

Title	マウス胎仔皮膚再生とアクチン重合の関係
Sub Title	The relationship between fetal murine cutaneous regeneration and actin cable formation
Author	王子, 富登(Oji, Tomito)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016. )
Abstract	<p>マウス胎生13日から17日のさまざまな発生段階のマウス胎仔に胎仔手術を施し共焦点顕微鏡を用いてactin cable形成の有無と、皮膚再生の関係を観察した。その結果、胎生13日に作成した創傷は、創が完全に閉鎖するまでactin cableの収縮で進行し、胎生14日に作成した創傷は、途中まではactin cableの収縮で創が収縮するが、途中から表皮のmigrationに切り替わり、胎生15日胎仔に作成した創傷は、ほぼ最初から表皮のmigrationで進行することが考えられた。</p> <p>We made cutaneous wounds on the fetal mice of various developmental stages, then observed the relationship between the formation of actin cable and skin regeneration. As a results, wounds made until embryonic day (E) 13 closed by the contracture of actin cable. On the contrary, the wounds made at E14, wounds heals by the contracture of actin cable to the middle, but after that, it changes to the migration of epidermis. After E15, wounds heals by the migration of epidermis from the beggining.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2015～2016 課題番号：15K20320 研究分野：形成外科
Genre	Research Paper
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K20320seika">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K20320seika</a>

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20320

研究課題名(和文) マウス胎仔皮膚再生とアクチン重合の関係

研究課題名(英文) The relationship between fetal murine cutaneous regeneration and actin cable formation

研究代表者

王子 富登(Ouji, Tomito)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40645115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎生13日から17日のさまざまな発生段階のマウス胎仔に胎仔手術を施し共焦点顕微鏡を用いてactin cable形成の有無と、皮膚再生の関係を観察した。その結果、胎生13日に作成した創傷は、創が完全に閉鎖するまでactin cableの収縮で進行し、胎生14日に作成した創傷は、途中まではactin cableの収縮で創が収縮するが、途中から表皮のmigrationに切り替わり、胎生15日胎仔に作成した創傷は、ほぼ最初から表皮のmigrationで進行することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We made cutaneous wounds on the fetal mice of various developmental stages, then observed the relationship between the formation of actin cable and skin regeneration. As a results, wounds made until embryonic day (E) 13 closed by the contracture of actin cable. On the contrary, the wounds made at E14, wounds heals by the contracture of actin cable to the middle, but after that, it changes to the migration of epidermis. After E15, wounds heals by the migration of epidermis from the beggining.

研究分野：形成外科

キーワード：skin regeneration actin

## 1. 研究開始当初の背景

動物の再生に関して、いくつかの再生能力の高い動物がモデル生物として知られている。例えば、プラナリアやヒドらは条件が整っていれば、100分の1に切断されても再生することができると言われており、著しい再生能力をもつことが知られている。プラナリアやヒドらは扁形動物であり、無脊椎動物である。しかし、イモリは脊椎動物として再生能力が高いことで知られており、四肢や尾は切断されても、再生芽が形成され完全に再生する。このように動物の中には、著しい再生能力を持つ種類が存在する。

ヒトでは、成人でも皮膚表面のかすり傷などのような非常に浅い傷であれば、最終的には瘢痕を残すことなく跡形なく治癒する。しかし、真皮網状層より深くにできた創傷は、瘢痕として傷跡が残る。このように一度形成された瘢痕は、手術療法、レーザー治療や保存的療法を行い、ある程度改善できるようにはなっているが、完全な傷跡の除去は不可能である。傷の場所によっては整容上問題となる上、ケロイドや瘢痕拘縮などを引き起こすこともあるため、皮膚の完全な再生ができれば、このような様々な問題を解決することができる。ここで創傷治癒の中で表皮角化細胞に注目すると、成獣における傷の治癒は表皮角化細胞の遊走による。一方で P.Martin は、マウス胎子の全胚培養系を用いて行った研究で、マウス胎生 11.5 日に作成された皮膚創傷では、創辺縁の表皮角化細胞内に actin cable が形成され、actin cable の収縮により、細胞が遊走することなく創辺縁の表皮細胞が間葉組織の上をちょうど巾着が閉まるようにして、創が閉鎖し、皮膚が再生すると報告している<sup>1)</sup>。この現象は、ニワトリの胚やシヨウジョウバエの幼虫でも確認されている。一方で全胚培養系は、胎生 11.5 日付近の胎子までしか技術的に行うことはできない。このため、表皮内で actin cable の形成が、真に皮膚が再生する時期としない時期を規定しているか否かは明らかにされていない。

本研究室では、これまで独自の研究で胎生

13日から17日までさまざまな発生段階の胎子に創傷を作成し、その変化を観察している。その結果、胎生 13 日に作成した創傷は皮膚付属器、皮溝、皮丘を含めて完全に再生するが、胎生 14 日以降に作成した創傷は傷あとが残ることを明らかにしている。

## 2. 研究の目的

本研究では、in utero で皮膚が完全に再生する胎生 13 日の創傷部位と、それ以降の再生しなくなる創傷部位で、actin cable の形成の有無が直接関与しているか否かを検討を行うことを目的とした。さらに actin cable の形成に関わっている因子についても検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス胎生 13 日から 17 日のさまざまな発生段階のマウス胎子に胎子手術を施し、創を回収し、4%パラフォルムアルデヒドで固定を行った。その後、重合した actin に結合する Phalloidin-Alexa488 溶液に whole mount で 24 時間浸漬し、共焦点顕微鏡を用いて actin cable 形成の有無と、皮膚再生の関係を観察した。

