

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：18K17000

研究課題名(和文) CXCR4陽性マクロファージは皮膚損傷後の癒痕を抑制するか

研究課題名(英文) The role of CXCR4-positive macrophages in skin wound healing

研究代表者

崎尾 怜子 (Sakio, Reiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70723261

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)：皮膚の再生が可能なマウス胎仔の真皮において高発現する遺伝子群を網羅的に探索し、CXCR4を選定した。胎仔手術によって胎生13.5日目胎仔背部皮膚に全層切開創を作成し、以後の創傷治癒を観察したところ、創の中層～浅層の血管新生が盛んに起こる部に近接して、CXCR4陽性マクロファージが存在することが分かった。胎生15.5日目以降の創部においてはこれらの細胞が全く認められなかったことから、この細胞が創部の血管新生や皮膚の再生と関与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

癒痕形成をいかに最小限として皮膚のきずを治癒させるかという課題は現代医学に残された難題のひとつである。ヒトやマウスなど哺乳類は胎仔期に皮膚再生が可能であることから、その要因を探索し、胎仔皮膚でCXCR4が高発現することに注目した。胎仔の創部組織の詳細な観察の結果、再生が可能な時期の創部ではマクロファージがCXCR4を発現すること、これらの細胞は新生中の血管内皮と近接して存在すること、再生ができなくなる時期には存在しないことが判明した。本研究から皮膚再生のメカニズムのひとつにCXCR4陽性マクロファージが関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Mouse embryos can regenerate their full-thickness skin wounds without scar formation before embryonic day 13.5 (E13.5), whereas it is not possible after E15.5. To elucidate the mechanisms associated with skin regeneration, we have analyzed global gene expression of embryonic dermis, and we focused on the gene CXCR4. CXCR4 was expressed by dermal macrophages recruited to the edge of skin wounds in E13.5, but not after E15.5. These cells located near the proliferating endothelial cells inside the wounds, and appeared to be related to angiogenesis, and possibly skin regeneration.

研究分野：創傷治癒

キーワード：創傷治癒 再生 CXCR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする哺乳類の皮膚は、ある程度以上の深さの損傷後には必ず癒痕組織が形成され、修復されることによって治癒する。創傷治癒炎症期に創部へ集積した炎症細胞が病原体や異物を排除し、創が収縮すると同時に組織の欠損を補うべく肉芽組織が形成され、さらにリモデリングによって癒痕組織に置換される、という一般的な治癒様式は、汚染環境での組織損傷や広範囲熱傷など、感染症のリスクが高い場面においては「ともかく一刻も早く治癒させる」という目的に適切合理的である。その反面、清潔な手術による切開創など、さほど感染症のリスクが高くない場面においては、こうして形成される癒痕組織が局所の細胞の遊走や成長因子の拡散を阻害し、進行しつつある再生を阻害してしまうというデメリットがあると推測される。実際、臨床の現場においても、神経損傷後に線維芽細胞の侵入を防ぐ手術材料(ナーブブリッジ®など)や、歯科領域で歯槽骨へ移植することにより骨再生を誘導する(guided bone regeneration)ための足場材料などが活用されているが、これらは早期の癒痕形成を抑制することにより、本来の組織再生を促進する治療法の一つと考えることができる。損傷後に形成された粗大な癒痕組織は、整容的に問題となるのみでなく、癒痕拘縮など機能障害の原因ともなる。癒痕組織形成をいかに抑制するかという問題は、皮膚科・形成外科領域にとどまらず、脊髄損傷後の神経再生、心筋梗塞後のリモデリング、肝臓の慢性炎症に伴う肝硬変の進行など多くの臨床場面に関連し、再生医療の重要な課題の一つと言える。

一方で、イモリの四肢やアフリカツメガエルの皮膚、ヒトを含む哺乳類の胎仔(胎生中期以前)の皮膚などは損傷後にも癒痕を残すことなく治癒することが知られている。この治癒様式の違いのメカニズムを解明することができれば、出生後のヒトの皮膚損傷後に形成される癒痕を予防する有効な治療の開発が可能になると考えられる。本研究は、完全な再生が可能なマウス胎仔皮膚創傷治癒において特異的に高発現する分子である CXCR4 の機能解析を行うことにより、皮膚の再生メカニズムの一端に迫ろうとするものである。

