

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18915

研究課題名（和文）Fucciマウスを用いた、創傷部組織培養法による各種細胞のリアルタイム動態解析

研究課題名（英文）In vitro wound healing dynamics using Fucci

研究代表者

矢吹 華代（YABUKI, Hanayo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70793305

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）：in vitro 組織培養系における細胞の分裂と移動のデータを基に、これまで細胞分裂と細胞遊走を促進させ、創傷治癒を促進させると報告されている因子を組織培養の培地の中に混入し、組織培養を行い、創傷治癒に与える影響を観察し、細胞分裂が起こっている部分を活性化するのか、あるいは通常の創傷治癒では分裂していない部分を活性化しているのか調べた。細胞培養系を用いた研究でも、同様にそれぞれが細胞分裂と遊走にどのように影響を与えるか、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いてリアルタイムで観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、リアルタイムで細胞の分裂が不明であった創傷治癒過程の細胞の動態を、生体を模擬した形で観察できた。このことから、今後の細胞レベルでの創傷治療薬の開発や、スクリーニングに有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Based on data on cell division and migration in an in vitro tissue culture system, factors previously reported to promote cell division and cell migration and promote wound healing were mixed into the tissue culture medium. Tissue culture was performed and the effect on wound healing was observed to investigate whether the part where cell division occurred was activated or the part which was not divided by normal wound healing was activated. In the study using the cell culture system, we also observed in real time how each influences cell division and migration using a time-lapse fluorescence microscope.

研究分野：形成外科

キーワード：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

近年、糖尿病などによる難治性足潰瘍の増加に伴い、治りがたい創傷をいかに治すかについて、研究が進歩している。また、醜形を残す瘢痕を少なくし、いかに傷を綺麗に治すかについても、さまざまな取り組みがなされている。

創傷治癒過程は、細胞の遊走と分裂で進行する。これまで、さまざまな方法で皮膚創傷後、どの部位で細胞分裂が起きて、創傷部に遊走するかについて検討がなされてきた。しかしこれらは固定標本を用いた検討がほとんどで、リアルタイムで細胞がどのように分裂し、創部に遊走しているかについて、これまで同時に観察しているものはなかった。Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)は、生細胞の細胞周期をリアルタイムに観察することが出来る蛍光プローブである。本研究では、遺伝的に Fucci を組み込んだマウス (Ficci マウス) を用いて、申請者が新たに開発した創傷部組織培養法で、皮膚創傷後の細胞の移動と分裂をリアルタイムで観察した。さらに、同マウス由来の表皮細胞ならびに線維芽細胞培養系を用いて in vitro の創傷治癒モデルを用いて細胞の分裂と移動を、創傷部組織培養法で観察することを目的とした。

2. 研究の目的

創傷治癒過程は、細胞の遊走と分裂で進行する。これまで、さまざまな方法で皮膚創傷後、どの部位で細胞分裂が起きて、創傷部に遊走するかについて検討がなされてきた。しかしこれらは固定標本を用いた検討がほとんどで、リアルタイムで細胞がどのように分裂し、創部に遊走しているかについて、これまで同時に観察しているものはない。本研究では、Ficci マウスを用いて、申請者が新たに開発した創傷部組織培養法で、皮膚創傷後の細胞の移動と分裂をリアルタイムで観察し、さらに、同マウス由来の表皮細胞ならびに線維芽細胞培養系を用いて in vitro の創傷治癒モデルを用いて細胞の分裂と移動を、創傷部組織培養法で観察することを目的とした。

創傷治癒の問題を解決するために、正常の創傷治癒過程のメカニズムを理解することが必須であるが、正常の創傷治癒過程の中でも、血管内皮前駆細胞や fibrocyte の発見など、最近の分子生物学的研究手法や可視化技術の発達とともに、これまでの創傷治癒のメカニズムの理解とは異なった、新たな知見が見出されるようになってきている。創傷治癒過程は、主に表皮細胞や線維芽細胞など、細胞の分裂と遊走で進行する。これまで、創傷後のさまざまな時間の後の組織切片を用いて、局所の細胞分裂や遊走の状態は観察されているが、細胞分裂と遊走を同時にリアルタイムで観察した研究はなかった。Fucci は、生細胞の細胞周期をリアルタイムに観察することが出来る蛍光プローブである。細胞周期の特定の時期にのみ存在する Geminin と Cdt1 という 2 つのタンパク質に、それぞれ緑色 (monomeric Azami-Green1: mAG1) とオレンジ色 (monomeric Kusabira-Orange2: mKO2) の 蛍光タンパク質を融合することで、細胞周期を可視化できるようにしたプローブである。これらを細胞に導入することで、S/G2/M 期に緑色、G1 期にオレンジ色の蛍光が核に観察される。Geminin は S/G2/M 期に増加し、G1 期には存在しないが、Cdt1 は G1 期に増加し、S/G2/M 期には存在しない。このため、細胞周期の各時期をリアルタイムに観察することができる。生体内の細胞や培養細胞が、どのように移動しているかを観察するには、タイムラプス撮影法が強力なツールとなる。

