

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03815

研究課題名(和文)コンディショナルノックアウトマウスを用いたマウス胎仔皮膚再生メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of skin regeneration in mouse fetuses using conditional knockout mice

研究代表者

貴志 和生 (Kishi, Kazuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：40224919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の胎仔は、ある時期までの皮膚創傷は素早く、そして瘢痕を残すことなく完全に元通りに再生する。われわれは、胎生13日(E13)までのマウス胎仔の皮膚創傷は完全に再生するがE14以降の胎仔皮膚は再生せず傷跡を残すことを発見した。これまでの皮膚が完全に再生する前後の比較から、それぞれの時期に特徴的な遺伝子発現を同定した。この中からケラチン14(CK14)とケラチン17(CK17)の発現部位でアクチン重合を制御することで、通常なら傷痕が残るマウス胎仔を、傷跡を残さず跡形なく再生させることができるか否かの検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、K14,K17の発現部位で、アクチンの重合を変化させても皮膚の完全再生に至ることはなかったが、表皮の遊走は完全にブロックし、これによりactin cableの形成は可能であった。皮膚の完全再生には真皮の役割も関わっているため、今後真皮の動態も同時に変化させることで、皮膚の完全再生に迫ることができるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mammalian fetuses regenerate skin wounds up to a certain age quickly and completely without scarring. We found that skin wounds on mouse fetuses up to embryonic day 13 (E13) regenerate completely, but fetal skin after E14 does not regenerate and leaves scars. By comparing the skin before and after complete skin regeneration, we identified the gene expression characteristic of each period. By regulating actin polymerization at the expression sites of keratin 14 (CK14) and keratin 17 (CK17), we verified whether or not it is possible to regenerate mouse fetuses, which normally leave scars, without leaving any scars.

研究分野：形成外科

キーワード：皮膚 再生 胎仔

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の胎仔は、ある時期までの皮膚創傷は素早く、そして瘢痕を残すことなく完全に元通りに再生する。われわれはこれまで、胎生 13 日 (E13) までのマウス胎仔の皮膚創傷は完全に再生するが E14 以降の胎仔皮膚は再生せず傷跡を残すことを発見した。そのメカニズムを解析すべく、これまで、創傷作成後の組織切片からレーザーマイクロダイセクションとマイクロアレイを用いて詳細に発現遺伝子の比較と絞り込みを行ってきた。皮膚に創傷が作成されても瘢痕を残すことなく、再生させようという研究は再生医学の研究の発展に伴って、世界的にも非常に注目されている。完全に皮膚を再生されるということは、色調の問題以外に、毛包や汗腺を含めた皮膚付属器、肌理(きめ)の再生、さらに真皮の異常な線維化を制御できるか否かにかかっている。これまで行われてきた、様々な瘢痕の線維化を抑制させようという試みは、肺線維症、肝硬変など多くの線維性疾患を解決する糸口になり、非常に大切な分野ではあるが、皮膚付属器を含めた皮膚の完全な再生を考えると、線維化の抑制のみでは不十分である。毛包原基を培養し、移植し、再生させようという試みは、近々臨床応用されようとしているほど進歩しているが、遺伝子発現の調整で皮膚付属器を含めた皮膚を再生させることは、未だ実現していない。一方で、哺乳類でもある発生段階までの胎仔は、皮膚付属器を含めた三次元的な構造を完全に再生する能力を有している。またこれは、発生の途中で皮膚が完全に再生する時期からしない時期に急速に変化するもので、その前後の変化を比較することで瘢痕形成と再生の分子メカニズムを検討するモデルとしては理想的である。マウスでは、この切り替わる時期の手術操作が技術的に困難で、ブラックボックスであったが、われわれは独自に開発したマウス胎仔創傷モデルを用いて、胎生 13 日と 14 日のわずか 1 日で、創傷後の皮膚が再生する状態から再生しない状態に切り替わることを見出し、世界的にも高い評価を得ている。

その後の研究で、E14 の創傷部位も創傷作成後 24 時間までは、E13 と同様に創傷作成後初期の段階では一部再生することが明らかとなった。このため、再生/瘢痕形成を交換する鍵となる遺伝子を絞り込んで見出すためには、E13 と E15 の創傷後 24 時間の創傷部辺縁と同じマウスの正常皮膚の 4 者の比較を行うことが必要で、マイクロアレイを用いた発現遺伝子の差異の絞り込みを行ってきた。そのうち二つの遺伝子については、遺伝子改変マウスを用いて皮膚との再生について調べ、twist2 ノックアウトマウスを用いた研究で、完全な皮膚の再生に不可欠であることを発見した。さらに、大きな違いとして、E13 の創傷部では、表皮辺縁に actomyosin の重合体である actin cable が形成され、これの巾着様の収縮により、皮膚の構造が完全再生するが、E15 以降では表皮細胞が創傷作成後初期から分裂し、遊走することを見出した。われわれは、E15 以降の創傷部で肥厚した表皮内でケラチン 17 (CK17) が特異的に過剰発現することを見出した。創傷部辺縁部での表皮細胞の分裂と遊走は、表皮細胞の位置値を含めた性質を変化させ、真皮線維芽細胞との相互作用を乱すので、結果として再生は行われなくなると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、それら一連の研究の絞り込みから判明した、CK17 と actin cable について、コンディショナルノックアウトマウスを用いて、胎仔皮膚再生との関連を調べ、そのメカニズムを解析し、成獣でも皮膚を完全に再生させる方法を開発し、創薬に結び付けることを目的とした。皮膚再生の直接的な原因と考えられる E13 創傷部の表皮 actin cable を、局所で遺伝子発現を制御することで変化させ、皮膚再生が阻害されるか、また、表皮細胞が分裂・遊走を行う表皮に一致して発現する CK17 の発現部位で、CK17 の発現を抑制し、また局所的に遊走に関わる葉状仮足の形成を抑制することで、皮膚を完全に再生させることができるか、である。Actin はすべての細胞に存在し、生命維持に必須のタンパク質であるので、actin 自体の動態を全身的に変化させると胎仔致死に至るので、創傷部辺縁での局所的な遺伝子制御が必須である。

