

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09778

研究課題名（和文）マウス胎仔皮膚再生過程における線維芽細胞の移動のメカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of fibroblast migration during embryonic skin regeneration in mice

研究代表者

鎌田 将史（Kamata, Masahumi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60815950

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）：哺乳類の胎仔は、ある時期までの皮膚創傷は素早く、そして癒痕を残すことなく完全に再生する。表皮側の要因としては細胞遊走ではなく、actin cableを形成し、表皮組織を収縮させることで、表皮細胞の位置値を変えずに創が閉鎖するがマウス胎仔皮膚の完全再生のための真皮線維芽細胞の移動のメカニズムについては報告されてこなかった。本研究では、マウスE13からE15の創傷治癒過程を観察し、真皮線維芽細胞の移動を変化させることで、皮膚再生にどのような影響を与えるかを観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癒痕の線維化を抑制させようという様々な試みは、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、皮膚のみならず非常に大切な分野である。線維化の原因は、最終的にはコラーゲンを産生する真皮の線維芽細胞にある。一方で、近年線維芽細胞の多様性が報告されているが、胎生期の真皮の線維芽細胞は、線維化を起こす特徴が少ない、この特徴を知りその動態を変化させて癒痕の有無を調べることは、他臓器の線維化のメカニズムを調べるうえでも必要な研究である。

研究成果の概要（英文）：In mammalian fetuses, up to a certain point, skin wounds regenerate quickly and completely without scarring. The epidermal factor is not cell migration but formation of actin cables and contraction of epidermal tissue, which results in wound closure without changing the positional value of epidermal cells, but the mechanism of dermal fibroblast migration for complete regeneration of mouse embryonic skin has not been reported. In this study, we observed the wound healing process in mice E13 to E15 and observed how altering the migration of dermal fibroblasts affects skin regeneration.

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚に創傷が作成されても癒痕を残すことなく、元通りに再生させようという研究は再生医学の発展に伴って、世界的にも非常に注目されている分野である。完全に皮膚が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、さらに真皮の過剰な線維化を制御できるか否かにかかっている。これまで世界的に行われてきた、癒痕の線維化を抑制させようという様々な試みは、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目指すためには、線維化の抑制のみでは不十分である。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。これを利用して発生段階の中で、皮膚が完全に再生する時期からなくなる時期の変化を比較することで、再生と癒痕形成のメカニズムに迫ることができる。これまでマウス胎仔創傷モデルを用いて、E13とE14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ている。しかし、創閉鎖後に毛包、汗腺、あるいは肌理などの表皮の形態形成のためには、表皮真皮相互作用が必須であるが、これまで、真皮の線維芽細胞がどのようなメカニズムで創傷部に移動しているかについての報告されていなかった。本研究では、皮膚再生の直接的な原因と考えられる表皮真皮の相互作用を乱さず、皮膚再生を引き起こさせるため、真皮線維芽細胞がどのような位置関係を保ちながら移動しているのかを観察した。さらに、その細胞移動の形態が、遊走なのか、あるいは表皮と同じように actin cable の形成により移動しているのかを actin 自体の動態を表皮直下の線維芽細胞でのみ制御できるコンディショナルノックアウトマウスを用いて調べることとした。

2. 研究の目的

哺乳類の胎仔は、ある時期までの皮膚創傷は素早く、そして癒痕を残すことなく完全に再生する。表皮側の要因としては細胞遊走ではなく、actin cable を形成し、表皮組織を収縮させることで、表皮と真皮の位置関係を変えずに創が閉鎖する。本研究以前にマウス胎仔皮膚の真皮線維芽細胞の移動のメカニズムについては報告されてこなかった。また本研究では、マウス E13 から E15 の創傷治癒過程を観察し、真皮線維芽細胞の移動を変化させることで、皮膚再生にどのような影響を与えるかを観察することを目的とした。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真皮線維芽細胞の細胞移動のメカニズムを明らかにし、これにより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。

3. 研究の方法

本研究では、まず、E13、E15 のマウス胎仔に創傷を加え、経時的にどのように真皮が移動してゆくか、その形態を観察した。その後表皮境界部真皮線維芽細胞に発現する twist2 陽性細胞特異的に Cre リコンビネースを発現する B6.129X1-Twist2tm1.1(cre)Dor/J と actin を重合し遊走に関わる葉状仮足を形成する低分子量 G タンパク質である Rac をコードする exon 内に lox-P site を有し、Cre レコンビネースを発現する細胞 Rac をノックアウトすることができる STOCK Rac1tm1Djk/J を交配させ、マウス胎仔手術を行うことで、真皮浅層の線維芽細胞のみに一過性に actin cable の形成を阻害し観察した。ICR 妊娠 13 - 15 日目の妊娠マウスに胎仔手術を施し、actin cable の形成と細胞膜、核を 3 重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。これにより真皮線維芽細胞が、actin cable を形成して創の収縮に働くのか、あるいは細胞遊走により創傷部の閉鎖に働くのかを観察した。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡の 3 次元構築を用いて、真皮線維芽細胞の創傷部辺縁での actin cable の詳細な 3 次元構築を行うことで真皮での actin

actin cable 形成の有無を観察した。これにより細胞膜を含めた 3 次元的な詳細な形態を撮影し、真皮線維芽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。

4 . 研究成果

切り替わりの時期の前後の大きな違いとして、E13 の創傷部表皮辺縁で actin 重合に関わる遺伝子の発現が増強されることを見出した。これを基に E13 と E15 の創傷部を、重合した F-actin を染める蛍光 phalloidin で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、E13 の表皮辺縁には actomyosin の重合体である actin cable が形成され、この巾着様の収縮により、皮膚の構造が完全再生することが観察された。一方で E15 以降では表皮細胞が創傷作成後初期から創傷部辺縁で細胞分裂し、創部に向かって細胞が遊走する像が観察されることが観察された。真皮に関しては詳細な共焦点顕微鏡の phalloidin 染色の立体構築像の観察より、F-actin のメッシュ用の構造が創傷部辺縁全体に構築されているのが観察された。これにより真皮も表皮と同様に actin cable (F-actin)と同様に F-actin の収縮により閉鎖されることが観察された。さらに、本マウス胎仔創傷モデルでは、真皮直下の皮膚肉様筋も同時に切断されるが、E13 の創傷部では、皮膚肉様筋も完全に再生される。皮膚肉様筋辺縁を観察したところ、辺縁に actin cable が形成されている像が観察された。本研究では、表皮境界部真皮線維芽細胞に発現する twist2 陽性細胞特異的に Cre リコンビネースを発現する B6.129X1-Twist2tm1.1(cre)Dor/J、と actin を重合し遊走に関わる葉状仮足を形成する低分子量 G タンパク質である Rac をコードする exon 内に lox-P site を有し、Cre レコンビネースを発現する細胞 Rac をロックアウトすることができる STOCK Rac1tm1Djk/J を掛け合わせることで、真皮での F-actin の重合阻害を試みたが、twist 2 Cre マウスを繁殖させることが、遺伝子改変マウスの状態のためかその後困難となり、施行することができなかった。代わりに actin の重合を変化させる AMPK 活性化剤、抑制剤を *in vitro*, *in utero* で投与を行った。その結果、AMPK の活性化により E14 で皮膚再生をさせることに成功した。

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	貴志 和生 (Kishi Kazuo) (40224919)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (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