

令和 6 年 5 月 31 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：21K09800

研究課題名（和文）マウス胎仔皮膚再生における血管新生の役割

研究課題名（英文）Role of angiogenesis in fetal mouse skin regeneration

研究代表者

竹丸 雅志（TAKEMARU, Masashi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：80748749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトやマウスは胎生中期までは皮膚損傷後の再生が可能であるが、そのメカニズムは不明である。皮膚の再生と血管新生との関連を明らかにするために本研究を行った。胎仔手術によりマウス胎仔皮膚に創傷を作成して観察したところ、再生が可能な胎生13日目の創部では創内への血管新生が認められるが、胎生14日目以降では認められないことが分かった。マウス体幹部皮膚の生理的な血管新生を調べたところ、血管が形成される時期と皮膚再生が可能な時期が重なっていることが分かった。シングルセル解析の血管からも、胎生13日目までの時期は血管内皮細胞が未熟な分化段階にあ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

外傷や手術による傷あとが残存しないようにするという医学的技術は現在確立されておらず、見た目の醜状や疼痛・痒みなどの自覚症状を伴い大きな課題となっている。胎生期に皮膚の再生が可能なメカニズムが分かれば、それを出生後の創傷治療に応用することで、再生に近づけることができると考えられる。本研究によって、血管新生が皮膚の再生と密接に関連するものと考えられた。血管内皮の分化段階を調節することにより創傷治療を最適化するという治療戦略を立てることができ、今後の研究の糸口になるとと思われる。

研究成果の概要（英文）：Humans and mice can regenerate skin after injury until mid-embryonic period, but the mechanism of this regeneration is unknown. The aim of this research was to investigate the relationship between skin regeneration and angiogenesis. We found that angiogenesis was observed in wounds made by fetal surgery on the skin of mouse fetuses, and that angiogenesis was observed in wounds at 13 days of gestation, when regeneration is possible, but not after 14 days of gestation. Physiological angiogenesis of mouse trunk skin was examined, and it was found that the timing of vessel formation coincided with the time when skin regeneration was possible. Single cell analysis of blood vessels also suggested that vascular endothelial cells may be in an immature differentiation stage during the period up to embryonic day 13.

研究分野：形成外科学

キーワード：血管新生 創傷治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

怪我や熱傷による皮膚損傷後に見られる癒痕(きずあと)やケロイドは、直接命に関わるものではないが、現代医学、特に皮膚科・形成外科領域における重要な問題である。胎生期の創傷治癒における無癒痕性創傷治癒 (scarless wound healing) のメカニズムを解明することができれば、著しい癒痕を伴う現行の創傷治療を革新的に改善できると考える。

ヒトをはじめとする哺乳類の皮膚は、通常その修復過程において多かれ少なかれ癒痕形成を伴う。その一方、胎生中期以前は、イモリの切断肢や魚類の切断尾同様、癒痕を残さず元通りに完全に再生することが知られている (Martin et al.1992)。これまでわれわれのグループは、マウス胎仔皮膚創傷治癒の解析において、胎生 13 日目と 14 日目の間にこの「治癒様式の転換」があることを見出している (Kishi et al Br J Plast Surg1999; Wound Repair Regen 2006; Shimizu et al Dermatol Surg 2011)。つまり、胎生 13 日目以前の皮膚に全層切開創を作成すると治癒後は表皮紋理を含めすべての構造が周囲健全皮膚と同等に再生するのに対して、14 日目以降では表皮紋理の再生が起こらず、癒痕組織が形成される。本研究では、イモリ切断肢や魚類切断尾の再生において血管新生が必要であるという知見 (Smith et al Nature 1975; McMillan et al Development 2013) をヒントとし、哺乳類皮膚の無癒痕性創傷治癒における血管新生についてその様式・意義を検討することとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の知見をもとに、胎仔皮膚創傷治癒モデルにおける血管新生の様子について、独自の 3 次元可視化技術を駆使して明らかにすること、またそれを制御する因子の時間的・空間的分布を明らかにす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

