

Development of Novel Mouse Model of Ulcers Induced by Implantation of Magnets

(磁石埋め込みによるマウス潰瘍モデルの新規開発)

氏名 竹内 由利子

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用医工学系専攻 器官制御医科学領域
器官病態外科学 (外科学第一)

平成 29 年 11 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	6
4. 方法	7
5. 結果	12
6. 考察	24
7. 結語	26
8. 謝辞	27
9. 参考文献	28

1. 要旨

難治性皮膚潰瘍の病態は複雑かつ多様であり、未だ臨床病態を正確に反映した動物モデルは確立されていない。そこで、より実臨床に近いモデルとして、マウス“磁石埋込モデル”を新規に開発した。これは、背部の皮膚を2個の磁石で7日間持続的に挟んで脱落させるもので、難治性潰瘍を特徴付ける、多量の浸出液や炎症細胞浸潤、潰瘍周囲の表皮肥厚といった性質を備えている。特に表皮肥厚に関しては、創傷治癒過程で上皮化に寄与するTGF- β シグナルの抑制が関与することが知られている。実際に6例の下肢切断患者の臨床検体でシグナル抑制が認められ、この性質は磁石埋込モデルでも再現された。一方でリガンドとなるTGF- β 1は磁石埋込モデルでも臨床検体でも高発現していた。同様に再上皮化で重要な役割を果たすKGFはいずれにおいても低発現であった。KGFは真皮の線維芽細胞に発現し、表皮のケラチノサイトを刺激して潰瘍の上皮化を促すが、皮膚潰瘍におけるTGF- β 1とKGFの関連についてはあまり知られていない。そこで、TGF- β 1のリコンビナントタンパクをヒト線維芽細胞に添加したところ、KGFの発現が低下するという事実を見出した。これらのことから、潰瘍におけるTGF- β 1の上昇がTGF- β シグナルやKGFの発現を低下させ、再上皮化を抑制するメカニズムが新たに示唆された。最後に、難治性皮膚潰瘍の新たな治療法として当教室で考案された、線維芽細胞と末梢血単核球からなる細胞混合シートの効果を同マウスモデルにて検証した。シートの貼付によって、創傷治癒の炎症期に上昇するとされる炎症性サイトカインの低下と、肥厚化した表皮の菲薄化を認めるばかりでなく、治癒が促進された。これらのことから、我々の潰瘍モデルは臨床病態により近い動物モデルであると言え、細胞混合シートは炎症期の遷延や上皮化抑制のメカニズムを断ち切る新たな潰瘍治療デバイスとなる可能性がある。

2. 研究の背景

難治性皮膚潰瘍は世界中に蔓延している疾患であり、その原因は静脈不全や虚血性疾患（閉塞性動脈硬化症、バージャー病、ブルートゥー症候群など）、糖尿病、褥瘡など多岐にわたる[1-3]。創傷治癒は、炎症細胞浸潤に始まり、血管新生による毛細血管のネットワーク構築や線維芽細胞の誘導、線維芽細胞の筋線維芽細胞への転換、コラーゲン沈着からなる肉芽組織の増生、そして再上皮化に至る過程であるが、それぞれが複雑かつ高度に制御されており、効果的なサイトカインや成長因子の分泌が重要な役割を果たしている[2]。健常人での急性創傷治癒と異なり、難治性皮膚潰瘍は多様な原因から引き起こされているためより複雑で、病理学的研究が多く行われてきたが、そのメカニズムは未だ完全には解明されていない。このような慢性の皮膚潰瘍のメカニズムとして、サイトカインおよび増殖因子の分泌障害や幹細胞の誘導抑制[4]、不適切なマクロファージスイッチ[5]などが知られている。特に静脈性潰瘍では、EGFやTGF- β 受容体シグナルの減弱が表皮細胞の活性化と分化を抑制し、難治化に繋がっていると報告されているが[6-8]、虚血性潰瘍の分子学的病態についてはあまり知られていないのが現状である。さらに、皮膚潰瘍の詳細な分子学的メカニズムが解明されていないために、適切な動物モデルを作ることが難しく、臨床応用可能な新たな治療法の開発が制限されている。

皮膚潰瘍のマウスモデル[2, 9]として、単純切り取りモデル、磁石で間欠的に皮膚を挟むことによる虚血再還流障害モデル[10, 11]、皮弁や血管結紮による虚血モデル[12, 13]、糖尿病モデル[14]、感染モデル[15]などが開発されてきた。しかし、マウスの皮膚には皮筋と言う特有の構造物が存在しているため、創が急速に収縮し[9]、著しく創傷治癒遅延を実現できるモデルはなかった。創周囲にシリコンのリングを縫着して創の収縮を最小限に抑える工夫もなされたが[16]、これでは、肉芽形成や再上皮化といったヒトの創傷治癒過程を再現することができない。さらに、マウスの創は乾燥することでより早く収縮してしまうため[17]、マウスの活発な運動によってドレッシング材が創からわずかでも剥がれてしまうと、創傷治癒スピードの正確な評価は不可能となる。そこで我々は、創傷治癒のスピードに拘ったモデルよりも、分子学的メカニズムに主眼を置き、創部で起きている分子動態がヒトの難治性皮膚潰瘍に少しでも近い動物モデルを目指し、磁石埋め込みモデルを開発した。

一方、我々は難治性皮膚潰瘍の治療法として、末梢血単核球と線維芽細胞からなる細胞混合シートを考案し、動物実験レベルで創傷治癒率の短縮に寄与することを証明してきた[18]。この細胞シートは高い血管新生能を有しており、さらにその血管新生能は、低酸素での培養を24時間加えることにより高まることが分かっている（低酸素プレコンディショニング）。これまでは単純切り取りモデルでの検証であったが、磁石埋め込みモデルでも細胞混合シートの効果を検証することとした。