本研究の目的は、これまでのわれわれの研究から絞り込んだ、E13 の皮膚の完全な再生を中心的に促していると考えられる actin cable 形成、また E15 以降の創傷部の皮膚の再生を乱していると考えられる CK17 の過剰発現を局所で改変し、皮膚を再生させる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究は、われわれが発見した、マウスでは皮膚創傷が再生する時期から傷跡を残す時期に胎生 13 日と 14 日のわずか 1 日で切り替わるという非常にクリアカットな現象を基に解析を行っているということである。また、胎仔の皮膚再生は創傷治癒が進むと同時に発生が進むという特殊性があるが、これを同一胎仔の正常皮膚との比較を行うことで、発現に差異のある遺伝子を厳密に観察してきた。その中で、actin cable は胎生 13 日の創傷部位で特異的な重合を形成するのを認めた。また、CK17 は胎生 15 日以降で創傷部での特異的な発現上昇を認めた。これらの遺伝子のその上流、または下流でどのようなメカニズムで皮膚再生に影響を及ぼしているか、あるいは、それらの遺伝子が確実に皮膚再生に影響を及ぼすものであるか否かを証明し、創薬に結び付けるには、コンディショナルノックアウトマウスを用いた研究が必須であった。本研究では、コンディショナルノックアウトマウスを用いて、皮膚創傷後に傷跡を残す時期のマウス胎仔表皮角化細胞に actin cable を作成させることで、皮膚が完全に再生するか否かを検討することを目的とした。つまり、アクチン重合と CK17 の制御により、通常なら瘢痕を形成する胎生 15 日のマウス皮膚を、胎生 13 日と同様に跡形なく再生させることが可

能か否かを観察することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、表皮特異的に cre リコンビネースをタモキシフェン投与下でコントロールできる STOCK Tg(KRT14-cre/ERT)20Efu/J、CK17 ノックアウトマウス B6N(Cg)- Krt17 tm1.1(KOMP)Vl cg /2J、CK17 発現細胞特異的 cre リコンビネースを発現する C57BL/6N Krt17tm1(cre,Cerulean)Murr/GrsrJ、とアクチン重合を制御することができる遺伝子改変マウス STOCK Rac1 tm1Djk /J、B6(Cg)-Rhoqtm1.1Pkm/J を用いて研究を行った。コンディショナルノックアウトマウスはすべて米国 Jaxson lab から購入を行った。これらコンディショナルマウス購入後、当研究室で交配させた。妊娠マウスに対して胎仔手術を行うので、十分な数のマウスの確保が必要であった。実際に胎仔手術が可能になったのは、2019 年度後半になってからであった。また同時に、これまでの研究で明らかとなった胎生 13 日の actin cable 形成のメカニズムをより詳細に検討した。ICR 妊娠 13 - 15 日目の妊娠マウスに胎仔手術を施し、直径 1 mm の円形の皮膚欠損創を作成し、actin cable の形成と細胞膜、核を 3 重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で、actin cable 形成の時期から、細胞遊走への時期の切り替わりことを明らかにして観察を行った。また、Rac-1, cdc42, Rho 等の actin 重合に関わる制御因子の発現を免疫染色で確認した。細胞膜を含めた 3 次元的な詳細な形態を撮影し、表皮角化細胞の創閉鎖に関わる立体的なそれぞれの役割、各細胞ごとの actin 重合に関わる制御因子の発現を立体的に観察した。また、マウス胎仔にエレクトロポレーションで siRNA 試薬を効率的に皮膚に導入し、遺伝子ノックダウンを行ったうえで組織培養を行った。E13-E15 の ICR マウス胎仔皮膚にエレクトロポレーションで、Rac,Rho,CK17 などをそれぞれの時期にノックダウンを行い、組織培養下での形態の変化を観察した。E13 の創傷部の表皮が、actin cable による巾着縫合のように収縮することで、皮膚の完全再生が認められるが、E15 以降は表皮細胞の分裂と遊走により、表皮の位置値の変化ないし 間葉系細胞との相互作用の変化により皮膚が再生することなく傷跡として認められることとなるので、表皮角化細胞では CK14 を発現しているが、タモキシフェン依存性に Cre を発現する STOCK Tg(KRT14-cre/ERT)20Efu/J と、細胞の遊走を起こさせる葉状仮足を形成する中心的なタンパクである Rac を flox で cre 存在下に発現をノックアウトできる STOCK Rac1 tm1Djk /J とを掛け合わせ、E13-E15 で胎仔手術を行った。同様にストレスファイバーを制御する Rho を flox で cre 存在下に発現をノックアウトできる B6(Cg)-Rhoqtm1.1Pkm/J と掛け合わせ、E13- E15 で胎仔手術を行った。この際、タモキシフェンを 4 日間投与した後に創傷を作成した。actin cable の 形成を皮膚特異的に消失させ、また、胎生 15 日の創傷部では、細胞遊走を抑制させ、それぞれ胎生 13 日の創傷部は傷跡を残し、胎生 15 日の創傷部は、完全に再生するようになるかを観察した。さらに、創傷作成後、まず 72 時間後の創が閉鎖した後の形態観察を行った。キーエンス高解像実態顕微鏡を用いた表面の構造を観察した。whole mount の血管、神経の免疫染色と共焦点顕微鏡による観察を行い、3 次元的な、肌理、毛包、真皮、血管、神経の形態がどのように変化しているかを観察した。さらに、創傷作成後、様々な時間後にサンプルを採取し、E13 では actin cable の 形成阻害、E15 では表皮細胞の遊走阻害が認められるかの検討を行った。

