている。マウス腹壁には強い張力が存在し、治癒過程にも生理的に張力負荷が予想される。実験1週間目、横方向に並ぶ線維芽細胞からなる肉芽が出現し、張力負荷のない背部皮膚欠損創の肉芽と類似していた。しかし、2週間目から強い線維性増殖が見られ、3週間目では癬痕様結節が出現した。以上の結果から、生理的環境下での張力負荷のあるマウス腹部にヒト病変類似の病変を発生しえた。本研究により、生理的環境下で癬痕病変を形成できるマウスモデルを世界で初めて創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生理的環境下で癬痕病変を形成できる動物(マウス)モデルを世界で初めて創出できた。このモデルにより、今まで明らかにされていなかった癬痕病変が主体となる肥厚性癬痕やケロイドの病態解明につながる事が期待できる。また、本モデルを使用することで、治療法の開発などにも活用でき、癬痕性病変に悩む患者に対し新規治療法の開発につながり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Scar lesions found in human are scarcely developed in murine. We created a novel model of scar forming wound by resecting a small portion of the rectus abdominis in mice, where muscular tensile force is physically loaded. In 3 weeks after the resection, the lesions with collagen-rich granulations were developed accompanied with multiple nodular lesions that is similar to the hypertrophic scars in human. In conclusion, this novel technique is the first established for the development of hypertrophic scars under a physiological condition in mice. We believe that this model is quite useful to investigate of new drugs for the patients with scar lesions in future.

研究分野：医学

キーワード：動物モデル 肥厚性癬痕 張力 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

ヒトの癒痕病変を摸するためには、生理的環境下で創傷治癒過程を経た後に癒痕病変形成が望ましい。癒痕病変形成の動物モデルとして、2007年にスタンフォード大学の Aarabi S 等による癒痕形成マウスモデルの方法[1]があるが、再現性は低く一般化されていない。それ以外でも信頼できる癒痕病変のモデル動物がないため、その作製法が最も緊急の課題となっていた。そのため本研究開始当初において、癒痕動物モデルを作製するための方法として、菌感染による慢性炎症状態を想定し、それによる組織反応により癒痕病変を惹起させようと予想したが、創感染をコントロールすることが困難で[2-4]、別の方法を模索することとなった。

2. 研究の目的

- ① ヒトの癒痕病変、特に肥厚性癒痕を摸することが可能な動物モデルを作製することを目的とした。
 - モデル作製後に形態学的、組織学的、免疫組織化学的、遺伝子学的検索が必要となること、さらに多くの研究施設でも汎用的に用いることが可能な動物であることから、マウスを実験モデル動物とした。
 - 癒痕性病変の惹起因子として、特異的遺伝子発現、TGF- β を中心とした増殖因子、細胞内 SMAD 経路、さらに物理的要因として張力などが関与することが報告されている。特に、物理的因子は極めて重要と考えられているため、病変部に張力負荷が恒常的にかかる病変にするため、腹壁筋肉による張力が存在する腹壁を用いた。
 - 張力負荷病変の比較可能なモデルとして、我々が既に報告しているマウス背部皮膚切除後、創部を固定するスプリント法 (*J Cell Physiol.* 2017;232(6):1225-1232) を用いた。この方法はスプリントで創部を固定するため、張力負荷がないモデルとなる。
- ② 病態モデルが完成した場合、治療可能性のある物質を用い治療の可能性を検索する。

3. 研究の方法

- ① 実験動物
マウスは C57BL6/N を用い、皮膚損傷後の色素沈着が過剰に起こるオスの使用を避け、メスを用いた。手術施行は 8~10 週齢の若年動物を用いた。本動物実験プロトコルは福岡大学動物実験指針に従い(動物実験承認番号 1612004)、動物愛護のもとに実験を行った。
- ② 創作製
全身麻酔下でマウスの腹部を剃毛した後、背部皮膚欠損モデルは以前の方法を用い[5-7]、腹部創作製では腹部皮膚を正中切開後、腹壁全体の筋層を分離した。腹壁中心部筋組織を眼科用湾曲鋏で切除し、腹腔内に達する円形切開創を作製した。腹壁創治癒にそれ以外(特に皮膚治癒)の影響を極力なくすため、腹壁創から離れた皮膚断端部上下 2 ヶ所を糸で縫合し、糸に対する異物反応を回避した。また、縫合により皮膚切開部にテンションが掛からない状態となり、切開部皮膚断端部での迅速な自然治癒を可能とした(皮膚治癒は約 5 日間以内に接合)。その後、創全体をテガダームで被覆した。
- ③ 生理学的検索
全身麻酔下、体重を測定し、ヘパリン処理された採血ガラス管を用い、マウスの眼窩より採血した後、全自動血球計算器で白血球数、赤血球数、血小板数を測定した。
- ④ 組織染色
スライドガラスに接着させたパラフィン薄切標本を準備し、100% キシレン 4 槽にそれぞれ

