

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791752

研究課題名(和文)

マウス胎仔創傷治癒における炎症反応の解析

研究課題名(英文)

Age-dependent profiles of inflammatory cells recruited to skin wounds of fetal mouse

研究代表者

岡部 圭介 (OKABE KEISUKE)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50445350

研究成果の概要(和文)：哺乳類胎仔は皮膚再生が可能だが、出生後は瘢痕を残すようになる。そのメカニズムの一部として創傷部位における炎症反応が関与していると考えられた。マウス胎仔の創傷部位を観察することにより、真皮が再生しなくなる胎生 17 日目の時期とほぼ一致して多数の好中球が集積するようになること、好中球を胎生早期の創部へ注射すると創傷治癒が遅延すること、好中球エラスターゼが再生を阻害する因子の候補として考えられることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Skin wounds in mammalian fetuses regenerate and do not leave visible scar, but afterwards it is no longer possible. The intensity of inflammatory response seems to be one of the mechanisms underlining this phenomenon. Investigating the profiles of inflammatory cells recruited to fetal wounds revealed that from day 17 of gestation lots of neutrophils started to be recruited to the wounds, which coincided with the ability to regenerate dermal structures and skin appendages. And injecting neutrophils into the skin wounds of early-stage fetuses delayed the healing. Neutrophil elastase seemed to be one of the factors that inhibit early wound healing of mouse skin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：創傷治癒

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、炎症、皮膚

1. 研究開始当初の背景

マウスやヒトをはじめ哺乳類は、胎生の一定時期までは皮膚損傷後に瘢痕を残さずに再生(regenerate)するが、それ以降は硬い瘢痕組織に置換されて修復(repair)される。その詳細なメカニズムは不明であり、複数の要因が関与していると考えられるが、胎仔における皮膚の再生が成体において実現できるようになれば、外傷や手術後の瘢痕、ケロイドの治療など、現在形成外科領域で治療困難とされている疾患の治療への応用が期待

できる。胎仔の創傷治癒過程においては炎症反応をほとんど認めないという特徴があることに注目し、マウス胎仔の皮膚創傷治癒における炎症反応の解析を行うに至った。

2. 研究の目的

マウス胎仔の皮膚創傷治癒過程における炎症反応の解析を行い、それが皮膚の再生時期、修復時期においてどのように変化するかについて検討する。これにより哺乳類の皮膚再生医療実現のための知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔の皮膚創傷治癒における炎症細胞集積の特徴

① 胎生 13 日目から 17 日目の ICR マウスに胎仔手術を行い、背部皮膚に全層欠損創を作成した。

② 12 時間後、24 時間後、48 時間後に組織を回収し、免疫染色によって各組織に集積した炎症細胞を検出した。

(2) 炎症細胞を創部に注射した場合の創傷治癒結果の変化

① 炎症細胞を採取するために、成獣 ICR マウスの腹腔内へチオグリコレート 2ml を注射した。一定時間後に細胞を回収、解析し、後の実験に用いた。

② 回収した細胞を、胎生 13 日目および 14 日目の ICR マウス胎仔背部皮膚創部へ直接注射し、その後 48 時間で組織を回収した。

③ 肉眼的、組織学的に創傷治癒の様子を観察した。

(3) 好中球エラストラーゼ阻害薬の創傷治癒に与える影響

① 成獣 ICR マウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、好中球エラストラーゼ阻害薬 (sivelestat Na) 10mg/kg を創傷作成直後、1 日後、2 日後に皮下注射した。

② 経時的に創部を観察、創傷面積を測定して、生理食塩水を注射した対照群と比較した。

(4) 好中球エラストラーゼ欠損マウスにおける創傷治癒の解析

好中球エラストラーゼ欠損マウスおよび対照群のマウスの背部に直径 20mm の全層皮膚欠損創を作成し、経時的に創部を観察、創傷面積を比較した。

4. 研究成果

(1) マウス胎仔の皮膚創傷治癒における炎症細胞集積の特徴 (図 1)

① 胎生 13 日目から 17 日目までの背部皮膚に全層切開創を作成し、12 時間後、24 時間後、48 時間後に組織を観察したところ、いずれの胎齢においても、創傷作成後 24 時間の時点で集積細胞数が最大になることが分かった。

