

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462804

研究課題名(和文)ケロイド、肥厚性瘢痕における血球由来間葉系前駆細胞の分化発現異常の解析

研究課題名(英文) Involvement of fibrocytes for tissue repair in normal and pathological conditions during healing

研究代表者

大西 清 (ONISHI, Kiyoshi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：30194228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Basic fibroblast growth factor (bFGF) 投与したラット修復組織における骨髄間葉系前駆細胞 (Fibrocyte) の発現誘導と新生血管との関係を検討した。bFGF投与後4、6、7日目にCD34+/pro-collagen 1+ fibrocyteは有意に増加し、形態的に4日目に緩やかな細胞網を形成し始め、6日目に血管内皮様構造を示した。さらにFGFR1s iRNA遺伝子導入実験による有意な阻害効果からbFGFはCD34+/pro-collagen 1+ fibrocyteを特異的に誘導し、同細胞による血管形成にbFGF/ FGFR1システムの関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The precise role of fibrocytes in angiogenesis in wound healing remains unclear. Our aim is to clarify the role of fibrocytes in angiogenesis influenced by basic fibroblast growth factor (bFGF) in wounds. Double immunofluorescence staining focusing on fibrocyte accumulation demonstrated markedly increased formation of capillary-like structures composed of CD34+/pro-collagen 1+ fibrocytes in bFGF-treated wounds. However, capillary-like structures formed by CD45+/pro-collagen 1+ or CD11b+/pro-collagen 1+ fibrocytes were lacking in these wounds. Furthermore, bFGFR1-small interfering RNA (siRNA) injection into wounds followed by bFGF treatment markedly inhibited the formation of capillary-like structures composed of CD34+/pro-collagen 1+ fibrocytes, indicating the requirement of bFGF for formation of the capillary-like structures composed of CD34+/pro-collagen 1+ fibrocytes in the wounds.

研究分野：形成外科学

キーワード：Fibrocyte bFGF 創傷治癒 血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 組織修復に關与する線維芽細胞は骨髓由来間葉系前駆細胞 Fibrocyte あるいは間葉系未分化幹細胞 Mesenchymal stem cells 由来と考えられている[1]。しかし多細胞から構成される一過性の修復組織である肉芽組織における Fibrocyte の発現性や特異性は不明である。Fibrocyte は血管内の Circulating fibrocyte と血管外間質の Infiltrated fibrocyte に大別されるが、これら二種類の fibrocyte と骨髓細胞との相互関係や Fibrocyte から Fibroblast, Myofibroblast への詳細な分化様式は解明されていない[2]。

(2) 我々はこれまでヒト皮膚創部の多重染色から Fibrocyte を同定し、

Infiltrated fibrocyte は多数存在し、Circulating fibrocyte の約5倍である。

Circulating fibrocyte は増減しないが、Infiltrated fibrocyte は肉芽組織の増殖消退に一致して増減することを発表した[3]。よって肥厚性癬痕やケロイドにおいて fibrocyte の発現異常を正常過程との比較検討から解明することは、Fibrocyte 分化異常による異なる phenotype の線維芽細胞同定とその細胞学的特性に起因する過剰な癬痕形成メカニズム解明に寄与すると考えられ、今回の研究申請に至った。

### 2. 研究の目的

ケロイド、肥厚性癬痕を中心とする線維性皮膚炎では過剰癬痕化の病態を規定する線維芽細胞の細胞特異性は明らかでない。この病態を線維芽細胞の Phenotype 異常から解明するため、Fibrocyte の正常ないしは病態における発現性をラット組織修復モデルとヒトのケロイド・肥厚性癬痕で解析する。本研究では血管増殖因子投与により人為的に血管新生促進させたラット創部での Fibrocyte の発現誘導と新生血管との関係を細胞と mRNA のレベルで検討した。さらに未分化間葉系幹細胞との関連性から Fibrocyte の中心的役割を明確にし、最終的に過剰癬痕形成メカニズムを Fibroblast Myofibroblast の原基である Fibrocyte の分化統御障害による組織修復異常から検討する。

### 3. 研究の方法

(1) ラット組織修復モデルにおける Fibrocyte 発現様式の組織学的検討を行った。SD ラット (雄、12 週齢) の全層性皮膚潰瘍に Basic fibroblast growth factor (bFGF: 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) を投与し、2、4、6、7、14、21 日後の修復組織を採取した。また Vascular endothelial growth factor (VEGF: 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) を投与したラット全層性皮膚潰瘍を同様の手順で作成し、その修復組織を採取した。CD34、CD45、CD11b と pro-collagen I の蛍光二重染色から修復組織内の 3 種類の