れ5分間浸漬し、脱パラフィン操作を行った。その後、100% エタノール2槽に各5分間、95%エタノールに5分間、75% エタノールに5分間浸漬後、流水洗した。ギル・ヘマトキシリン液に10分間浸漬し、核染色を行った後、水道水で10分間流水洗し、色出した。その後、1%エオジンY液)に3分間浸漬し、細胞質対比染色を行った。染色切片をエタノールで脱水操作を行った後、キシレンで透徹した。最後に、カバーガラスを用い、切片を封入剤 (Malinol: 武藤化学株式会社) で封入した。

⑤ 免疫組織化学染色

抗体は、pSmad-3 抗体、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 抗体、 α -smooth muscle actin (α SMA) 抗体、versican 抗体、CD31 抗体、myogenin 抗体 (anti-myogenin rabbit monoclonal antibody、Abcam、United Kingdom)、myoglobin 抗体を用いた。(表1) パラフィン薄切組織切片を脱パラフィンし、0.01M PBS で洗浄した後、一次抗体の種類により抗原の賦活化処理を行った(表1)。その後、3% 過酸化水素水で室温下、15分間処理し、内在性ペルオキシダーゼの不活化を行った。PBS で5分間の洗浄を3回行った後、ブロッキング液または2%BSAを用いて、室温で30分~1時間処理した。ブロッキング液を振り落とし、それぞれの抗体を表1に示す倍率にブロッキング液で希釈したものを切片に滴下後、パラフィルムでカバーした。湿潤箱に入れ、4°Cで一晩インキュベートした。一次抗体との反応後、切片をPBSで5分間、3回洗浄した。ラット由来抗体(NIMP-R14抗体、CD31抗体)は、二次抗体と室温30分反応させ、PBSで各々5分間3回洗浄した。ウサギ由来抗体は二次抗体HRP標識試薬で、室温、1時間反応させた。反応後の切片は、PBSで5分間3回洗浄後、DAB発色液を滴下し、発色させ、顕微鏡下で適当な発色が得られたのを確認後、反応を停止した。10%に希釈したギル・ヘマトキシリン液で1分間核染色を行った後、エタノールで脱水後、キシレンで透徹し、封入剤で封入した。

⑥ 形態計測

創部組織から作製した組織標本の染色写真を用い、VH Analyzerを用い、形態計測した。病変面積：腹直筋間に新規に形成された組織(正常筋肉を除いた肉芽、線維化、再生/遊走筋部分を全て含む)面積を形態計測した。線維化面積：MT染色した組織写真の正常組織部が全て同一になるよう色調補正した後、病変全内の膠原線維(ブルー部分)を採取し、その面積を形態計測した。筋芽細胞数：病変内のミオゲニン陽性細胞スポット数を形態計測した。

⑦ 統計解析

すべてのデータは、平均±標準誤差で表した。群間における比較は、Student's t-testを用い、経時的变化はOne-way variance of analysis (ANOVA)で統計計算を行った。回帰分析は、P値が0.05以下を有意とした。

4. 研究成果

① 背部と腹部での創部治癒のマクロ的比較

背部皮膚欠損後の創治癒過程は創部上皮化により治癒は進行した(図1上段)。一方、腹壁欠損後の創傷治癒過程は、円形創部円の盛り上がりで創部縮小により治癒は進行した(図1