申請者は、これまでに独自に開発したマウス胎仔の皮膚創傷治癒モデルを材料として、皮膚の再生が可能なメカニズムを探求する研究を継続して行ってきた。過去の研究から、マウスでは胎生 13 日目以前に創傷を作成した場合には皮膚が完全に再生するが、胎生 14 日目以降に創傷を作成すると癒痕を残して修復されることが分かり、この間に治癒様式の大幅な転換があることが想定された(図 1)。創部組織を詳細に観察すると、胎生 13 日目の創部においては表皮の進展に先立って、真皮~皮下浅層に相当する組織が創内へ進展することが分かり、これが皮膚再生の鍵となっている可能性が推測された。そこで、各胎齢の創部組織を回収して遺伝子発現を網羅的に解析したところ、胎生 13 日目の真皮~皮下浅層において特異的に高発現する約 100 の遺伝子群を選定することができた(未発表)。ケモカインレセプターである CXCR4 がその上位に含まれており、胎生期の無癒痕性創傷治癒のメカニズムに関連することが示唆された。

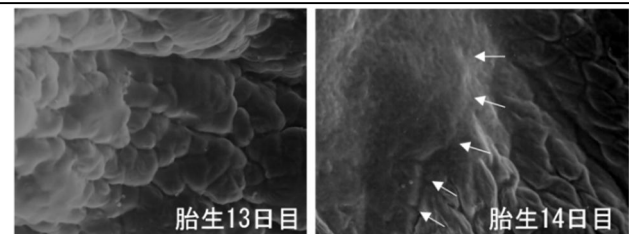


図 1. 創傷治癒様式の転換

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 日目以降は癒痕を残して修復される(右)。

2. 研究の目的

本研究は、この CXCR4 が創傷治癒過程においてどのような役割を果たしているのか、また、創傷治癒を最適化するための治療に応用することができるかどうかをしらべることを目的として行われた。

3. 研究の方法

(1) 胎仔創傷治癒モデルの作成

慶應義塾大学形成外科学教室で過去に開発した胎仔創傷治癒モデルを用いて研究を行った。妊娠 13~17 日目の母体マウスにイソフルレンによる吸入麻酔をかけて開腹し、子宮を体外へ脱出させた。子宮壁、羊膜を小さく切開し、胎仔側腹部に長さ約 2 mm の皮膚全層切開創を作成した。腹腔内へ還納し、創傷作製後 24 時間で組織を回収する。出生後 1 日目の新生仔についてもマイクロ剪刀を用いて側腹部に同様の創傷を作製し、24 時間後に創部組織を回収した。出生後 1 日目の新生仔について側腹部に同様の創傷を作製し、24 時間後に創部組織を回収した。

(2) 免疫染色

作成した胎生 13~17 日目の胎仔皮膚全層切開創を用いた。組織を回収後に 4%PFA、4 で 12 時間固定後、20%スクロースに 48 時間浸漬した。OCT compound (Takara) に室温で 30 分漬けた後にドライアイス上で凍結させた。Cryotome (Zeiss) で厚さ 20 μm の凍結切片を作製した。一次抗体と反応させ PBS で洗浄後、二次抗体と反応させた。使用した抗体は、抗 CXCR4 抗体 (Rabbit polyclonal、アブカム、ab7199)、抗 SDF1/CXCL12 抗体 (mouse monoclonal、R&D systems、clone#79018)、抗 F4/80 抗体 (Rat monoclonal、AbD、clone#A3-1)、抗 CD31 抗体 (Hamster

monoclonal、AbD、clone#2H8)である。

染色した標本は共焦点顕微鏡 (FV-1000、Olympus) で観察、撮影を行った。

(3) in situ hybridization

サンプルには胎生 13~17 日目に創傷作成後 24 時間のマウスの皮膚組織切片および創傷を作成していない皮膚組織切片を用いた。プロトコール通り Probe(CXCR4)、Pre Amp1、Amp1、Label Probe 1-AP の順にハイブリダイゼーションした。

(4) RT-PCR

胎仔手術後 24 時間で組織を回収した。顕微鏡視下に創部を含めた皮膚および皮下組織をマイクロ剪刀で切り出した。対照として、創傷を作成していない胎仔の側腹部皮膚および皮下組織を採取した。RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用い、製造元のプロトコールに則り RNA 抽出を行った。得られた RNA サンプル 8 μ l と RT enzyme mix 2 μ l、緩衝液 12 μ l を用いて Reverse transcription を行い cDNA へ変換した。

Taqman probe (Cxcr4) を用いて定量 PCR を行った。相対定量法 (Ct 法) により遺伝子発現の定量を行った。Gapdh を internal control として使用し、E13 対照組織の遺伝子発現量を 1 として計算した。

4. 研究成果

(1) 胎仔創傷治癒モデルの作成

マウスに胎仔手術を行い、皮膚全層切開創を作成した。これまでの知見とほぼ同様に、いずれの胎齢のマウスでも約 80% の割合で創傷作成後の胎仔は生存し、サンプルを回収することが可能であった。

