

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16997

研究課題名(和文)血管新生が起点となる癒痕なき創傷治癒のダイナミズム

研究課題名(英文)Angiogenesis in scarless wound healing

研究代表者

岡部 圭介(Okabe, Keisuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：50445350

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): ヒトやマウスは胎生中期以前は皮膚創傷の再生が可能だが、以後は不可能となり、癒痕が形成され問題となる。皮膚再生が可能メカニズムは不明だが、血管新生との関連があると仮定し検討した。再生が可能マウス胎生13.5日目の創部においては、早期から創の中心へ向けて旺盛な血管新生が起こることを三次元的に可視化することに成功した。一方、14.5日目以降になるとそのような血管新生は起こらないことが示された。これらから、創部の血管新生と皮膚再生の可否が関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の創傷は現代の治療では必ず癒痕を残し、それは機能障害や整容的問題となる。癒痕を残さずに皮膚の創傷を治癒させることは非常に大きな課題である。本研究はマウス胎仔の創傷が癒痕を残さずに治癒するメカニズムを探索したものである。イモリ四肢、ゼブラフィッシュ尾ビレなど再生可能な組織と同様に血管新生が再生の起点となるという仮説のもと、マウス胎仔創部の血管新生について解析したところ、再生が可能時期に限定して創内に旺盛な血管新生が認められることが分かった。本研究により血管新生を治療標的とする創傷治療開発の可能性が開けたと言える。

研究成果の概要(英文): Mouse embryos can regenerate full-thickness skin wound before E13.5, whereas it is no longer possible after E14.5. We hypothesized that angiogenesis in the skin wound was closely related to skin regeneration. By analyzing embryonic skin wound wholemount preparations, we could visualize three-dimensional vascular network extending from periphery to the center of the wound. There were no such vascular structures in the wounds after E14.5. These results imply the possible relationship between angiogenesis and skin regeneration in mice.

研究分野: 創傷治癒

キーワード: 創傷治癒 再生 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚の創傷治癒に関連して、「傷をいかにきれいに治すか (quality of wound healing)」という問題は皮膚科・形成外科領域における最大の関心事のひとつである。ケロイドや肥厚性瘢痕は、その quality を低下させる原因の最たるものである。身体部位や人種にもよるが、外科手術後 1 年の時点で約 3 割に肥厚性瘢痕を認めるとの報告がある (Mahdavian Delavary *et al.* 2012)。現行の創傷治療の現場においては、「傷をいかにして迅速に治すか」という点に重きが置かれており、直接命に関わることはない治癒後の quality に関しては軽視される傾向にある。しかしながら、患者の Quality of Life を鑑みると、皮膚の瘢痕形成をいかに抑制するかという問題は現代医療における重要な課題であるにも関わらず、その詳細なメカニズムには依然として不明な点が多く、有効な予防手段がほとんど存在しない。

ヒトをはじめとする哺乳類の皮膚は、通常その修復過程において多かれ少なかれ瘢痕形成を伴う。その一方、胎生中期以前は、イモリの切断肢や魚類の切断尾同様、瘢痕を残さず元通りに完全に再生することが知られている (Martin *et al.* 1992)。これまでわれわれのグループは、マウス胎仔皮膚創傷治癒の解析において、胎生 13 日目と 14 日目の間にこの「治癒様式の転換」があることを見出している (Kishi *et al Br J Plast Surg*1999; Wound Repair Regen 2006;