下段)。

splinted back-skin-resection model

Jimi et al. J Cell Physiol 232: 1225-1232

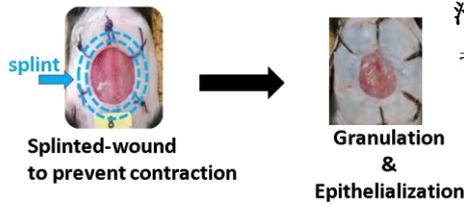
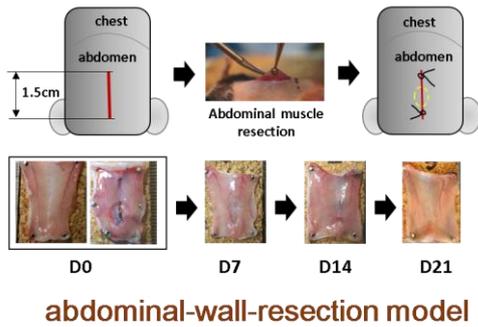


図1 背部皮膚欠損創と腹部腹壁欠損創の21日間の治癒過程の比較

背部皮膚欠損創はスプリント装着により創部への張力がかからないが(上段)、腹壁欠損創には筋層が有する張力負荷がかかっている(下段)。



② 背部と腹部の創部に形成される肉芽の比較

張力負荷のない背部と張力負荷のある創部の肉芽を、厚さおよび面積で比較した。背部では時間依存性に肉芽形成は増加したが、腹部では14日目に最も多くなった後、21日目では退縮した(図2左)。肉芽内コラーゲン分布面積割合を比較すると、両者とも14日以降にコラーゲン線維分布は増加し、プラトーに達したが、その程度は腹部病変で高かった(図2右)。

splinted back-skin-resection model

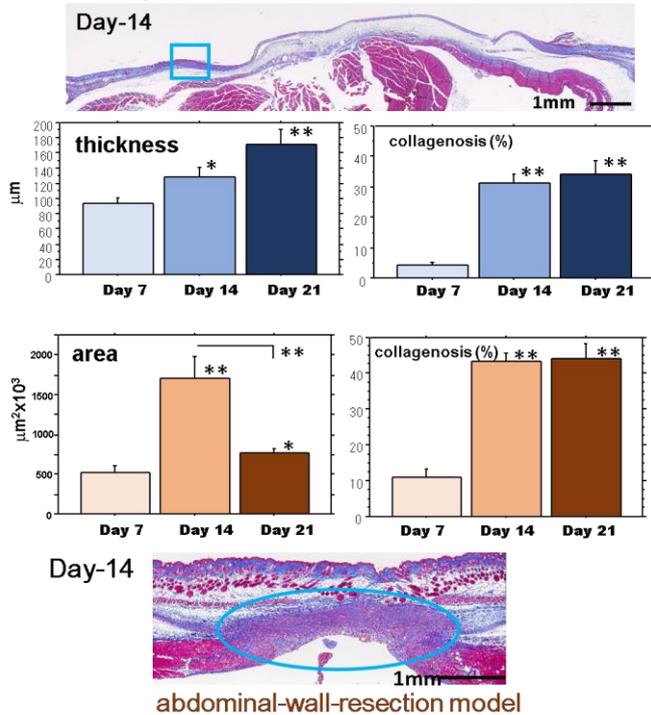


図2 背部と腹部の創部に形成される肉芽とコラーゲン線維密度の比較

MT染色を用い検索した。背部では創縁に形成された肉芽の厚さ、腹部では腹壁に形成された肉芽の面積で肉芽を評価した。コラーゲン線維面積は肉芽内の青色に染まった膠原線維の分布密度量を計測した。

③ 背部と腹部の創部に形成される肉芽の形態学的特徴

さらに、背部と腹部の創部に形成された肉芽の形態学的特徴を比較した。7日目では両群とも水平方向に延びる肉芽が形成され、その分布パターンは類似していた(図3左)。14日目になると、背部ではコラーゲン線維分布は増加したが、分布パターンは水平方向のままだったのに対し、腹部では波打つような分布へと変化した(図3中央)。21日目になると、背部では分布は維持されたのに対し、腹部では明らかな結節様病へと変化した(図3右)。