(2) 免疫染色による検討

胎生 13.5 日目の創部においては、F4/80 陽性のマクロファージのうち、真皮直下に存在する比較的小型で類円形の細胞において CXCR4 が強く発現していた (図 2A-D)。創部以外の組織においては同様の細胞は認められなかった。また、創部のより深部に存在する比較的大型でアメーバ状の形態をとるマクロファージにおいては CXCR4 の染色性が弱かった。胎生 17.5 日目の創部においては、創部へ集積する多数のマクロファージを認めるが、CXCR4 陽性の細胞はほとんど認め

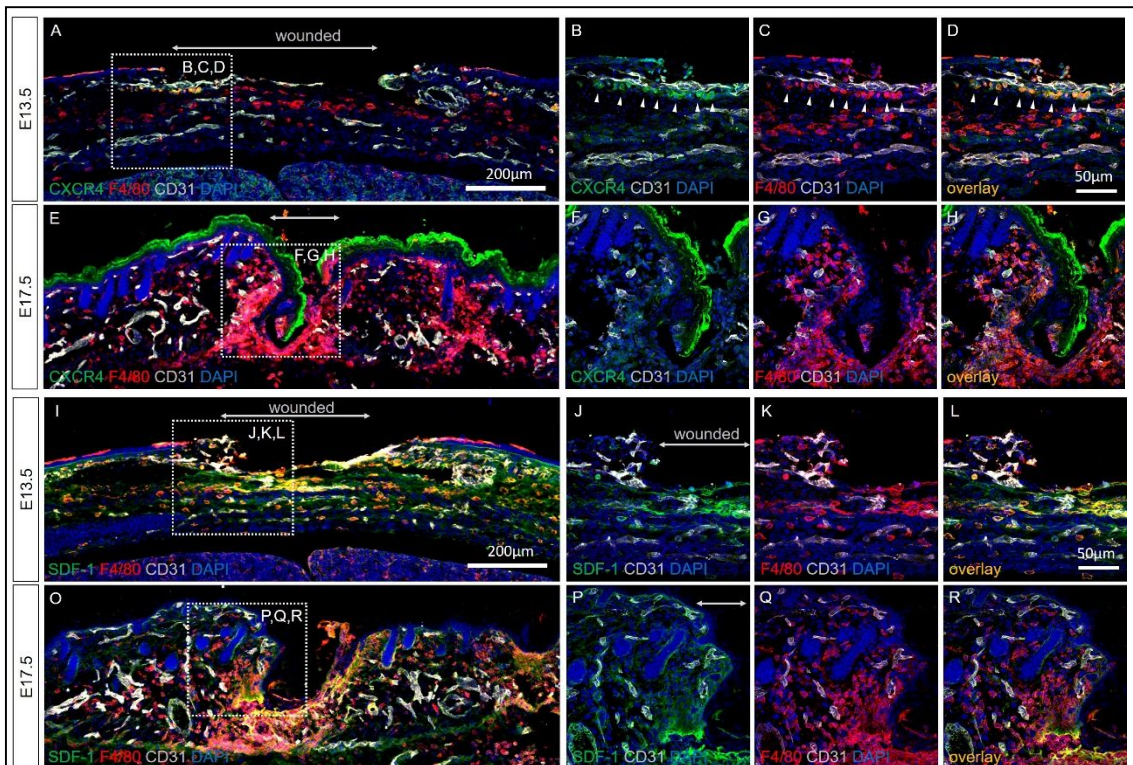


図 2. 胎生 13 および 17 日目、24 時間後の創部免疫染色

胎生 13 日目創部においては、創表面に近い層で F4/80 陽性、CXCR4 陽性のマクロファージと考えられる細胞が観察され、新生血管と近接する様子が観察された (A-D)。胎生 17 日目においては、可視範囲に CXCR4 陽性のマクロファージは認めなかった (E-H)。SDF-1 について、胎生 13 日目の創部においてはマクロファージおよび細胞外基質で染色陽性となり (E-H)。また胎生 17 日目創部においては主に細胞外基質で陽性であったが、マクロファージにおける発現は弱かった (I-L)。

られなかった(図 2E-H)。SDF1 については、胎生 13.5 日目の組織では F4/80 陽性のマクロファージ、および細胞外基質において染色が強かった(図 2I-L)。一方、胎生 17.5 日目の創部においては細胞外基質の染色は認められたが、F4/80 陽性の単球/マクロファージの SDF1 染色性は比較的弱かった(図 2O-R)。

(3) in situ hybridization による CXCR4 の検出

胎生 13.5 日目の組織においては、創部、健全皮膚組織いずれにおいても紫色に染色される陽性細胞がスポット状に散見される。これらは免疫染色の結果を考慮すると組織に在住するマクロファージである可能性が高いと考えられた。胎生 15.5 日目、17.5 日目の組織では、表皮基底層および毛包組織において陽性細胞が認められたが、全体的な分布は胎生 13.5 日目と比較して減少していた。創部近傍の毛包組織において陽性細胞が多い傾向を認めた(図 3)。

