

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592718

研究課題名(和文)皮膚創傷治癒における血管内皮間葉転換の関与を直接証明する

研究課題名(英文)Evidence of epithelial-mesenchymal transition in skin wound healing

研究代表者

菅原 康志(Sugawara, Yasushi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60260494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： Tie2を発現したことがある細胞がtdTomatoによって赤色蛍光を発現し、コラーゲンtype1がEGFPによって緑色蛍光を発現するTie2Cre;Ai14;COL-EGFPマウスを作製した。作製した遺伝子改変マウスを用いて正常癒痕モデルと肥厚性癒痕モデルを作製し、癒痕を免疫蛍光染色によって解析した。

正常癒痕モデルでは、tdTomato陽性細胞はEGFPを発現しておらず、コラーゲンtype1を産生していないことが確認された。一方肥厚性癒痕モデルでは、tdTomato陽性細胞の一部がEGFPを発現しており、線維化に寄与していることが示された。

研究成果の概要(英文)： We established Tie2Cre;Ai14;COL-EGFP mice in which Tie2-expressing cells were genetically marked with tdTomato and collagen type1-expressing cells expressed EGFP. Using the transgenic mice, we made hypertrophic scar models and normal scar models, and analyzed the scars with immunofluorescent imaging.

In the normal scars, tdTomato-positive cells (tdT-cells) did not express EGFP, suggesting tdT-cells did not produce collagen type 1. In the other hand, tdT-cells in the hypertrophic scars partially expressed EGFP, suggesting tdT-cells contributed to dermal fibrosis.

研究分野：創傷治癒

キーワード：創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

一旦分化した血管内皮細胞が間葉系細胞の性質を獲得することを血管内皮間葉転換 (EndMT: Endothelial Mesenchymal Transition) という。腎臓や心臓における線維化では血管内皮細胞が EndMT を起こして、線維化の原因となる線維芽細胞の大きな供給源となっていることが明らかになっている。例を挙げると、腎臓の線維化における線維芽細胞の中には、EndMT による血管内皮由来細胞が 35% 存在すると報告されている。

ケロイドや肥厚性癬痕は、皮膚創傷治癒の過程における異常な線維化ととらえることができるため、EndMT がこれらの病態に大きく関与している可能性は高い。我々はヒトのケロイド検体において、EndMT のマーカーが高い発現を示していることを確認している。また Yan らは 1 検体からの間接的なデータから、ヒト肥厚性癬痕において EndMT と類似の現象である EMT (Epithelial Mesenchymal transition: 上皮間葉転換) が起こっていることを示唆する報告をしている。しかし、ケロイド・肥厚性癬痕における EndMT や EMT の関与を直接証明した報告はない。

以上を背景として我々は「ケロイド・肥厚性癬痕における皮膚の異常な線維化には、EndMT が関与している」という仮説のもとに本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子改変技術を応用した細胞運命追跡 (lineage tracing) という手法を用いて、創傷治癒・癬痕形成に関与する細胞群の由来を明らかにすることである。

細胞の表面マーカーを用いた解析では、その細胞の由来を特定することは不可能であるが、細胞運命追跡では特定のマーカー遺伝子を発現した細胞が genetic にマーキングされるため、マーカー遺伝子発現後に分化・遊走しても追跡することが出来る。

我々はこの手法を用いて、血管内皮・造血系幹細胞のマーカーである Tie2 発現細胞由来の細胞が、マウスの肥厚性癬痕形成においてどのように寄与しているかを解析した。

## 3. 研究の方法

血管内皮・造血系幹細胞のマーカーである Tie2 特異的に Cre recombinase を発現する Tie2Cre マウスと Cre recombinase を発現したことのある細胞特異的に tdTomato を発現する ROSA26-stop-tdTomato マウス、コラーゲン type1 発現細胞特異的に EGFP を発現する COL/EGFP マウスを交配することにより、Tie2 発現細胞に由来する細胞が赤色蛍光を、コラーゲン type1 発現細胞が緑色蛍光をそれぞれ発現する triple transgenic mouse: Tie2Cre;ROSA26-stop-tdTomato;COL/EGFP マウス (以下 TAG マウス) を作製した。作製した TAG マウスを用いて正常癬痕モデルと肥厚性癬痕モデルを作製し、形成された癬痕組織を免疫蛍光染色によって解析した。

## 4. 研究成果

TAG マウスの正常皮膚の蛍光染色像では、tdTomato 陽性細胞は全て CD31 陽性であり、tdTomato と EGFP の共染色は認められなかった。以上より、TAG マウスにおいて Cre による recombination は正確に機能しており、また正常皮膚における Tie2 由来細胞は全て血管内皮細胞であり線維芽細胞ではないことが確認された。

次に、マウスの肥厚性癬痕モデルを作製した。まず、Aarabi らによって報告されている肥厚性癬痕モデル (延長器による癬痕牽引モデル) を作製したが、再現性に乏しく組織学的な評価を行うに至らなかった。試行錯誤の末、皮膚欠損創に人工真皮を貼付すると一時的に肥厚性癬痕状の組織が形成されることを見出したため、以降これを肥厚性癬痕モデルとして使用した。

続いて、TAG マウスを用いて正常癒痕モデル（皮膚欠損創）と肥厚性癒痕モデル（人工真皮貼付創）を作製し、術後2週と4週において免疫蛍光染色による解析を行った。

正常癒痕(2週)では、tdTomato 陽性細胞が多数認められたが、tdTomato と EGFP との共染色は認められなかった。また正常癒痕(4週)では、tdTomato 陽性細胞はほぼ消失していた。このことから、正常癒痕における Tie2 由来細胞はコラーゲン type1 を発現していないことが示された。

一方、肥厚性癒痕モデル(2週)では、tdTomato 陽性細胞の一部は EGFP を共発現していた。この tdTomato(+)/EGFP(+)細胞は術後4週においても維持されていた。以上より、肥厚性癒痕では Tie2 由来細胞の一部が組織の線維化に関与していることが示唆された。

今回の研究では、癒痕組織に観察された tdTomato 発現細胞が、血管内皮細胞由来なのか造血幹細胞由来なのか確認できなかったが、tdTomato 陽性細胞の数・分布・形態などからは、造血幹細胞由来すなわち血球系細胞であることが示唆された。今後本プロジェクトを継続し、TAG マウスを用いた骨髄移植によって、この点をさらに明らかにする予定である。

## 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 3 件)

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、桂木容子、宮崎邦夫、加持秀明

異常癒痕の病理組織像についての再検討～不均一性についての考察

第 57 回日本形成外科学会総会・学術集会、2014/04/09、長崎

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、山本崇弘 : Cre-loxP システムを用いた皮膚創傷治癒における細胞の運命追跡、第 23 回日本形成外科学会総会基礎学術集会、2014/10/09、松本

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、山本崇弘 : Cre-loxP システムを用いた皮膚創傷治癒における細胞の運命追跡、第 44 回日本創傷治癒学会、2014/12/02、仙台

〔図書〕(計 1 件)

須永中 . 線維増殖性疾患としてのケロイド・肥厚性癒痕 . きずあと・ケロイドはここまで治せる . 克誠堂出版 . 60-64, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

菅原 康志 ( Sugawara Yasushi )

自治医科大学・形成外科・教授

研究者番号 : 00406117

### (2)研究分担者

須永 中 ( Sunaga ataru )

自治医科大学・形成外科・助教

研究者番号 : 00406117

### (3)連携研究者

(        )

研究者番号 :