その後、actin の重合に関係している様々な因子の発現を、蛍光免疫染色、Western blotting を用いて観察した。さらにアクチンの重合や細胞増殖、細胞遊走をさまざまな試薬を用いて、組織培養下に阻害し、これらの皮膚再生に及ぼす影響について検討した。

ICR の妊娠 13 日から 17 日のマウスに対して、全身麻酔下に開腹術を行った。子宮、羊膜を切開後にマイクロサージャリー手術用の剪刀を用いて、各々の発生段階の胎子側胸部に、長軸方向に沿った長さ約 2mm の皮膚全層切開創を作成した。創作成後 48 時間の検体に関しては、創を同定するため、創作成後にピペットを用いて、PBS に溶いた蛍光色素 0.1% Dil (Molecular Probe) を創部に投与した。6、24 時間および 48 時間後に安楽死させ、創傷を作成したマウス胎子を採用し、4%パラフォルムアルデヒドで 4、24 時間固定した。

創作成後 48 時間の検体を実体蛍光顕微鏡を

用いて、Dil を指標に創傷作成部を同定し、皮膚表面の形態を観察した。

Actin cable は上皮化が終了する前の創傷治癒の過程で出現するので、創作成後 6、24 時間で観察する。検体を 5nM の Phalloidin-Alexa488(Molecular probe)と核染色のための 500 倍希釈 Hoechst 溶液の混和液に、4 で 24 時間 incubate する。その後実体蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡を用いて表皮内の actin cable の形成の有無を確認した。

Actin の重合は、Rho タンパクファミリーである Rac-1,cdc42,Rho や、Wave-2, Profilin, ARP2,ARP3 様々な因子によって規定されている。また、actin の重合する場所により、細胞が偽足を形成し、細胞遊走が起きる。表皮内の actin cable の形成の有無と表皮細胞の遊走の有無は逆相関していると考えられ、これは偽足の形成に関わっている Rac-1 や cdc42 の発現の違いによるところが大きいと考えられたため、actin cable が形成する時期と形成されなくなる時期の、Rac-1 cdc42 の発現の有無を免疫染色により確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 主な成果

マウス胎生 13 日、14 日、15 日の胎仔に創傷を作成し、24 時間、36 時間、48 時間後に創傷部を回収し、Phalloidin で whole mount で染色し、confocal microscope で actin cable の形成を確認した。そうすると、胎生 13 日の創傷では、創が閉鎖するすべての過程で actin cable が形成されていることが判明した。一方で、胎生 14 日の創傷部では、創作成後 36 時間までは、actin cable が形成されていたが、その後消失した。胎生 15 日の創傷部では創作成後 24 時間の段階から actin cable は形成されず、最初から創辺縁の表皮が migration を起こして創傷部に移動してくる像が観察された。その後、凍結切片を作成し、断面を確認したが、やはり胎生 13 日創傷部のすべての過程と、胎生 14 日創傷部の途中までは、創辺縁の表皮内に actin cable の形成を確認できた。

凍結切片の免疫染色を行い、actin 重合に関与している様々な因子の発現を調べたところ、胎生 13 日の創傷部で、正常部には発現が見られない Rac-1 の明らかな発現の増強が確認された。さらに、詳細に観察するために、パラフィン包埋を行い、4  $\mu$ m の切片を作成し、actin 重合に関与する因子につき免疫染色を行った。そうすると、胎生後期になるに従い、Rac-1,ARP2,ARP3 など、アクチン重合に関与する因子のいくつかは、基底膜側に発現が観察された。

さらに、作成する創傷の大きさを同一に規定するために、直径 1mm のデルモパンチを用いて胎生 13 日、14 日、15 日のマウス胎仔側腹部に直径 1mm の単一の創を用いて観察したところ、胎生 13 日の創傷部は、完全に再生したが、それ以降の胎仔は、癒痕を認識できた。しかし、胎生 14 日の胎仔の創傷部は、直径が約 0.3mm ほどの大きさの癒痕が認識できたが、その周囲は癒痕として認識できなかった。また、胎生 15 日のマウス胎仔に作成した創傷は、癒痕が直径が 0.7mm 程度の大きさであった。これらのことから、胎生 13 日に作成した創傷は、創が完全に閉鎖するまで actin cable の収縮で進行し、胎生 14 日に作成した創傷は、途中までは actin cable の収縮で創が収縮するが、途中から表皮の migration に切り替わり、胎生 15 日胎仔に作成した創傷は、ほぼ最初から表皮の migration で進行することが考えられた。

##### (2) 日本国内の状況とインパクト

これまで、マウスの胎仔期の皮膚再生のメカニズムとして切り替わりの時期と actin cable の形成の切り替わりの詳細は不明であったが、今回の研究で明らかになった。これを基に、皮膚の完全再生のメカニズムの研究の基盤になるものと考えられ、インパクトは大きい。

##### (3) 今後の展望

本研究の結果を基に、発現しているタンパク遺伝子変化の違いなどを詳細に検討し、皮膚の完全再生を目指したい。

(参考文献)

1) Nature. 1992 360(6400):179-83.

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 0 件)

[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

王子 富登 (Ouji Tomito)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40645115