

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293363

研究課題名(和文) レーザーマイクロダイセクションを用いたマウス胎仔皮膚再生の分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of murine fetal cutaneous regeneration using laser micro dissection system

研究代表者

貴志 和生 (Kishi, Kazuo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40224919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の胎仔の皮膚に実験的に傷をつけても、胎生期のある時期までは傷は素早く、そして癒痕を残すことなく治癒し、皮膚は完全に元通りに再生する。われわれは、胎生13日までのマウス胎仔の皮膚に創傷を作成しても完全に再生するが、胎生14日以降の胎仔は再生せず傷跡を残すことを発見した。これをもとに、組織切片からレーザーマイクロダイセクションを用いて、胎生13日と15日の創傷部の表皮、真皮別にRNAを採取して、正常皮膚と比較することで、胎仔皮膚再生のメカニズムに迫った。

研究成果の概要(英文)：Fetuses, to some developmental stages, have an ability to regenerate skin. We discovered that until embryonic day (E) 13, skin regenerate completely, but after E14, visible mark is left. Based on these data, we compared E13 and E15 wounds using laser micro dissection system and microarray.

研究分野：形成外科

キーワード：皮膚 再生 胎仔 創傷

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の胎仔の皮膚に実験的に傷をつけても、胎生期のある時期までは傷は素早く、そして癒痕を残すことなく治癒し、皮膚は完全に元通りに再生する。われわれはこれまでの研究で、胎生 13 日までのマウス胎仔の皮膚に創傷を作成しても完全に再生するが、胎生 14 日以降の胎仔は再生せず傷跡を残すことを発見した。一方で、組織切片からレーザーマイクロダイセクションを用いて数個の細胞から RNA を採取して、発現遺伝子を解析する技術は飛躍的に進歩し、さまざまな疾患で研究が行われている。本研究は、最新のレーザーマイクロダイセクションと解析技術を用いて、マウス胎仔皮膚再生のメカニズムに迫ることを目的とした。

2. 研究の目的

さまざまな癒痕抑制の研究は、どの程度線維化が抑制されたかという点に主眼が置かれ、その結果明瞭な結果が出ないことが多い。その中で、胎仔の皮膚再生の研究は、発生の途中で皮膚が完全に再生する時期からしない時期に変化するので、癒痕・再生モデルとしては理想的である。われわれは独自に開発したマウス胎仔創傷モデルを用いて、胎生 13 日と 14 日のわずか 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、切り替わりの前後を比較検討することで、皮膚の再生メカニズムに迫る研究を行っている。

その中で、マウス胎生 13 日と胎生 14 日の胎仔の創傷部位から顕微鏡下に採取した組織から、マイクロアレイで発現遺伝子を比較することで、それぞれの創傷治癒過程での特異的な発現パターンを示す遺伝子を知ることができた。この中から特定できた一部の遺伝子をノックダウンすることで、胎生 13 日と 14 日それぞれの創傷治癒が妨げられることを示した。しかし、これらの遺伝子を発現の調整を行っても、成獣で創傷作成後に、皮膚を跡形なく再生を引き起こすには至っていない。この原因は、当初の研究で組織の採取が実体顕微鏡下に行われたため、各組織での遺伝子発現に対する詳細な比較ができていなかったためと思われる。一方で、ここ数年で組織切片から採取した組織を用いた遺伝子解析技術は、機器や試薬が飛躍的に進歩し、廉価で正確な解析が可能となってきて、他分野の研究で多用されるようになってきている。本研究では、創傷後に皮膚が完全に再生するマウス胎生 13 日の創傷部位の、表皮および真皮細胞別に、レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて、組織切片から RNA を採取する。また、同じマウス胎仔の創傷部位とは反対側の正常部位の表皮および真皮細胞を同様にレーザーマイクロダイセクションを用いて組織別に回収し、創縁と正常部位の表皮どうし、真皮どうしをマイクロアレイを用いて、網羅的に比較する。同様の