Fibrocyte を同定し、血管新生促進過程における各 Fibrocyte の発現性と新生血管との関係を経時的に解析した。

(2) SD ラット背部局所に FGFR1siRNA の遺伝子導入し、bFGF 投与した全層性皮膚潰瘍を作成し、6 日後にその修復組織を採取した。FGFR1siRNA の遺伝子導入実験から修復組織の FGFR1mRNA knockdown による CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte の発現性を検証した。

(3) ヒトのケロイド・肥厚性癬痕検体を創傷治癒過程の炎症期、増殖期、成熟期に分類し、CD34、CD45、CD11b と pro-collagen I の蛍光二重染色から Infiltrated fibrocyte、Circulating fibrocyte を同定した。創傷治癒の各過程における Fibrocyte の発現性と新生血管との関係を解析した。

### 4. 研究成果

(1) CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte は bFGF 投与後 4、6、7 日目において有意な発現増加を認めた(図 1)。形態的には 4 日目に緩やかな細胞網を形成し、6 日目には血管内皮に似た多数の管腔構造を形成するようになった(図 2)。一方、CD45+/pro-collagen I+ fibrocyte と CD11b+/pro-collagen I+ fibrocyte は bFGF による明らかな発現増加を認めず、形態的にも bFGF が誘導する CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte が示す血管様構造は認めなかった。

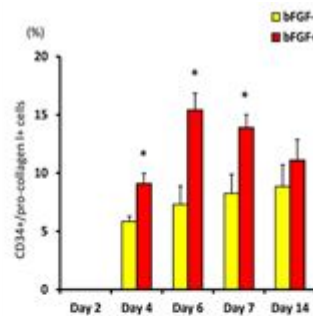


図1 bFGFによるCD34+/pro-collagen I+ fibrocyteの増加

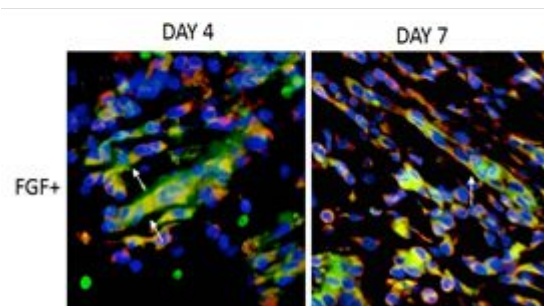


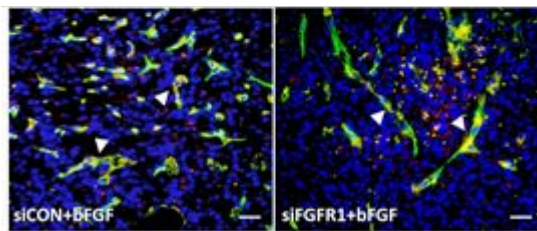
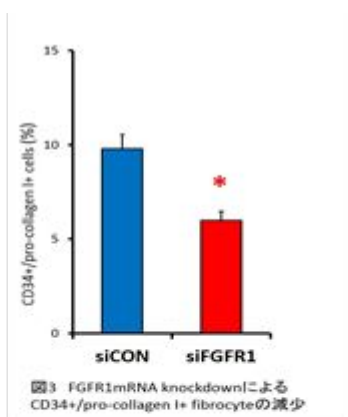
図2 CD34+/pro-collagen I+ fibrocyteの血管様構造形成

(2) bFGF と VEGF 投与による Fibrocyte の発現様式の違いを明らかにするため、VEGF を投与した修復組織で同様の実験系を行った。形態的には新生血管の周囲に集簇する CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte を認めた

が、bFGF が誘導する CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte の血管様構造は認めなかった。

(3) 血管内皮前駆細胞(Endothelial progenitor cell; EPC)の代表的染色法である CD34 と Flk-1(Fatal liver kinase-1)の蛍光二重染色から、Fibrocyte と同細胞の異同を比較検討した。CD34+/Flk-1+血管内皮前駆細胞は、VEGF 投与群において有意な細胞数上昇を認めた。形態的には bFGF 投与群における CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte の血管様構造はなく、新生血管に集簇するように存在する同細胞を確認した。血管新生促進過程で bFGF により誘導される CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte は、EPC とは異なる過程によって血管新生機構へ関与することが示唆された。