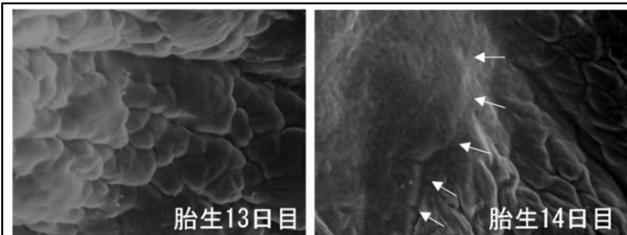


図 1. 創傷治癒様式の転換

胎仔皮膚の走査型電子顕微鏡所見。胎生 13 日目マウスの皮膚は損傷後に再生するが(左)、胎生 14 日目以降は瘢痕を残して修復される(右)。

Shimizu *et al Dermatol Surg* 2011)。つまり、胎生 13 日目以前の皮膚に全層切開創を作成すると治癒後は表皮紋理を含めすべての構造が周囲健全皮膚と同等に再生するのに対して、14 日目以降では表皮紋理の再生が起こらず、瘢痕組織が形成される(図 1)。本研究では、イモリ切断肢や魚類切断尾の再生において血管新生が必要であるという知見 (Smith *et al Nature* 1975; McMillan *et al Development* 2013) をヒントとし、哺乳類皮膚の無瘢痕性創傷治癒における血管新生についてその様式・意義を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、上記の知見をもとに、胎仔皮膚創傷治癒モデルにおける血管新生の全容を、申請者の立ち上げた 3 次元可視化技術を駆使して明らかにすること、またそれを制御する因子の時間的・空間的分布を明らかにすることを目的とする。申請者は網膜の血管新生モデルを用いて、vascular endothelial growth factor (VEGF) の時空間的分布によって発生段階の血管新生が緻密に制御される新たな仕組みを明らかにしてきた (Okabe *et al Cell* 2014)。これらの経験をもとに、創部の微小環境において、VEGF を中心とする血管新生の制御因子がどのような起源を持ち、どのようにコントロールされて組織に供給されているのか、胎生期の進行に伴ってそれがどのように変化するのか、また遺伝的介入によって血管新生が阻害された場合に、治癒結果がどのように変化するのか、などを明らかにするべく研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 血管の三次元ネットワークの可視化

本研究では、申請者らが過去に開発したマウス胎仔皮膚創傷モデルを用いる。麻酔下の母体マウスを開腹し、体外へ脱出させた子宮壁に小切開を加えて胎仔手術により側腹部に皮膚全層切開創を作成する技術は既に確立されている。胎生 13 日目以降の胎仔手術が可能であり、1 母体あたり約 5 匹の胎仔に手術を行い、80% 以上が生存することが分かっている。一定時間経過後の創部組織を回収し、ホルマウント染色を行い共焦点顕微鏡で観察する。胎仔皮膚組織は微細で軟らかく、ホルマウント染色に適した条件を備えており、血管ネットワークの三次元構造をありのままに可視化することができる。創傷治癒過程の進行に伴う血管新生の様子を形態学的に解析する。また、皮膚の再生が可能な胎生 13 日目の組織が、以後の組織とどのような違いを持っているのか、詳細に検討する。

(2) 血管新生制御因子の時間的・空間的分布

上記の結果なネットワークの可視化と並行して、血管新生を制御する因子(特に VEGF/VEGF 受容体)が創内および周囲でどのような分布を示すかにつき検討する。血管の発生や血管新生において、VEGF は圧倒的に重要な役割を果たすことが知られている (Shalaby *et al.* 1995)。胎児皮膚創傷部位における VEGF やその受容体の量、局在を明らかにすることによって、血管新生の制御に関する新規の知見が得られると考えられた。

(3) 神経やマクロファージとの関連

本研究で用いるホルマウント染色による観察は、三次元構造が可視化できる他に、多重染色によって異なる細胞種間の関連性について検討することが可能であるという利点を持っている。すなわち、創部において血管新生を制御することが強く予想されるマクロファージ、ニューロンなどとの空間的配置から、これらが血管新生において果たす機能を推定することができる。

4. 研究成果

(1) 皮膚創部における三次元血管ネットワークの可視化

まず、皮膚の完全な再生が期待できる胎生 13 日目のマウス胎仔背部皮膚に全層欠損創を作成し、24 時間後に創部を回収した。既に確立されているプロトコールに従い、ホルマウント免疫染色標本作製し、共焦点顕微鏡 (FV-1000、Olympus) で観察した。創部の浅層、中間層、深層に色分けした染色結果を図 2 に示す。中間層から浅層に存在する血管から創中心部へ向かって filopodia を伸ばす、特殊に分化した tip cell と呼ばれる血管内皮が多数認められた。このことから、胎生 13 日目皮膚創部においては、創傷治癒の早期から旺盛な血管新生を認めること、またその血管新生の様式は発芽 sprouting によるメカニズムが主であることが示唆された。