検索を、皮膚の傷跡が残る胎生 15 日の創傷部位で行うことを目的とした。さらに、胎生 13 日の創傷部位、もしくは胎生 15 日の創傷部位でのみ発現の増強が確認された遺伝子の発現が確かなものか否かを、詳細に検討し、その後、胎生 13 日および胎生 15 日のマウス胎仔創傷後、さまざまな時間に創縁の表皮または真皮を採取し、同時に反対側正常皮膚から同様に表皮または真皮をレーザーマイクロダイセクションで採取し、採取検体から RNA を抽出し、cDNA に変換した後 real time PCR で定量的に、また継時的に発現の変化を観察する。さらに遺伝子発現の局在を in situ hybridization を用いて局在の確認作業を行う。さらに、他の発生段階の創傷部位でも同じ傾向を示すか否かを検索すべく、また胎生 17 日の創傷治癒や成獣でも、胎生 15 日の創傷部位と同様の発現パターンが認められるかを確認する。またこれら発現遺伝子を、siRNA 試薬を用いて、invitro および invivo でノックダウンを試み、それぞれの創傷治癒の変化を観察する。発現が厳密に確認できた遺伝子につき、逐次遺伝子改変マウスを用いた解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ICR マウス胎生 13 日と 15 日の胎仔に胎仔手術を施し、側胸部に長軸方向に長さ約 2 mm の、皮膚肉様筋に至る皮膚全層切開創を作成した。創作成後 24 時間に動物を安楽死させ、体幹部を創を含めて輪切りにしたのち組織を OCT コンパウンドに包埋し、急速冷凍し -80 で保存する。清潔にしたクライオスタットで、凍結標本から厚さ 20 μm の凍結切片を作成し、RNase free のスライドガラスで組織切片を回収する。直後にレーザーマイクロダイセクションシステム PALM MicroBeam (カルツァイスマイクロイメージング社) を用いて、創辺縁部の表皮、真皮、反対側正常体幹部の表皮、真皮を別々にモニター上で切り出し、光ピンセットを用いて回収し、total RNA を回収する。胎生 14 日に作成した創傷に関しても同様の処置を行った。このようにして回収した表皮 4 検体、真皮 4 検体の RNA から reverse transcriptase を用いて cDNA に変換する。その後、マイクロアレイ Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix 社) を用いて、全発現遺伝子に対して網羅的検索を行った。全検体に対して各々 2 回マイクロアレイによる解析を行った。

網羅的観察により、胎生 13 日創傷部の辺縁と正常部位の表皮、胎生 15 日創傷部辺縁と正常部位の表皮の 4 点を比較することで得られた、胎生 13 日創傷部位でのみ発現している遺伝子、または胎生 15 日の創傷部でのみ発現している遺伝子の発現が正しいか否かを、real time PCR により確認した。上記と同様に、胎仔手術施し、様々な時間ののちに創傷部を含めた組織を採取し、RNA を採取、発現とその変化を定量的に調べた。また、同

様に4%パラフォルムアルデヒドで固定したサンプルから、パラフィン切片を作成し、in situ hybridizationで発現の局在と、確かに表皮細胞で発現しているか否かを確認した。次に、siRNA試薬(Dharmacon社)を用いて胎生13日、15日の胎創傷部位に発現している当該遺伝子のノックダウンを行った。胎生13日および15日の胎仔に胎仔手術を施し、直後に羊水内にsiRNA試薬を注入し、遺伝子発現の抑制を行った。その後、皮膚を再生させる遺伝子、皮膚の再生を阻害する遺伝子につき、確実に発現の確認でき、さらにsiRNA試薬の投与により、形態に変化が生じた遺伝子に関して、遺伝子改変マウスの対して、それぞれノックアウトマウスを入手し、解析を行った。