② 集積細胞数は胎生期の進行とともに増加することが分かった。

③ 胎生 17 日目になると、それ以前には観察されなかった好中球が多数創部へ集積するようになることが分かった。

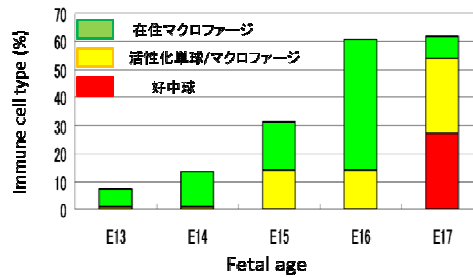


図 1. 胎仔創部へ集積する炎症細胞の分画

胎仔の皮膚創部へ集積する炎症細胞の観察の報告は少なく、胎生期創傷治癒における貴重な知見が得られたものと考えられる。

(2) 炎症細胞を創部に注射した場合の創傷治癒結果の変化

① 炎症細胞を採取する目的で成獣 ICR マウスの腹腔内へチオグリコレートを注射し、一定時間経過後に浸潤した細胞を回収して解析した。回収された細胞数は注射 6 時間後に最大となり、その 95% は好中球であった。以後漸減し、48 時間後の時点では 85% がマクロファージであった (図 2)。

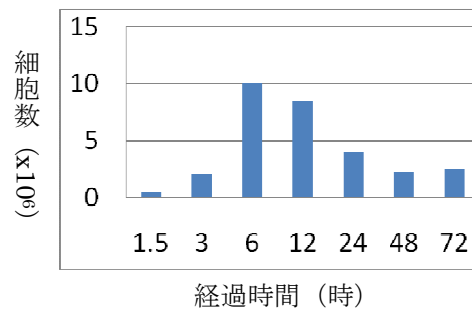


図 2. 成獣腹腔内から回収された浸潤細胞数

② これら細胞を胎生 13 日目および 14 日目の胎仔創部へ直接注射し、48 時間後に組織を回収し、肉眼的・組織学的検討を行った。

好中球を注射した群において、マクロファージを注射した群や対照群 (生理食塩水を注射) と比較して創傷治癒が遅延した (図 3)。

このことから、創部へ好中球が集積することが創傷治癒を遅延させる要因のひとつであることが示唆された。

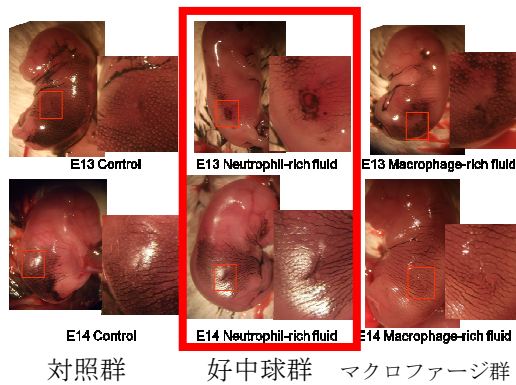


図 3. 胎生早期マウス創部へ炎症細胞を注射した場合の創傷治癒結果

(3) 好中球エラスターゼ阻害薬が創傷治癒に与える影響

① 成獣 ICR マウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、好中球エラスターゼ阻害薬を皮下注射した。経時的に創部を観察、創傷面積を測定したところ、阻害薬注入群において有意に創傷治癒の促進を認めた (図 4)。

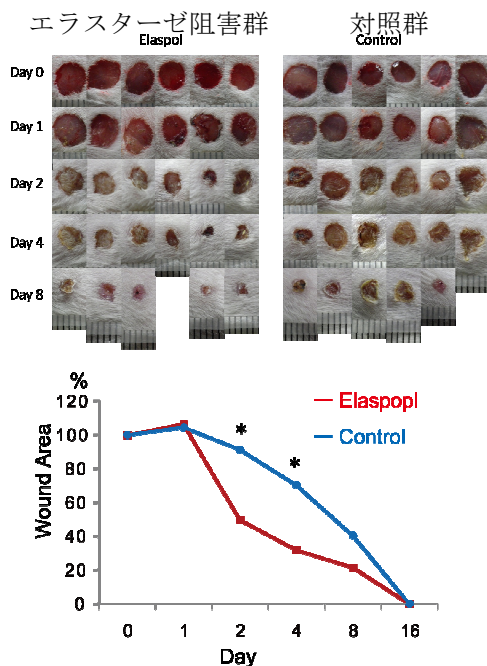


図 4. ICR マウス皮膚創傷治癒における好中球エラスターゼ阻害薬の効果

② 同様の実験を C57B1/6 マウスを用いて行ったところ、創傷面積の変化については有意な違いは認めなかった。しかし、好中球エラスターゼ阻害薬を注射した群においては創縁が円滑であり、また創底部の色調が赤みを帯びている印象があった (図 5)。