当教室では成獣の創傷部を切り出して特殊な状況で組織培養を行うことで、創傷部への細胞移動の様子を観察することが可能になっている。本研究の目的は、創傷作成後の表皮角化細胞と線維芽細胞が、組織の中でどのように細胞分裂し移動するかをリアルタイムで観察することであった。

創傷治癒において、細胞分裂と遊走は基本である。これまで、PCNA や Ki-67 を用いた免疫染色、BrdU 取り込みなどによる創傷後の一時点での細胞分裂を観察した研究は数多く存在する。また、細胞培養下で scratch assay を行い、タイムラプス顕微鏡で細胞の動きを追った報告もある。しかし皮膚組織内でリアルタイムに、表皮角化細胞や線維芽細胞の分裂と遊走を同時にリアルタイムに観察した報告はない。本研究は、マウス皮膚創傷後の組織内で、創傷部に炎症反応が存在する状態で、誰も見たことがない表皮細胞と線維芽細胞の動きを、ほぼ生体内に近似した環境の細胞の動態をリアルタイムに観察することを目的とした。また、様々な薬物に対するそれぞれの細胞の動態をより詳細に観察できるという点で、今後の創傷治癒に関する薬物の効果判定をする際に、生体に近似した状態で観察することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、慶應義塾大学形成外科学教室で開発した in vitro の皮膚創傷部組織培養系を用いて、成獣 Fucci マウス創傷 1 日後、3 日後、7 日後の創傷部の表皮並びに真皮細胞の細胞分裂の状況と、細胞移動の様子を、タイムラプス蛍光顕微鏡撮影で観察した。本方法は、マウス背部皮膚に創傷を加えたのち、薄切し観察するので、創傷治癒に関与している細胞は、すべて含まれている。培地は 10%FBS 添加 DMEM 培地を用いた。また、新生仔 Fucci マウスから真皮線維芽細胞を初代培養し、数継代後コンフルエントに達した後に、in vitro の創傷治癒モデルとされる scratch assay を行い、創辺縁部の細胞の分裂、遊走の変化をタイムラプス蛍光顕微鏡撮影で観察した。これまでの、in vitro の創傷治癒モデルとされた、scratch assay と in vitro の皮膚創傷部組織培養を比較することで、scratch assay の妥当性を検討した。さらに組織培養系における細胞の分裂と移動のデータを基に、これまで細胞分裂と細胞遊走を促進させ、創傷治癒を促進

させると報告されている、bFGF(basic fibroblast growth factor)タンパクを購入し、組織培養の培地の中に混入し、組織培養を行い、創傷治癒に与える影響を観察した。実際に細胞分裂が起こっている部分を活性化するのか、あるいは通常の創傷治癒では分裂していない部分を活性化しているのかを in vivo に近似した状態で観察した。細胞培養系を用いた研究でも、同様に上記の recombinant bFGF を培養線維芽細胞の培地中に、様々な濃度で混入し、それぞれが細胞分裂と遊走にどのように影響を与えるか、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いてリアルタイムで観察を行った。

4．研究成果

本研究では、in vitro の Fucci マウス創傷部位から切り出した創傷部位の細胞分裂と移動について観察を行った。その結果、創傷辺縁で表皮角化細胞の分裂がある程度起こるもの、そのさらに創傷部に比して遠位部での表皮細胞が創傷部に向かって移動する像が観察された。また、一部の細胞は一方向性に創傷部に向かわず、行ったり来たりする像も観察された。

真皮の細胞はほぼ分裂も移動もせず、これはこれまで報告されていた真皮から直接線維芽細胞が肉芽組織に侵入するとの定説を覆すものであった。

In vitro の Fucci の培養皮膚線維芽細胞を用いた研究では、scratch を行った辺縁部での細胞分裂はほぼ認めず、少し離れた位置での細胞分裂が観察された、また、細胞移動は一方向性ではなく、大まかには欠損部に向かってはいるものの様々な方向に移動しつつ欠損部を埋めてゆく像が察された。

それぞれの培養に、bFGF を添加すると、線維芽細胞の増殖と移動は活発になることが観察された。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------