本研究では、申請者が過去に開発したマウス胎仔皮膚創傷モデルを用いた。

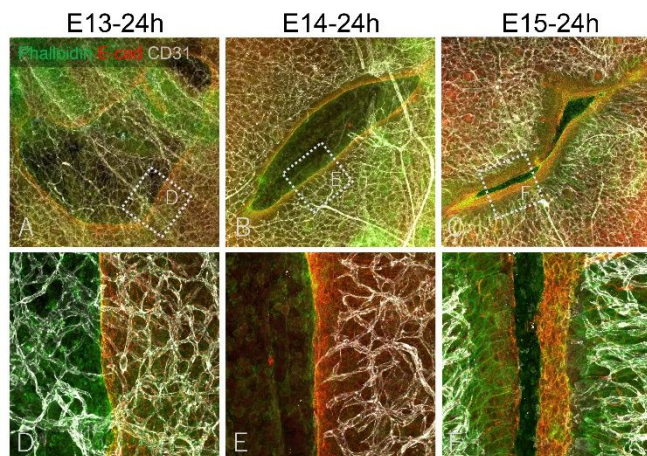
イソフルレン吸入麻酔下の母体マウスを開腹し、体外へ脱出させた子宮壁に小切開を加え、同部より胎仔側腹部皮膚にマイクロ剪刀を用いて全層切開創を作成する。9-0 ナイロン糸で羊膜および子宮壁を縫合閉鎖し、脱出させた子宮を腹腔内へ還納させる。母体 1 腹あたり 4~5 匹の胎仔に創傷を作成する。胎生 13 日目以降の胎仔手術が可能であり、80% 程度の胎仔が生存していた。一定時間経過後に母体マウスを安楽死させ、胎仔の創部組織を回収し、免疫染色や遺伝子発現解析に用いる。

#### (2) 創部組織ホルマウント染色標本の作製と観察

胎仔創部組織は固定前に創部周囲をインクでマーキングしておく。4%PFA を用いて 12 時間 4 で固定する。固定後に顕微鏡視下で創部の腹壁組織を切り出し、肋骨を除去する。0.5%TritonX-100 を添加した PBS (以下、0.5%PBST とする) に当該の 1 次抗体を入れ、全体量 500  $\mu$ l として、組織を振盪させつつ 12 時間 4 で染色する。0.5%PBST で 5 回洗浄後、2 次抗体および DAPI を加えて 6 時間 4 で染色、0.5%PBST で 3 回洗浄する。組織を表皮が上面となるようスライドガラスに配置、水分を除去して包埋材 (ProLong®, ThermoFisher) を添加し、カバーガラスを被せる。24 時間遮光静置する。共焦点顕微鏡 (FV3000, Olympus) で観察、撮影を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 胎齢の進行に伴う創部血管新生様式の変化



胎生 13 日目から胎生 17 日目のマウス胎仔の側腹部皮膚に全層切開創を作成し、24 時間後に組織を回収してホルマウント染色標本作製し観察を行った。CD31 によって染められる血管網について評価したところ、図 1 に示す通り、胎生 13 日目の創部においては 24 時間後の時点で創内に血管網が形成されているのに対して、胎生 14 日目以降の創部においては創内に血管網が形成されていないという違いがあることが分かった。