4. 研究成果

胎生13日と胎生15日の創傷作成後24時間の創傷部と正常の表皮、同様に真皮の組織を採取し、RNAを抽出し、増幅後にマイクロアレイを施行した。正常部の表皮に比べてFold change>2のデータと胎生15日の正常部の表皮が創傷部の表皮に比べてFold change>2のデータに共通する遺伝子は、137遺伝子存在した。胎生13日の創傷部の真皮が正常部の真皮に比べてFold change>2のデータと胎生15日の正常部の真皮が創傷部の真皮に比べてFold change>2のデータに共通する遺伝子は、26遺伝子存在した。その他、胎生13日の正常部の表皮が創傷部の表皮に比べてFold change>2のデータと胎生15日の創傷部の表皮が正常部の表皮に比べてFold change>2のデータに共通する遺伝子は約700あり、胎生13日の正常部の真皮が創傷部の真皮に比べてFold change>2のデータと胎生15日の創傷部の真皮が正常部の真皮に比べてFold change>2のデータに共通する遺伝子は約2500あった。

この中から、皮膚の再生に関与していると考えられる遺伝子につき、発現・機能解析を行った。まず、in situ hybridization法で、発現を調べ、再生する時期からなくなる時期の前後での変化を調べた。また、変化のあった遺伝子についてはレーザーマイクロダイセクションを用いて、凍結切片から局所の組織を採取し、リアルタイム定量PCR法で定量化を行った。なお、リアルタイム定量PCR法の結果は、同じ胎仔の正常部位と比較した際の創傷部位での相対発現量を示している。胎生13日の真皮で発現が増強していた、遺伝子Aは発生各段階の真皮に特異的に発現していた。真皮の中では表皮に近づくにつれて発現が増強している傾向があった。また、創傷部との関係では、胎生13日では創辺縁の発現が強く、逆に胎生15日、17日では創辺縁に近づくに従って発現が減弱している傾向が見られた。遺伝子Bも同様に、マウス発生の各段階で真皮に特異的に発現し、同様に表皮に近づくにつれて発現が増強して

いた。また、創傷部との関係では、胎生13日では創辺縁の発現が強く、逆に胎生15日、17日では創辺縁に近づくに従って発現が減弱している傾向があった。遺伝子Bにつき、レーザーマイクロダイセクションで、真皮のみに限局して組織を採取し、リアルタイム定量PCR法により定量化を行った。その結果、in situ hybridizationの結果と同様に、胎生15日、17日では創傷部位辺縁の真皮が正常部位に比べて発現量が減少していたのに対し、胎生13日では正常真皮に比べて創傷部位辺縁の真皮で発現量が増加していた。皮膚が完全に再生する胎生13日で発現量が増加していたため、皮膚再生と関連していることが示唆された。

遺伝子Cの発現を観察したところ、遺伝子Cはマウス各発生段階の真皮層に発現していた。特に毛包周囲は発現が増強していた。創傷部との関係では、胎生13日では創辺縁で発現が増強しているように観察されたため、レーザーマイクロダイセクションを行い皮膚再生との関連を検討した。リアルタイム定量PCR法の結果、胎生13日、17日では正常部と比べ創傷部位辺縁で発現量が増加していた。しかし、胎生15日では創傷部位辺縁で正常部位に比べて発現量が減少していた。次に、遺伝子D,E,Fにつき観察を行った。遺伝子Dは、マウス各発生段階の真皮層および毛包周辺での発現が認められた。しかし、レーザーマイクロダイセクションで局所の組織を採取し、リアルタイム定量PCR法で発現量を検討したところ、有用なCT値が得られなかった。発現量が極めて少ないことが考えられた。遺伝子Eは、毛包での発現が観察された。遺伝子Eのリアルタイム定量PCR法の結果、胎生15日、17日では創傷部位辺縁が正常部位に比べて発現量が減少していたのに対し、胎生13日では正常部位に比べて創傷部位での発現量が3倍以上増加していた。皮膚が完全に再生する胎生13日で発現量が増加していたため、皮膚再生と関連していることが示唆された。遺伝子Fは毛包のみに限局して発現していた。毛包発生が起きていない胎生13日での発現は確認できなかった。また、胎生15日では、創傷部と正常部で差が認められなかったものの、胎生17日では創傷部が正常部より発現が増強していた。遺伝子Fのリアルタイム定量PCR法の結果、in situ hybridizationの結果と同様に胎生13日では発現が確認できなかった。また胎生15日では正常部と創傷部に差がなかったものの、胎生17日では創傷部が正常部に比べ2倍以上の発現量が確認できた。真皮構造が再生される時期の変化と相関があったため、さらなる追加実験を行い検討した。遺伝子Eは、マウスの各発生段階の毛包で発現が観察された。創傷部位との関連は観察されなかった。遺伝子Fはマウスの各発生段階で毛包に限局して発現していた。胎生15日では、創傷部と正常部で差が認められなかったものの、胎