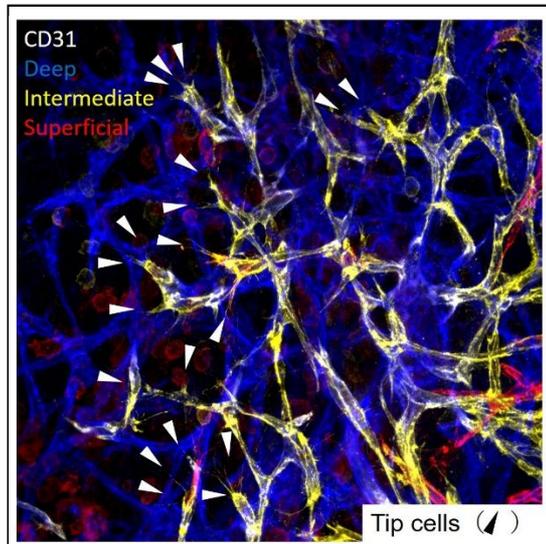


図 2. 胎生 13 日目、24 時間後の創部所見

創の中心部へ向かう旺盛な血管新生が観察される。中間層～浅層における血管新生が目立つ。Filopodia を持つ tip cells を多数認める。

(2) 胎齢ごとの血管新生様式の違い

次に、胎生 13 日目から胎齢が進むことによって、観察された血管新生の様子がどのように変化するかについて調べた。胎生 13 日目と同様に、胎生 14 日目～胎生 17 日目の創部ホルマウント染色標本作成して観察した。胎生 13 日目～15 日目の結果を図 3 に示す。

胎生 13 日目の創部においては、(1) に示した通り、創中心部へ向かって旺盛な血管新生が起こっている様子が観察されたが、胎生 14 日目以降になると、創傷作成 24 時間後の時点ではそれが全く認められないことが分かった。画像を三次元構築して創の断面を観察すると、それがよりはっきりと可視化される (図 3J-K)。創部血管新生の様式に起こるこの変化がどのようにしてもたらされるのか、その詳細なメカニズムは不明であったが、表皮紋理など皮膚の微細な構造も含めた皮膚の完全な再生が可能な時期が胎生 13 日目までである、という申請者らの過去の知見を考え合わせると、本研究で観察された血管新生の有無が、以後の皮膚の再生の可否と関連していることが示唆された。