これらについては、今後組織学的に検討していく予定である。また癒痕形成の長期的結果についても今後検討する。

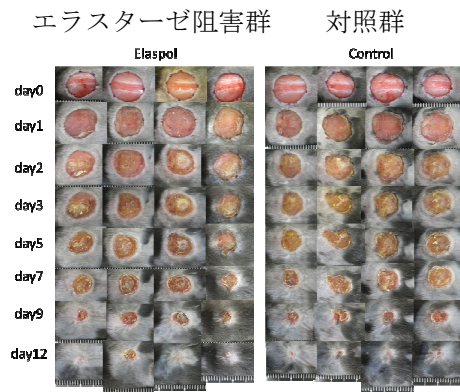


図 5. C57B1/6 マウス皮膚創傷治癒における好中球エラスターゼ阻害薬の効果

(4) 好中球エラスターゼ欠損マウスにおける背部皮膚創傷治癒の検討

好中球エラスターゼを遺伝的に欠損するマウスを用いて同様に背部皮膚に欠損創を作成して観察した。創傷面積の縮小速度は野生型と有意な差を認めなかったが、1ヶ月後に形成された癒痕の幅は、好中球エラスターゼ欠損マウスにおいて明らかに小さかった (図 6)。

以上の結果から、創部へ集積する好中球の分泌するエラスターゼにより癒痕組織の形成が促進され、正常組織構造の再生が阻害されることが示唆された。

好中球エラスターゼの活性を薬剤により調節することにより癒痕形成を抑制するという新たな治療戦略が生まれる可能性がある。



図 6. 好中球エラスターゼ欠損マウスにおける背部皮膚創傷治癒

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計8件)

- (1) 岡部圭介、清水瑠加、貴志和生. 「マウスの皮膚創傷治癒における好中球の役割」、第10回日本再生医療学会総会、2011年3月1日、京王プラザホテル(東京)
- (2) 岡部圭介、清水瑠加、貴志和生. 「マウス胎仔の皮膚創傷治癒に好中球が及ぼす影響」、第40回日本創傷治癒学会、2010年12月2日、都市センターホテル(東京)
- (3) 岡部圭介、清水瑠加、貴志和生. 「マウス胎仔創傷部に集積する好中球が創傷治癒に及ぼす影響」、第19回日本形成外科学会基礎学術集会、2010年9月16日、パシフィコ横浜(横浜)
- (4) Keisuke Okabe, Ruka Shimizu, Kazuo Kishi. Age-dependent Profiles of Inflammatory Cells Recruited to Incisional Skin Wound of Fetal Mouse. 8th National Australian Wound Management Association Conference, 2010年3月26日、パース(オーストラリア)
- (5) 岡部圭介、清水瑠加、貴志和生. 「マウス胎仔皮膚の創傷部位に集積する炎症細胞の変化」、第9回日本再生医療学会総会、2010年3月19日、広島国際会議場(広島)
- (6) 岡部圭介、清水瑠加、貴志和生. 「マウス胎仔皮膚の創傷部位に集積する炎症細胞の変化」、第39回日本創傷治癒学会、2009年12月9日、都市センターホテル(東京)
- (7) 岡部圭介、清水瑠加、貴志和生. 「マウス胎仔皮膚の創傷部位に集積する炎症細胞の変化」、第18回日本形成外科学会基礎学術集会、2009年10月2日、都市センターホテル(東京)
- (8) Keisuke Okabe, Ruka Shimizu, Kazuo Kishi. Stage-dependent Profiles of Inflammatory Cells Recruited to Incisional Skin Wounds of Fetal Mouse. 5th Joint Meeting of The European Tissue Repair Society & The Wound Healing Society, 2009年8月27日、リモージュ(フランス)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 圭介 (OKABE KEISUKE)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号: 50445350

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし