

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16926

研究課題名（和文）皮膚再生に関与するFetalマクロファージの培養を用いた探索的研究

研究課題名（英文）Exploratory study using culture of Fetal macrophages involved in skin regeneration.

研究代表者

酒井 成貴（SAKAI, Shigeki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：00464941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の皮膚は胎生中期以前には損傷を受けても再生するが、それ以降は再生せずに癒傷修復されるようになる。再生する時期のマクロファージは卵黄嚢由来胎生マクロファージであり、創部における形態の変化と動向に関与する。胎生マクロファージの分化機構を知ることは、皮膚再生がどのように癒傷治療に変化するかを知る上での重要な知見となる。本研究では胎生マクロファージの性質に関して培養を用いた研究を行い、形質の変化について観察した。胎生期のマクロファージは接着能が低く、成長因子によって接着能を獲得することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の創傷は癒傷治療するが、時に肥厚し、醜形癒傷となることもある。これらは炎症と線維化に関与しており、これらをコントロールすることによって皮膚の再生が達成できると考えられている。皮膚が再生する胎児期のマクロファージは卵黄嚢由来胎生マクロファージであり、創部における形態の変化と細胞遊走に関与する。胎生マクロファージの分化機構を知ることは、皮膚再生がどのように癒傷治療に変化するかを知る上での重要な知見となる。本研究では胎生マクロファージの性質に関して培養を用いた研究を行い、細胞形質の変化や分化について観察した。

研究成果の概要（英文）：During the embryonic period, the skin regenerates. Macrophages during this period are different in nature and are involved in wound morphology and cell migration. Understanding the mechanisms of macrophage differentiation during the embryonic period will provide important insights into the differences between skin regeneration and scar healing. In this study, we used culture to investigate the properties of embryonic macrophages and observe changes in their morphology.

研究分野：形成外科

キーワード：マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の皮膚は胎生中期以前には創傷が癒痕を残すことなく、皮膚が完全再生する。胎生後期では、創傷を受けた皮膚は再生せずに癒痕修復されるようになる。マウスでも同様の現象が確認できており、胎生 13.5 日と 14.5 日の間に全層皮膚創傷の再生が起きるかどうかの境界があることを報告してきた (Kishi K. Keio J Med 61:101-108, 2012)。胎生期の創部を観察すると胎生 17.5 日以降は好中球などの出現もみられるが、胎生 13.5 日の創傷部はマクロファージのみで覆われていることが判っている。さらに近年、皮膚のマクロファージは胎生 13.5 日までは卵黄嚢由来の Fetal マクロファージのみが存在していることが明らかになった。胎生 13.5 日以降の皮膚では Fetal マクロファージに加え、胎仔肝単球由来の Adult マクロファージが混在する。これらのマクロファージはいずれ二重起源のまま Langerhans 細胞へ分化することが報告されている (J. Exp. Med. 209, 1167-1181 2012) (Immunity. 2015 Apr 21; 42(4): 665-678.)

癒痕治癒は炎症に誘導され線維化による創閉鎖が起こるが、再生は基本的には炎症に起因しない分裂と遊走によるものと考えられている。ただし、胎生期創傷治癒における皮膚再生と Fetal マクロファージの関連について検討した報告は乏しく存在しない。皮膚の再生には Fetal マクロファージによる何らかの因子が関係していることは明白であり、性状・形質などを研究することにより皮膚再生のメカニズム解明という着想を得た。

2. 研究の目的

マクロファージは、M1 と M2 のサブタイプに分類されることは有名であるが、成獣の皮膚創傷治癒では、M2 マクロファージが重要な働きをすることが知られている (Mantovani, A. et al. Trends Immunol. 23, 549-555 2002)。しかし、創傷における Fetal マクロファージは M1 と M2 といった分類とは全く異なる性質であることが申請者の研究で分かってきた。

本研究では、これまで申請者らが報告してきた、胎生 13.5 日の皮膚に傷をつけると 24 時間後には F4/80 陽性のマクロファージが集積することに注目している。前述の Hoeffel, G. らの示した報告をもとに考察すると、これらは卵黄嚢由来のマクロファージに相当する。これまでの研究を踏まえて、皮膚卵黄嚢由来マクロファージのなかでも胎生 13.5 日と胎生 18.5 日には違いがあり、胎生 13.5 日のマクロファージを Fetal マクロファージと呼んでいる。各時期のマウス背部皮膚由来のマクロファージを分離し、Fetal マクロファージがどのように分化し、影響を与えているのかを検討することである。

さらにこの Fetal マクロファージには CX3CR1 が発現することが明らかとなった。CX3CR1 の役割はフラクタルカインと結合し Akt リン酸化が亢進される。CX3CR1 は免疫細胞の中でも病原体や異常細胞の排除など細胞障害性のものに発現していることが知られている。またミクログリアも卵黄嚢由来マクロファージからの分化であることが知られており、CX3CR1 はミクログリアのマーカーとしても用いられている。皮膚では創傷誘発性発毛がマクロファージを介して CX3CR1 と TGF- β 1 依存的に起こることが報告されている (J Invest Dermatol. 2018 Oct; 138(10): 2111-2122.)。胎生期皮膚創傷治癒における Fetal マクロファージと scarless wound healing との関連についての文献は見当たらず、胎生 13.5 日の創傷部で集積する Fetal マクロファージは細胞の遊走や増殖または形質変化をしていると想定され、この役割を知ることが目的であり、皮膚の完全再生と癒痕抑制の新たな治療の先駆けとなると考えている。

3. 研究の方法

本研究では胎生期マクロファージの分化機構を明らかにし、卵黄嚢由来のマクロファージの中でも最も幼弱な Fetal マクロファージに焦点をあて皮膚再生研究を遂行する。Fetal マクロファージをセルソーティングで回収し、Fetal マクロファージを培養し、in Vitro での形質の変化の観察を行う。

8 週齢オスの成獣 ICR マウスと妊娠 ICR マウスを三協ラボサービスから購入した。搬入同日の午前中に吸入麻酔後に頸椎脱臼を行い犠牲死させた。開腹し胎仔を摘出、PBS で洗浄し母体血の混入をなくし、剪刀でホモジネートした。ホモジネート後はコラゲナーゼ処理を行って 37 のインキュベーターで攪拌し、100 μ m セルストレーナーでろ過し、細胞の回収を行った。抗体には抗 CD45 抗体と抗 CD11b 抗体、抗 F4/80 抗体 (Biolegend) を使用し 4 で 30 分間攪拌しながらインキュベートした。フローサイトメトリー (Beckman 社製 MoFlo XDP) を使用し Fetal マクロファージを得た。

培養には 10%FBS 添加 RPMI-1640 培地を使用、37.0、5%CO₂ でインキュベートを行った。またマクロファージの増殖因子である、CSF1 を 10ng/ml で添加実験を行った。

4. 研究成果

(1) Fetal マクロファージの分布の確認

Fetal マクロファージは F4/80 強陽性であり、胎仔では厳密ではないが簡易的に Adult マクロファージとの同定が可能であることがわかった。そこで胎生 13.5 日と胎生 18.5 日の皮膚で比較検討を行った。胎生 13.5 日では皮膚全細胞数中の約 8~10%が F4/80 強陽性のマクロファージであったのに対して胎生 18.5 日では皮膚全細胞数中の F4/80 強陽性マクロファージは 2%程度となっていた。これは他の細胞が増えていることに起因し、全体数は変わっていないと考えられる。また胎生 13.5 日の胎仔全身からホモジネートして採取した胎仔全細胞中の約 3%程度が F4/80 強陽性細胞であり、皮膚の方が全身より回収効率が良いことが確認できた (Fig1)。

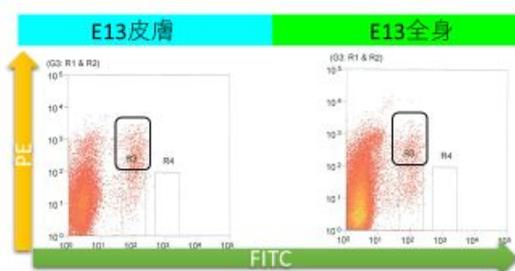


Fig1 胎生 13.5 日 Fetal マクロファージの分布

(2) Fetal マクロファージの培養

回収した Fetal マクロファージを一般的なリンパ球や免疫細胞を培養する RPMI 培地で培養した。培養を開始したが、接着する細胞が少なく、培養は困難であった。成獣のマクロファージは接着能が高く、数時間後には培養皿に接着している。そこで、5 日間メディウムを交換せず、細胞培養上清をフローサイトメトリーにかけたところ、本細胞が細胞上清に浮遊して生存していることが分かってきた。本来本細胞は胎生 8.5 日目に卵黄嚢から血行性に全身へ分布する細胞であり、遊走能が高い性質があり、それを反映していると考察された。

(3) Fetal マクロファージの増殖能と分化能の確認

浮遊している細胞の増殖を観察したが、細胞数は減少する傾向を認めた。それは接着する細胞が増えてくるためであった。そこで、接着細胞と浮遊細胞の細胞数の確認を試みたが、接着細胞

はトリプシン処理でも取れにくくスクレイパーではがすと死細胞も増えてしまった。そこでセルカウンター®を用いて接着細胞と浮遊細胞との総細胞数を計算したが細胞増殖傾向は見られなかった。次にマクロファージの増殖因子である CSF1 (Colony-stimulating factor-1.) を添加し培養を行った。CSF1 の投与により接着細胞の数が増え、浮遊細胞の数が減少した。総細胞数に大きな変化は見られなかった。しかしながら、CSF の投与により Fetal マクロファージが接着細胞へと変化することを確認することができた。元来、成熟したマクロファージは増殖能が低いことが知られている。接着した Fetal マクロファージも同様に増殖能は低い可能性が示唆された。今後の課題としては接着数がばらつくため接着後の細胞数を均一にし、分化誘導を行うことである。

本研究は胎生 13.5 日のマウスの胎仔皮膚創傷が完全に再生することに焦点を当て、その創傷に集積する卵黄嚢由来の Fetal マクロファージについて研究したものである。胎生 13.5 日目の皮膚には約 10% 程度の Fetal マクロファージが存在し、胎生後期になるとその数は減少し、その細胞自体が組織常在性マクロファージおよび Langerhans 細胞の性質を獲得する。本細胞は EMP (erythro-myeloid progenitor) と組織常在性マクロファージの中間的な細胞であり、幼弱な組織常在性マクロファージといえる。全身へ分布する Fetal マクロファージは接着能が低く、培養液中では浮遊して生存していることが確認できた。また浮遊している Fetal マクロファージが CSF の刺激により分化誘導され、接着性のマクロファージに分化していくことが確認できた。現段階で胎生 13.5 日の創傷部位に集積した Fetal マクロファージがどのような機序で皮膚の再生を行っているのかは不明であるが、遊走能が高い細胞であり、組織常在性マクロファージや Langerhans 細胞とは異なる性質を持っている幼弱な卵黄嚢由来のマクロファージであると考えられた。

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

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 胎性マクロファージおよび細胞製剤 | 発明者 酒井成貴 貴志和生 | 権利者 慶應義塾 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、W02023/153479 | 出願年 2023年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|