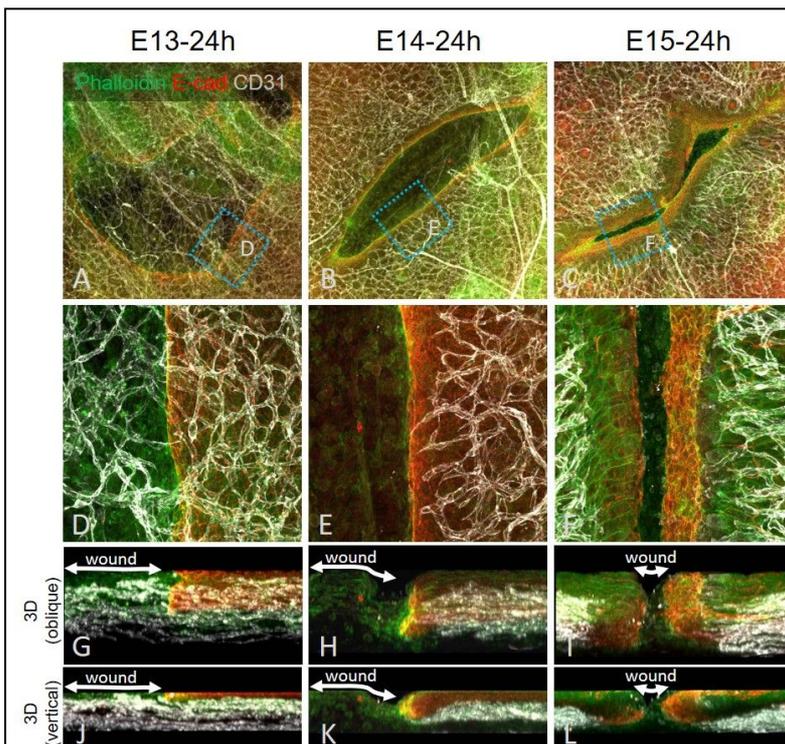


図 3. 胎齢の進行に伴う創部血管新生様式の変化

胎生 13 日目の創部では創表面に近い部に新生された密な血管ネットワークが認められるが、胎生 14 日目以降にはそれが認められなくなる。

(3) 正常皮膚における血管新生の検討

胎仔手術によって皮膚の創傷を作成して観察するモデルは、胎生 12 日目以前は困難であることが以前の我々の予備的研究で示されているが、創部ではなく正常の発生過程における血管新生の様子を調べることにより、上記結果のメカニズムを探る上での重要な知見が得られると考えられた。そこで、正常発生過程の胎仔の皮膚を切り出し、ホルマウント免疫染色標本作成して検討した。

胎生 11 日目の背部皮膚においては、皮膚自体には側胸部を除いて明らかな血管や神経線維のネットワークは存在せず、側胸部においては深層から垂直に立ち上がる神経血管束が認められた。胎生 12 日目、13 日目と進行するのに伴って、側胸部に限局して認められていた神経線維および血管のネットワークが正中方向へ拡大していく様子が観察された。胎生 13 日目になると背部正中で左右の血管網が互いに癒合して全エリアがカバーされることとなった。

このことから、胎生 13 日目以前の時期は生理的に皮膚の血管新生が盛んな時期と重なることが分かった。

皮膚創部においても、この時期に重なる場合には盛んな血管新生が起こり、ひいては皮膚の再生が可能となっている可能性が考えられた。

上記の皮膚における正常な血管新生の様式、および創部における血管新生の様式については過去にほとんど報告がなく独自性の強いものと考えられる。今後、その分子メカニズムについての解析を進め、胎生期の皮膚再生がどのように成し遂げられているのか、また臨床の創傷治療に応用できるものはないか、などの検討を加える必要がある。

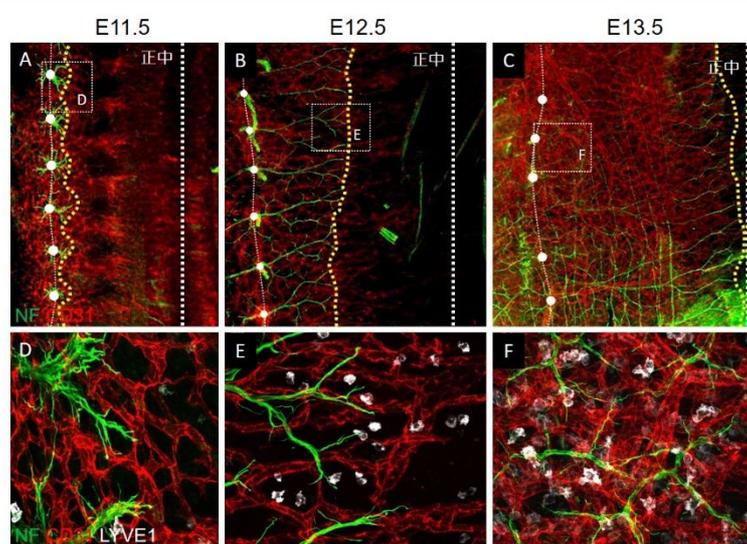


図 4 . 正常発達皮膚における血管および神経ネットワークの形成

胎生 11 日目から胎生 13 日目にかけて、側胸部から皮膚表面に出現した血管および神経が日ごとに伸展して背部正中へ向けてネットワークを形成する様子が観察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡部 圭介
2. 発表標題 血管新生を起点とする瘢痕なき創傷治癒のメカニズム
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----