(4) FGFR1siRNA の皮膚導入実験から修復組織の FGFR1mRNA knockdown による CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte の発現変化を検証した。FGFR1mRNA knockdown により、bFGF 誘導性の CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte の有意な減少と血管様構造形成は著しい抑制を認めた(図 3、4)。したがって bFGF は CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte を特異的に誘導し、同細胞による血管形成に bFGF/ FGFR1 システムが関与していることが示された。



上記(1)-(4)がラット組織修復モデルより得られた。したがって新生血管における CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte の直接的参画が明らかになり、bFGF 誘導性 Fibrocyte が血管新生に関与するといった基礎的研究成果が得られた。

一方、ヒトのケロイド肥厚性癬痕の検体は

個体差が大きく、複数の病期が同一検体内に混在し一定の条件で存在すること、また癬痕組織ではラットの実験から明らかなように Fibrocyte 数が極端に減少する傾向が明らかとなり、各病期における Fibrocyte の統計的、形態的評価が困難なことが判明した。今回は各病態における Fibrocyte の Fibroblast、Myofibroblast の分化様式に関する研究成果は得られなかったが、正常 in vivo における組織修復過程では Fibrocyte は線維化に関与するだけでなく、bFGF を介し血管新生に関与するという新規メカニズムを明らかにした。本研究は研究期間終了後も継続し、将来的には Fibrocyte の単独移植療法による効率的な血管新生による傷害臓器の修復促進を目的とした新規の血管新生療法開発の基礎的実験系を開発する予定である。

<引用文献>

[1] Thasdeus S, The Role of Stromal Stem Cells in Tissue Regeneration and Wound Repair, Science, 2009, 324, 1666-1669

[2] Bellini A, The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses, Lab Invest, 2007, 87, 858-70

[3] Inomata N, Fibrocyte behavior relative to blood vessels under skin wound healing, Jpn J Plast Reconstr Surg, 2012, 32, 645-659

## 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 8 件)

中道美保、大西 清；骨髄由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による血管新生メカニズムと組織修復、平成 27 年度私立大学戦略的研究形成支援事業報告会、2016 年 3 月 25 日、東邦大学(東京都大田区)

中道美保、大西 清、赤坂喜清；bFGF による骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の誘導と血管新生メカニズム、第 45 回日本創傷治療学会、2015 年 12 月 1 日、JP タワー&カンファレンス(東京都千代田区)

中道美保、赤坂喜清、岡根谷哲哉、今泉りさ、荻野晶弘、岡田恵美、大西 清；血管増殖因子による骨髄間葉系前駆細胞の発現誘導と血管新生、第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会、2015 年 10 月 8 日、岩手県民会館(岩手県盛岡市)

中道美保、大西 清；骨髄由来間葉系前駆

細胞(Fibrocyte)による組織修復と新規血管新生メカニズムの解析、平成 26 年度私立大学戦略的研究形成支援事業報告会、2015 年 3 月 25 日、東邦大学(東京都大田区)

中道美保、赤坂喜清、今泉りさ、岡田恵美、三上哲夫、大西 清；創傷治癒期の血管増殖因子による血管新生メカニズムと骨髄間葉系前駆細胞の関与、第 44 回日本創傷治癒学会、2014 年 12 月 3 日、ホテルメトロポリタン仙台（宮城県仙台市）

Inomata N, Akasaka Y ; Fibrocyte behavior relative to blood vessels under skin wound healing、Wound Healing Society 2014、2014 年 4 月 24 日、Orland, Florida U.S.A

中道美保、大西 清；骨髄由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による血管新生と組織修復、平成 25 年度私立大学戦略的研究形成支援事業報告会、2014 年 3 月 25 日、東邦大学(東京都大田区)

中道美保、大西 清、赤坂喜清、猪股直美、岡田恵美、今泉りさ；皮膚組織修復過程における血球由来間葉系前駆細胞（Fibrocyte）の血管発現特異性とサイトカイン制御、第 43 回日本創傷治癒学会、2013 年 11 月 14 日、別府湾ロイヤルホテル(大分県速見郡)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大西 清 (ONISHI, Kiyoshi)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：3 0 1 9 4 2 2 8

### (2)研究分担者

今泉 りさ (IMAIZUMI, Risa)  
東邦大学・医学部・准修練医  
研究者番号：2 0 4 5 3 8 4 7

岡田 恵美 (OKADA, Emi)  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号：5 0 3 1 8 2 4 2

赤坂 喜清 (AKASAKA, Yoshikiyo)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：6 0 2 0 2 5 1 1

猪股 直美 (INOMATA, Naomi)  
東邦大学・医学部・シニアレジデント  
研究者番号：1 0 4 3 9 9 3 7