生 17 日では創傷部が正常部より発現が増強していた。遺伝子 E のリアルタイム定量 PCR 法の結果、胎生 15 日、17 日では創傷部位辺縁が正常部位に比べて発現量が減少していたのに対し、胎生 13 日では正常部位に比べて創傷部位での発現量が 3 倍以上増加していた。遺伝子 F のリアルタイム定量 PCR 法の結果、胎生 13 日では発現が確認できなかった。また胎生 15 日では正常部と創傷部に差がなかったものの、胎生 17 日では創傷部が正常部に比べ 2 倍以上の発現量が確認できた。次に遺伝子 G は、In situ hybridization の結果、マウス各発生段階の表皮真皮境界部に特異的に発現していることが確認された。遺伝子 H は、マウス各発生段階の真皮層全体での発現が確認され、また毛包でも特異的に発現していた。遺伝子 I は真皮層での発現が確認された。特に胎生 13 日では発現が増強し、胎生 15 日、17 日では創傷部に比べ正常部で発現が増強しているように観察された。遺伝子 J は、胎生 13 日から 17 日で遺伝子 J の mRNA レベルでの発現は認められなかった。リアルタイム定量 PCR 法の結果、遺伝子 K の胎生 17 日では創傷部位辺縁が正常部位に比べて発現量が減少していたのに対し、胎生 13 日、15 日では正常部位に比べて創傷部位での発現量が増加していた。遺伝子 J は胎生 13 日では創傷部での発現が減少し、胎生 15 日では正常部と創傷部に差がなかったものの、胎生 17 日では正常部の方がやや発現量が増加していた。遺伝子 K は胎生 15 日、17 日では創傷部位辺が正常部位に比べて発現量が減少していたのに対し、胎生 13 日では正常部位と創傷部位で発現量に差が見られなかった。胎生 15 日以降で発現量が減少し、胎生 13 日での発現量に差が見られなかったため、皮膚再生と関連していることが示唆された。遺伝子 L は、胎生 13 日では創周辺の表皮基底層に、胎生 15 日、17 日では真皮層全体での発現が認められた。しかし、レーザーマイクロダイセクションで局所の組織を採取し、リアルタイム定量 PCR 法で発現量を検討したところ、有用な CT 値が得られなかった。発現量が極めて少ないことが理由であると考えられるため、今後はより DNA 量を増幅して検討を行っていきたい。以上のデータをもとに、胎仔皮膚再生や創傷治癒に関連していると思われる遺伝子の中で、遺伝子 C、遺伝子 F についてより深く検討していくべく免疫組織染色におけるタンパクレベルでの発現を確認した。遺伝子 C は、in situ hybridization の結果と同様に、マウス各発生段階の真皮に特異的に発現し、また表皮に近づくにつれて発現が増強していた。創傷部との関係では、胎生 15 日、17 日では創傷部位が正常部位に比べて発現量が減少しているのに対し、胎生 13 日では正常部位に比べて創傷部位で発現が増加している傾向にあった。遺伝子 F は、in situ hybridization の結果と同様に胎生 13 日では正常部・創傷