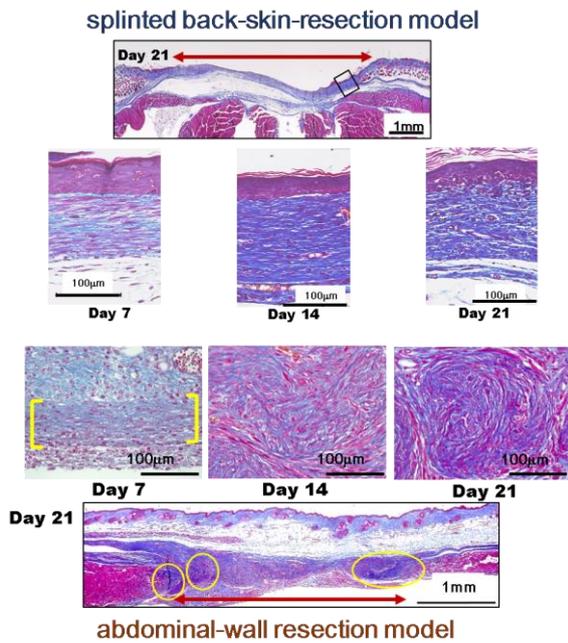


図3 背部と腹部での創作製後に形成された肉芽の形態的比較

背部での皮膚欠損後の経時的肉芽組織変化（上段）と腹部での肉芽の変化（下段）

④ 腹壁の負荷張力と肉芽内リン酸化 SMAD 発現

皮膚を含まない腹壁にどの程度の張力負荷を正常マウスの腹壁で測定した。横方向 に対し縦方向に約 3 倍の力がかかっていた（図 4B）。張力負荷により細胞内 SMAD のリン酸化を、肉芽内、肉芽に隣接する筋肉組織および切片内で離れた筋肉組織内発現を検討した結果、実験 7 日目度の発現は殆どなかったものの、実験 14 日目から肉芽内に強発現し、実験 21 目ではさらに増加していた。

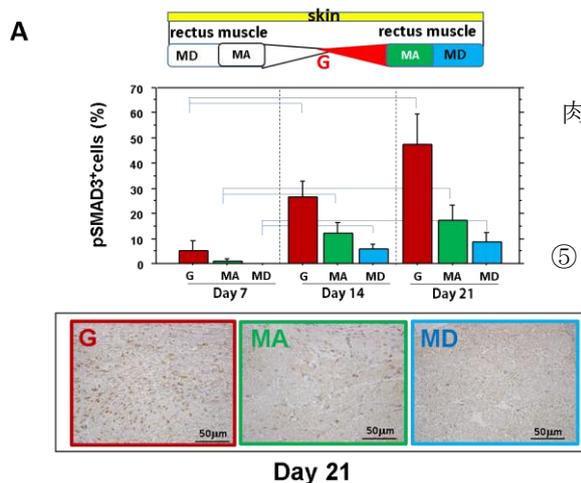


図4 肉芽内リン酸化 SMAD 発現と腹壁張力

肉芽および肉芽周囲筋組織と遠隔筋組織内リン酸化 SMAD 発現 (A) と腹壁張力 (B)。

⑤ 張力負荷腹壁創モデルを用いた治療実験

本モデルを用い、治療実験を行った。我々が今まで証明してきたコラーゲン由来ディペプチドである Pro-Hyp に創傷治癒があることから、瘢痕病変に対する効果を検討した。コラーゲンペプチド溶液を連日マウスに腹腔内投与し、その効果を検討した結果、明らかな瘢痕抑制効果を許を取得した（第 6709440 号）。



