

# マウス皮膚欠損創における細胞増殖因子の経時的変化についての Horizontal section による免疫組織化学的研究

## 学位論文内容の要旨

細胞増殖因子は創傷治癒に大きく関与していると言われている。個々の増殖因子の創傷治癒における役割を知るために、治癒過程にある創傷部位での、それらのタンパクや mRNA の測定など、多くの研究がなされてきた。しかしながら創傷における細胞増殖因子の経時的変化あるいは発現部位の違いについては、いまだ明らかとは言えない。創傷治癒過程では線維芽細胞は肉芽組織形成に関与し、一部は筋線維芽細胞となる。筋線維芽細胞は形成初期の肉芽組織ではほとんど認められないが、創収縮の時期になると多数見られるようになることから、筋線維芽細胞は創収縮に関与していると考えられている。また創が治癒すると筋線維芽細胞は休止期に入るかアポトーシスをおこし減少する。

本研究では、創傷部位の線維芽細胞と筋線維芽細胞における種々の細胞増殖因子の経時的変化について、マウス背部に作成した皮膚切除創モデルを用いて調べた。測定した増殖因子は platelet-derived growth factor A (PDGFA), basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor-1 (FGF-R1), FGF receptor-2 (FGF-R2), epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF), transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) および transforming growth factor  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) で、免疫組織化学染色の手法を用いた。組織切片の作成には horizontal sectioning を行うことで、線維芽細胞や筋線維芽細胞の配列が創収縮に及ぼす影響について組織学的に観察することを可能にした。 $\alpha$ -SMA および 8 種の増殖因子を免疫染色した horizontal section の標本を観察し、肉芽組織内の少なくとも 150 個の線維芽細胞を含む 5 視野の強拡張像で、総細胞数および陽性細胞数を計測しそれぞれの視野の陽性細胞率を算出した。実験モデル作成後 14 日目以降の標本は、創が完全に治癒していたので癒痕組織内の細胞数で計測した。さらに、創傷治癒モデルで筋線維芽細胞内に発現することが確認されている  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) を測定し、肉芽組織中の筋線維芽細胞数の経時的変化と配列の変化を調べた。

皮膚欠損創モデル作成後 5, 7, 10, 14 および 20 日目に採取した組織を、ヘマトキシリン・エオジン染色して観察した結果 Horizontal section においては、5 日目から 10 日目にフィブリン塊を取り囲むように肉芽組織が創辺縁から増殖し、肉芽組織中の線維芽細胞が同心円状に配列していた。14 日目から 20 日目の癒痕組織中の線維芽細胞も同心円状に配列していた。特に創収縮を起こしている部分では、線維芽細胞は創縁に平行に連続した層状に配列していた。

各抗体での免疫組織化学染色における陽性細胞率を測定し、経時的変化を記録した結果、皮膚欠損創の線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞率の経時的変化は、7 日目から 10 日目にかけて 80% 以上に増加しその後減少した。各増殖因子の陽性細胞率の経時的変化は、5 日目には 80% 以上の線維芽細胞が bFGF と PDGFA 陽性で、その後徐々に減少した。FGF-R1, FGF-R2 および EGF 陽性細胞数は、初め増加し 10 日目でピークに達しその後減少したが、FGF-R2 の変化は FGF-R1 にくらべ緩徐な変化を示した。

TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 および KGF は 5 日目から 20 日目まで増加し続けたが、特に TGF- $\beta$ 1 は 10 日目から急速に増加した。

Horizontal section は皮膚の創傷治癒過程を観察する新しい方法である。本皮膚欠損創モデルの肉芽組織中の線維芽細胞は同心円状に配列しており、 $\alpha$ -SMA 染色によりそれらの細胞の 80%以上が筋線維芽細胞であることがわかった。この線維芽細胞と筋線維芽細胞が同心円状に配列することで創を収縮していると考えられる。

本実験の免疫組織染色の結果では、創傷治癒過程の早期には 80%以上の線維芽細胞が PDGFA と bFGF 陽性であり、その後徐々に減少した。PDGF は結合組織中の細胞増殖、つまり線維芽細胞、平滑筋細胞、あるいは好中球やマクロファージの増殖を促進することが *in vitro* の実験で明らかになっている。また bFGF は創傷治癒に関与する単球やマクロファージなどの炎症細胞、T リンパ球 (CD4 および CD8)、血管内皮細胞、および皮膚線維芽細胞など、多種の細胞で産生されている。PDGF と bFGF は創傷治癒過程の初期段階において重要な役割を持っていると推察される。本実験で FGF-R1, FGF-R2 および EGF の陽性細胞率は 10 日目にピークに達し、その後漸減した。これらの増殖因子は創傷治癒過程の中期に多く発現して肉芽組織や筋線維芽細胞の増殖や創収縮に関与すると考えられる。TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 2 の陽性細胞率は、20 日目まで漸増しつづけた。一般に TGF- $\beta$  は、単球、リンパ球、好中球および線維芽細胞に対して強力に増殖促進作用を示すが、本実験の結果では TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 2 は創傷治癒過程の後期に最も多く発現しており、瘢痕組織や角化細胞の形成や成熟に関与していると考えられる。