(4) RT-PCR による CXCR4 の検出

胎生 13 日目～生後 1 日目(P1)のマウスに作成した創部および対照として創傷を作成していない littermate の皮膚・皮下組織を採取した。いずれの胎齢においても正常皮膚と比較して創部組織において発現が高かった(図 4)。胎生 13.5 日目の創部において最も発現が高く、胎齢の進行に伴って発現が減少する傾向を認めた。

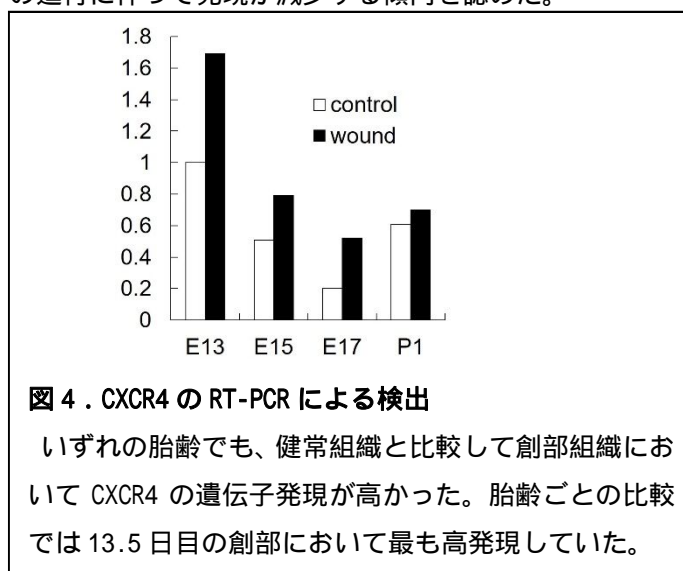


図 4 . CXCR4 の RT-PCR による検出

いずれの胎齢でも、健全組織と比較して創部組織において CXCR4 の遺伝子発現が高かった。胎齢ごとの比較では 13.5 日目の創部において最も高発現していた。

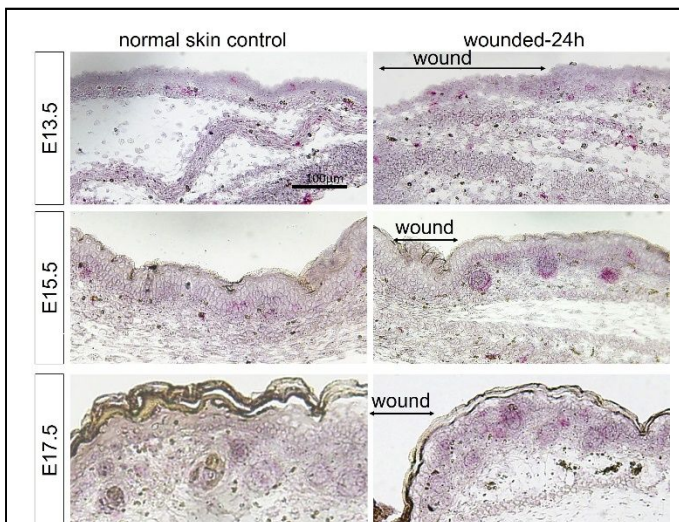


図 3 . CXCR4 の in situ hybridizaion による検出

胎生 13.5 日目の組織では創部および健全組織で陽性細胞が散見された。胎生 15.5 日目、17.5 日目では比較的少数であった。

CXCR4 によるシグナルは、特に骨髄造血において幹細胞を維持するために必要であることが知られ、また神経の発生に必須であるためノックアウトマウスは胎生致死となることが報告されている(Nagasawa et al Nature 1996, Tachibana et al Nature 1998, Zou et al Nature 1998, Sugiyama et al Immunity 2006)。しかし、皮膚の創傷治癒における機能はほとんど知られておらず、胎子の無瘢痕性創傷治癒との関連については報告がない。本研究において、われわれが独自に開発した胎仔皮膚創傷治癒モデルを用いて皮膚創傷部位における CXCR4 およびその主なりガンドである SDF-1 の

発現を検討した結果は、渉猟し得る限りでは唯一の知見である。

皮膚の再生が可能な胎生 13.5 日目創部において特に CXCR4 は高発現し、その由来としては真皮直下に存在するマクロファージである可能性が高い。また、血管新生の盛んな部と空間的に関連が強い様子が観察され、本細胞が CXCR4 を介して創部の血管新生および皮膚の再生と関連している可能性が示唆され興味深い。今後、コンディショナルノックアウトなど遺伝子改変動物を用いた更なる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----