<引用文献>

1. Aarabi, S.; Bhatt, K. A.; Shi, Y.; et al., *FASEB J* **2007**, 21, (12), 3250-61.
2. Oyama, T.; Miyazaki, M.; Yoshimura, M.; et al., *Toxins (Basel)* **2016**, 8, (7).
3. Jimi, S.; Miyazaki, M.; Takata, T. et al, *J Med Microbiol* **2017**, 66, (4), 542-550.
4. Ueda, Y.; Mashima, K.; Miyazaki, M. et al., *Sci Rep* **2019**, 9, (1), 3128.
5. Jimi, S.; De Francesco, F.; Ferraro, G. A.; Riccio, M. et al., *J Cell Physiol* **2017**, 232, (6), 1225-1232.
6. Jimi, S.; Sato, K.; kimura, M. et al. *Clin Res Dermatol* **2017**, 4, (2), 1-9.
7. Jimi, S.; Jaguparov, A.; Nurkesh, A.; et al. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, 8, 345.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Jimi, S.; Jaguparov, A.; Nurkesh, A.; Sultankulov, B.; Saparov, A.,	4. 巻 8
2. 論文標題 Sequential Delivery of Cryogel Released Growth Factors and Cytokines Accelerates Wound Healing and Improves Tissue Regeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Bioeng Biotechnol	6. 最初と最後の頁 345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2020.00345	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 -
1. 著者名 Ueda, Y.; Mashima, K.; Miyazaki, M.; Hara, S.; Takata, T.; Kamimura, H.; Takagi, S.; Jimi, S.,	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibitory effects of polysorbate 80 on MRSA biofilm formed on different substrates including dermal tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39997-3	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 -
1. 著者名 Jimi, S.; Sato, K.; kimura, M.; Suzumiya, J.; Hara, S.; De Francesco, F.; Ohjimi, H.,	4. 巻 4
2. 論文標題 G-CSF Administration Accelerates Cutaneous Wound Healing Accompanied With Increased Pro-Hyp Production In db/db Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Res Dermatol	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Jimi, S.; Miyazaki, M.; Takata, T.; Ohjimi, H.; Akita, S.; Hara, S.,	4. 巻 66
2. 論文標題 Increased drug resistance of meticillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms formed on a mouse dermal chip model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Med Microbiol	6. 最初と最後の頁 542-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jmm.0.000461	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 -

1. 著者名 Jimi, S.; Kimura, M.; De Francesco, F.; Riccio, M.; Hara, S.; Ohjimi, H.,	4. 巻 18
2. 論文標題 Acceleration Mechanisms of Skin Wound Healing by Autologous Micrograft in Mice. Int J Mol Sci 2017, 18, (8).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18081675	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 -

1. 著者名 Jimi, S.; De Francesco, F.; Ferraro, G. A.; Riccio, M.; Hara, S.,	4. 巻 232
2. 論文標題 A Novel Skin Splint for Accurately Mapping Dermal Remodeling and Epithelialization During Wound Healing.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 1225-1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.25595	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Jimi S., Mashima K., Takata T., Hara S.
2. 発表標題 Methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formed on a mouse dermal substrate greatly increases drug resistance.
3. 学会等名 BioMicroWorld 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 自見至郎、大慈弥裕之
2. 発表標題 創傷感染管理の最前線 病理学的視点から見たバイオフィルム感染症
3. 学会等名 第47回日本創傷治療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jimi S, Miyazaki M, Ueda Y, Mashima K
2. 発表標題 Biofilm forming methicillin-resistant Staphylococcus aureus induces renal deterioration and severe virulence in a mouse bacteraemic model
3. 学会等名 2018 IDWEEK (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jimi S, Fuji M, Matsuda M, B. Sultankulov B, Saparov A
2. 発表標題 Growth Factor-Bound Cryogels Accelerate Skin Regenerative Healing in Mice
3. 学会等名 TERMIS-AP 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 自見至郎
2. 発表標題 基礎から見た難治性創傷のメカニズム：新たな治療戦略のために
3. 学会等名 第32回博多形成外科フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 自見至郎
2. 発表標題 創傷治癒の基礎的検証：瘢痕形成と再生の関係
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 自見至郎
2. 発表標題 バイオフィルム感染症の基礎から見た新たな考え方
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 肥厚性瘢痕の形成抑制用組成物	発明者 自見至郎、木村公彦、井上直樹、清水麻衣子、小泉聖子	権利者 学校法人福岡大学、新田ゼラチン株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、6709440	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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	秋田 定伯 (Akita Sadanori) (90315250)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	
研究分担者	高木 誠司 (Takagi Satoshi) (30419197)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	
研究分担者	大山 拓人 (Ooyama Takuto) (40570809)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	
研究分担者	自見 至郎 (Jimi Shiro) (30226360)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	