本研究の結果から、皮膚全層欠損創における細胞増殖因子の経時的変化は、3つの段階があると考えられる。つまり、第1段階では PDGF と bFGF が重要な役割をもち、肉芽形成などの創傷治癒初期の過程を惹起する。第2段階では FGF-R1, FGF-R2 および EGF が多く産生され、肉芽組織の増殖に重要な役割をもち、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞数が最大になるのも、この時期であり、筋線維芽細胞が創収縮に関わっている。第3段階では、TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 および KGF 陽性細胞がピークに達する。TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 2 は瘢痕組織を成熟させ、KGF は肉芽組織表面での角化細胞の分裂増殖を促進し表皮を成熟させる。

今後の研究では、これら各段階での増殖因子の生化学的メカニズムが解明される必要がある。また疾病治療の点からは、病態生理学的に関連性のあるリガンドーレセプターの組み合わせが同定され、これらの増殖因子の作用を変化させる薬剤が開発され臨床応用されることが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹  
副 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 近 藤 哲

## 学位論文題名

### マウス皮膚欠損創における細胞増殖因子の経時的変化に ついての Horizontal section による免疫組織化学的研究

本研究は、皮膚創傷部位の線維芽細胞と筋線維芽細胞における種々の細胞増殖因子の経時的変化について、免疫組織化学的に解析を行ったものである。

個々の増殖因子の創傷治癒における役割を知るために、それらのタンパクや mRNA の測定など多くの研究がなされてきたが、それらの経時的変化あるいは発現部位の違いについては、いまだ明らかとは言えない。本研究では、創傷部位の線維芽細胞と筋線維芽細胞における種々の細胞増殖因子の経時的変化について、マウス背部に作成した皮膚切除創モデルを用いて調べた。測定した増殖因子は platelet-derived growth factor A (PDGFA), basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor-1 (FGF-R1), FGF receptor-2 (FGF-R2), epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF), transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) および transforming growth factor  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) で、免疫組織化学染色の手法を用いた。組織切片の作成には horizontal sectioning を行うことで、線維芽細胞や筋線維芽細胞の配列が創収縮に及ぼす影響について組織学的に観察することを可能にした。実験モデル作成後 5, 7, 10, 14 および 20 日目に採取した組織を、ヘマトキシリン・エオジン染色して観察した結果、horizontal section においては、5日目から10日目にフィブリン塊を取り囲むように肉芽組織が創辺縁から増殖し、肉芽組織中の線維芽細胞が同心円状に配列していた。14日目から20日目の癒痕組織中の線維芽細胞も同心円状に配列していた。各抗体での免疫組織化学染色における陽性細胞率を測定し、経時的変化を記録した結果、皮膚欠損創の線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞率は、7日目から10日目にかけて80%以上に増加しその後減少した。各増殖因子の陽性細胞率の経時的変化は、5日目には80%以上の線維芽細胞が bFGF と PDGFA 陽性で、その後徐々に減少した。FGF-R1, FGF-R2 および EGF 陽性細胞数は、初め増加し10日目でピークに達しその後減少した。TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 および KGF は5日目から20日目まで増加し続けた。

Horizontal section は皮膚の創傷治癒過程を観察する新しい方法である。本皮膚欠損創モデルの肉芽組織中の線維芽細胞は同心円状に配列しており、80%以上が筋線維芽細胞であることがわかった。この線維芽細胞と筋線維芽細胞が同心円状に配列することで創を収縮していると考えられる。本研究の結果から、皮膚全層欠損創における細胞増殖因子の経時的変化は、3つの段階があると考えられた。つまり、第1段階では PDGF と bFGF が重要な役割をもち、肉芽形成などの創傷治癒初期の過程を惹起する。第2段階では FGF-R1, FGF-R2 および EGF が多く産生され、肉芽組織の増殖に重要な役割

をもつ。第3段階では、TGF- $\beta$ 1とTGF- $\beta$ 2は癒痕組織を成熟させ、KGFは肉芽組織表面での角化細胞の分裂増殖を促進し表皮を成熟させる。

公开发表にあたり、副査近藤哲教授より、1) 創傷治癒過程のhorizontal sectionの各層での組織所見の相違点、2) 各増殖因子の経時的変化の測定結果から考えられる、将来的な臨床応用の可能性について、質問およびコメントがあった。次いで、副査清水宏教授より、1) 創傷部位に局在している各増殖因子の量的差、2) 本実験系のDay 0での各増殖因子の状態、3) 創周囲皮膚のstem cellの存在部位とその免疫染色結果について、質問およびコメントがあった。次に形成外科学分野山本有平助教より、潰瘍底が脂肪組織であった場合に予想される結果について質問があった。最後に主査杉原平樹教授より、1) 実験モデルが皮膚切開創であった場合に予想される線維芽細胞の配列形態、2) 実験方法に免疫組織化学染色を用いた理由について質問およびコメントがあった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、妥当な回答をした。

この論文は、皮膚創傷治癒における種々の細胞増殖因子の発現時期と創収縮について、horizontal sectionを用いて免疫組織化学的に明らかにした点で高く評価され、今後、創傷治癒遅延などの病態の解明と診断治療につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位に受けるのに十分な資格を有するものと判定した。