図 1. 胎齢の進行に伴う血管新生様式の変化-1

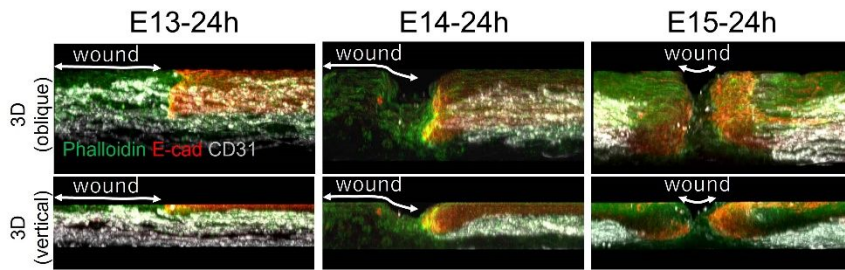


図2. 胎齢の進行に伴う血管新生様式の変化-2

創縁部の画像を3次元的に斜めおよび垂直方向に回転させて観察すると、胎生13日目の創部において24時間後に形成されていた血管網は真皮直下から創部表層へ伸びていることから、実験手技上の不備などで血管網が損傷されずに残存していたもの

ではなく、創傷治癒過程において新たに血管新生が起こったものと考えた。

(2) マウス胎仔における体幹部の血管網の発達

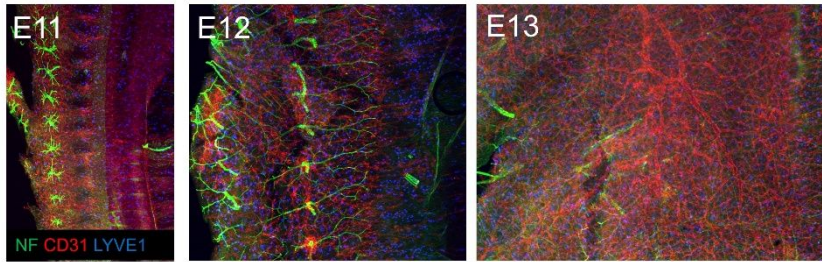


図3. マウス胎仔における体幹部の血管網の発達

次に、創傷を作成せずに、体幹部皮膚のホールマウント染色標本を作製し、胎生13日目以前の血管網が正常の状態でのどのように発達するのかについて調べた。すると、胎生11日目に側胸部・側腹部から分節状に血管・神経束が体幹部皮膚を穿通し、その後、

徐々に背部および腹部へ血管網が拡大し、最終的に胎生13日目頃にすべての皮膚領域が血管網で覆われることが分かった(図3)。つまり、創部において血管新生が起こる胎生13日目までの時期は、体幹部皮膚の正常な発達過程において血管網が形成される時期と一致していることが分かった。

(3) 血管新生因子の空間的分布

血管新生を促進する因子として、vascular endothelial growth factor (VEGF) が最も強力な因子として知られている。各臓器ごとに血管の形成様式やメカニズムは異なるが、低酸素環境において発現する HIF-1 が VEGF 発現の引き金となり、血管網によって低酸素環境が解消されると HIF-1 の発現が低下するとともに VEGF の発現も低下して落ち着くというメカニズムが知られている。そこで、胎仔の体幹部皮膚においても同様のメカニズムが存在するかどうかについて調べることとした。

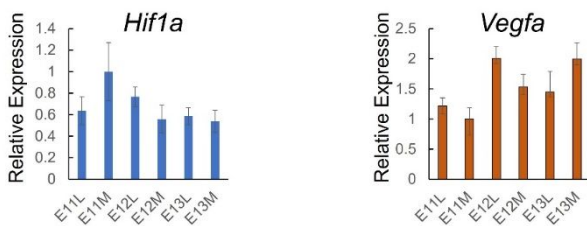
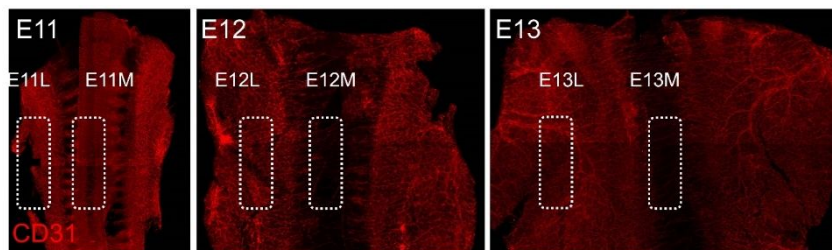