部ともに発現は認められなかった。また胎生 15 日では、mRNA レベルでは毛包周囲に発現していたのに対し、タンパクレベルでは毛包のみならず、表皮基底層全体に分布していた。胎生 17 日でも表皮基底層全体に分布しており、さらに創周辺の真皮の細胞に遺伝子 F を多く発現している細胞が観察された。また in situ hybridization の結果と同様に、正常部位に比べ、創傷部で発現が増強している傾向にあった。遺伝子 F と分化と分裂の関係を調べるために、Ki67, P63, Keratin10, loricrin の免疫組織染色も行った。遺伝子 F を多く発現している毛包では、細胞分裂が活発に起きていることがわかった。また分化が進行した表皮では、遺伝子 F の発現と関連しなかったため、遺伝子 F は細胞増殖との関連が示唆された。遺伝子 F と Twist2 の機能解析を行うべく、siRNA 試薬を用いて検討した。まず羊水内に直接 siRNA 試薬を投与することで、ノックダウンが可能か否かを検討するために、予備実験として house keeping gene である F VII (1377501, Invitrogen) に対する siRNA 試薬を、蛍光色素 Block-it と共に、胎生 15 日のマウス胎仔に創傷を作成した直後に羊水内に投与した。48 時間後に回収し組織を回収し、蛍光顕微鏡で確認するとともに、リアルタイム定量 PCR 法で発現量を比較した。この結果、胎仔皮膚内に siRNA 試薬が取り込まれ、適切にノックダウンされていることが示された。遺伝子 F に対する siRNA 試薬を胎生 15 日のマウス胎仔の創傷作成後、羊水内に投与し、72 時間後に回収した。Negative Control に比べ、創傷部位が明らかであり、創傷治癒が抑制されていた。組織を観察すると、遺伝子 F をノックダウンすることで創傷部辺縁の毛包が消失または減少した。また、明らかに再上皮化が遅延していることが観察された。遺伝子 C は、胎生 13 日および 15 日の胎仔に対してノックダウンを試みた。通常、胎生 13 日ではキメを含め皮膚が完全に再生するのに対し、siRNA 試薬を投与したマウス胎仔では皮膚再生が乱れ、キメが再生されなかった。組織を観察すると、胎生 13 日の創傷部では毛包の再生が消失し、胎生 15 日の創傷部では毛包の再生が減弱していることが確認された。この差異は、毛包の形態形成時期の変化によるものと考えられた。遺伝子 C に対するノックアウトマウスを Jackson lab から入手した。増殖を行い、胎仔手術を行ったところ、通常なら完全に皮膚が再生する胎生 13 日のマウスで、瘢痕を伴って治癒した。このことから、皮膚の再生には、遺伝子 C が管轄していることが考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1)伊倉 直彦、荒牧典子、高戸珠恵、貴志和

生。長期継代培養後の毛乳頭細胞における未分化能の再獲得は可能か? 第 45 回 日本創傷治癒学会 2015.11.30 Kitte 会館(東京都、千代田区)。

2) 酒井 成貴、岡部 圭介、荒牧 典子、貴志 和生。胎仔皮膚再生における表皮・皮下部位別間葉系細胞の相互作用。第 45 回 日本創傷治癒学会 2015.11.30 Kitte 会館(東京都、千代田区)。

3) 岡部 圭介、崎尾 怜子、荒牧 典子、林 瑠加、酒井 成貴、貴志 和生。マウス胎仔皮膚創部組織のホールマウント染色による可視化の試み。第 45 回 日本創傷治癒学会 2015.11.30 Kitte 会館(東京都、千代田区)。

4) 今村 香菜子、荒牧 典子、春原 彩乃、高戸 珠恵、岡部 圭介、貴志 和生。Scarless wound healing における YAP/TAZ の検討。第 45 回 日本創傷治癒学会 2015.11.30 Kitte 会館(東京)。

5) 貴志 和生。癒痕を残さない完全再生。第 45 回 日本創傷治癒学会 2015.11.30 Kitte 会館(東京都、千代田区)。

6) 春原 彩乃、荒牧 典子、岡部 圭介、高戸 珠恵、貴志 和生。Twist2 とマウス胎仔皮膚再生の関連。第 44 回 日本創傷治癒学会 2014.12.2 ホテルメトロポリタン仙台(宮城県、仙台市)。

〔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

貴志 和生 (KISHI KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40224919

(2) 研究分担者

久保田 義顕 (KUBOTA YOSHIAKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50348687

林 瑠加 (HAYASHI RUKA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50445392
(平成 25 年 4 月～平成 27 年 10 月)

荒牧 典子 (ARAMAKI NORIKO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80365311

(3) 連携研究者
なし