4. 研究成果

(1) E13 の創傷部の表皮が、actin cable による巾着縫合のように収縮することで、皮膚の完全再生が認められるが、E15 以降は表皮細胞の分裂と遊走により、表皮の位置値の変化ないし 間葉系細胞との相互作用の変化により皮膚が再生することなく傷跡として認められた。E13 の創傷部で actin cable が確認されたが、詳細な共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、これは、従来報告されている様な細胞間をまたぐような actin の束ではなく、細胞が創辺縁に垂直に進展し、その後細胞が収縮し、それに伴い創傷部が再生されるものと考えられた。その中で、創傷側の F-actin が増強され、また、この F-actin は細胞膜に E-cadherin を介して、つなぎ留められている像が観察された。

(2) 組織培養で、E13-E15 の ICR マウス胎仔皮膚にエレクトロポレーションで、Rac,Rho,CK17 などをそれぞれの時期にノックダウンを行い、組織培養下での形態の変化を観察したところ、それぞれ、表皮角化細胞の細胞増殖や遊走が制御されることが観察された。

(3) タモキシフェン制御下に rac と rhoq を表皮細胞特異的に制御できるマウスの交配を行い、予備実験で 4 日間のタモキシフェンの腹腔内投与でこれらの発現が的確に発現が制御できていることが確認できた。その後、まず、成獣マウスを用いてこれらの遺伝子の表皮での変化が創傷治癒にどのような影響を及ぼすかの観察を行ったが、成獣マウスでは Rac-1 の表皮での発現の抑制により、上皮化の明らかな遅延が観察された。また、表皮辺縁に actin cable 様の stress fiber の形成も確認された。成獣の創傷治癒では、表皮は細胞分裂と細胞遊走により引き起こされることが示されているが、細胞遊走には lamellipodia の形成が必須である。このため、成獣で rac-1 を表皮特異的にノックダウンすることで、細胞遊走が影響を受けることは、予想されたが、上皮化がほぼ完全に停止したのは、驚くべきことであった。創傷部辺縁では、actin cable 様の構造物が観察されたが、上皮化の遅延のため、炎症反応は増強し、結果として皮膚が完全に再生することはなかった。

(4) マウス胎仔 E15 に対して、K14 特異的に rac-1 のノックダウンを行い、創傷を作成したところ、actin cable 様の構造物は共焦点顕微鏡での whole mount の観察で確認することができた。しかし、創傷作成後 72 時間では、肌理の再生は観察されず、E15 の創傷部を E13 と同様に跡かたなく再生させることはできなかった。

(5) CK17 の制御下のアクチン重合の制御により、胎仔創傷治癒に及ぼす影響を観察した。その結果、CK17 ノックアウトにより、正常の皮膚に存在する肌理は平坦化する傾向にあった。また、E14 以降の創傷部のマウスで観察される創傷部辺縁の表皮分裂を表す表皮の肥厚は抑制された。これらのことから、CK17 が表皮角化細胞の分裂に影響を与えていることが示唆された。さらに、CK17 発現部位での rac-1, rhoq の発現制御を行ったが、いずれの場合も皮膚が完全に再生することはなかった。

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
研究分担者	久保田 義顕 (Kubota Yoshiaki) (50348687)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	
研究分担者	岡部 圭介 (Okabe Keisuke) (50445350)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	
研究分担者	荒牧 典子 (Aramaki Noriko) (80365311)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

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