図4. 胎仔皮膚における VEGF-A の遺伝子発現

胎生11日目から胎生13日目までの時期において、既に血管網が形成されている側腹部と、まだ形成されていない背部正中に近い部の組織を採取し、RNAを抽出して real-time PCR を行い HIF-1 と VEGF-A の発現量の推

移を調べた。その結果、意外にも有意差は認められず、体幹部皮膚における血管網の発達には他の分子メカニズムが関与しているものと考えられた。血管網形成のメカニズム、分子的な基盤については今後実験を追加して検討を加える必要がある。

(4) 胎仔皮膚組織のシングルセル解析

最後に、胎仔皮膚創部組織の再生メカニズムを解析するために single-cell RNA sequencing を行った。血管およびリンパ管のクラスターに注目して細胞の分布を検討した予備的結果では、血管内皮とリンパ管内皮の中間的な位置に存在する細胞群が胎生13日目では多く、それぞれの内皮の分化段階が未熟なものであることが示唆された(図5)。

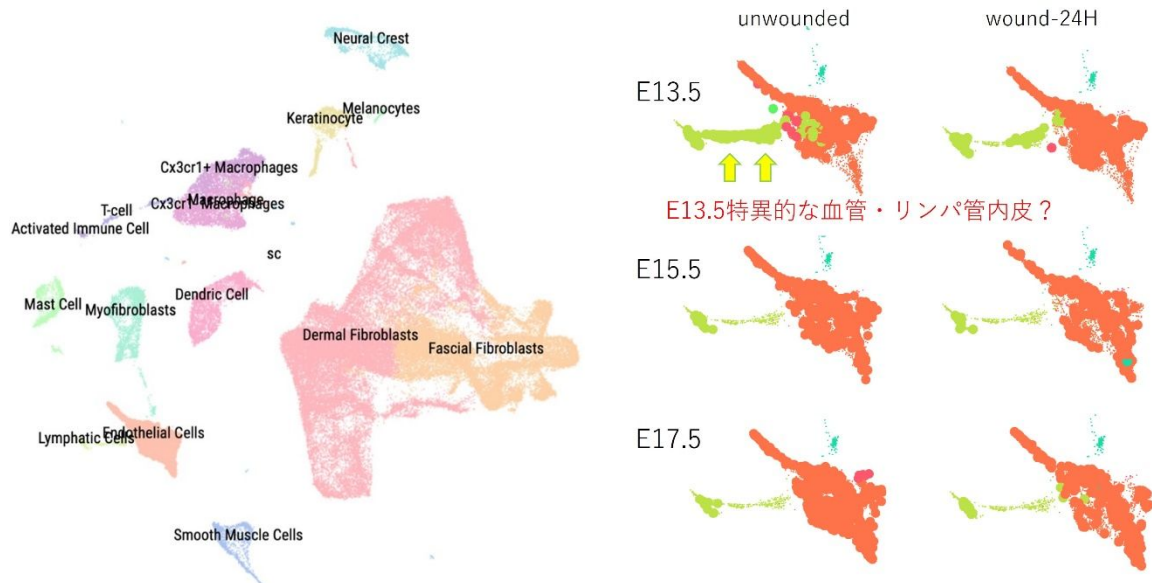


図 5 . 胎仔皮膚組織の single-cell RNA sequencing によるクラスター解析

本研究によって、皮膚の再生が可能な胎生 13 日目までの創部組織においては、創が治癒する以前に血管網が創内で形成されていることが分かった。また、体幹部血管網の発達を観察した実験から、胎生 13 日目までの時期は血管網の生理的な発達段階が終了に近づく時期とほぼ一致することが分かった。シングルセル解析の結果から、この時期の血管およびリンパ管内皮は最終的な分化段階へ到達しておらず、そのために創部での血管新生が可能で皮膚の再生につながっている可能性が示唆された。血管新生が起こるメカニズムについて、本研究では突き止めることができておらず、今後検討する余地があると考えられた。

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