3. 目的

本研究の目的は、我々が新規に考案した“磁石埋め込みモデル”を解析し、分子メカニズムの観点から、従来の“単純切り取りモデル”に対する優位性を示すことである。そして、同じく我々が開発した難治性皮膚潰瘍の治療デバイスである細胞混合シートの効果を同動物モデルで検証することである。さらにヒトの臨床サンプルを用いて、虚血に由来する難治性潰瘍の病態解析を行い、磁石埋め込みモデルとの類似性を示すことも目的とする。

4. 方法

皮膚潰瘍モデルの作製

オスの C57BL/6 マウスを Japan SLC 社より購入した。山口大学の動物実験倫理委員会の承認の下、そのガイドラインに則り、全ての動物実験を実施した（# 31-093）。マウスを 1.5% イソフルランの吸入にて麻酔し、施術を行った。手術に使用した器具や磁石はあらかじめ乾熱滅菌と EOG ガス滅菌を行った。マウス体幹部を全周性に剃毛し、除毛クリームで除毛したのち、75% エタノールで消毒した。“磁石埋め込みモデル”の作製のため、マウス背部に十字切開を加え（図 1a）、1 つ目の磁石（10mm 径、5mm 厚）を切開部より皮下に埋め込んだ（図 1b）。次に、切開部の皮膚の上から 2 つ目の磁石を置くことで 1 つ目の磁石との間で皮膚を挟み込んだ（図 1c）。マウス体幹部をコットンシートで巻き、磁石のずれや脱落を防ぐため、サージカルテープでしっかりと固定した（図 1d）。7 日後に、コットンシートとサージカルテープを除去したところ、挟まれていた皮膚が 2 つの磁石とともに自然脱落し、皮膚潰瘍を完成させた（図 1e）。一方、“単純切り取りモデル”は、剪刀で鋭的に背部皮膚を切り取り、磁石埋め込みモデルの皮膚潰瘍とほぼ同等の大きさ（直径 10-13mm）の円形皮膚欠損を作製した（図 1f）。

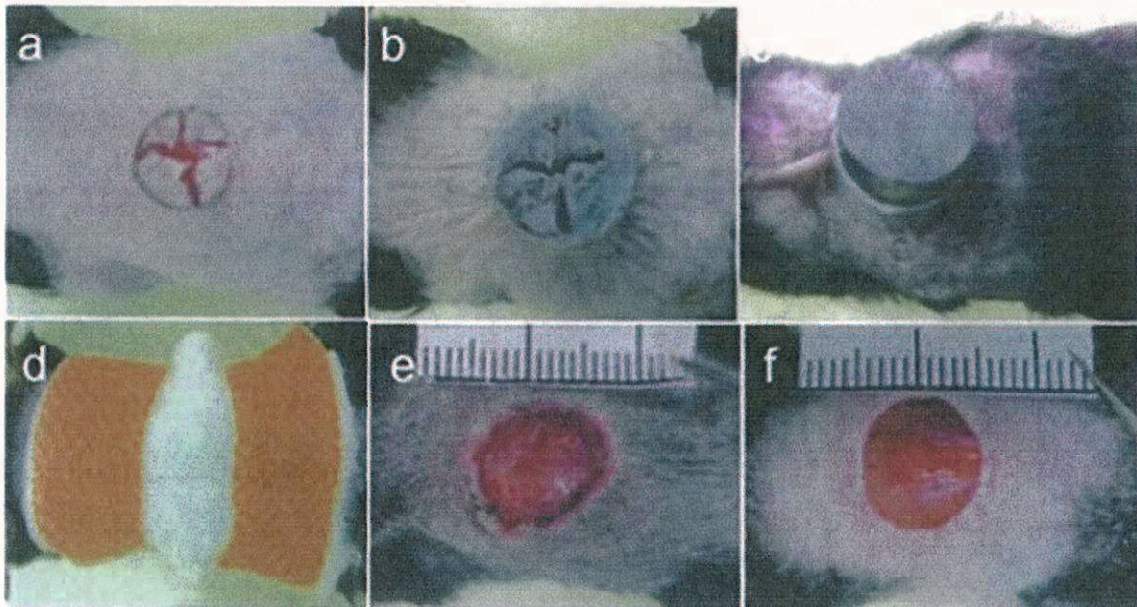


図 1. 磁石埋め込みモデルの作製

磁石埋め込みモデル潰瘍部からの浸出液の定量

磁石埋め込みモデルと単純皮膚切り取りモデルの皮膚潰瘍部をそれぞれハイドロコロイドドレッシング材で被覆した。ドレッシング材は高い吸水性と保水性を有するアブソキュア（日東メディカル社）を使用した。その上から弾性接着包帯（ニチバン社）を巻いて固定した。毎日ドレッシング材を交換し、皮膚潰瘍へ貼付する前と剥がした後のアブソキュアの重量を測定し、その差を1日の浸出液産生量とした。さらに1日浸出液産生量を、Image Jソフトウェアで測定したその時点での潰瘍面積で除したものを、2つのモデル間で比較した。

磁石埋め込みモデル潰瘍縁の組織学的解析

磁石埋め込みモデルと単純皮膚切り取りモデルの、潰瘍作製7日後の潰瘍縁の皮膚切片にて、炎症細胞浸潤、幼若血管形成、表皮の厚さを解析し比較した。潰瘍縁の皮膚を切除し、10%パラホルムアルデヒドで固定したのち、パラフィン包埋した。薄切凍結切片(3 μ m厚)を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マッソントリクロム(MT)染色、各種免疫組織染色を行った。免疫組織染色は炎症細胞の同定のため、以下の手順で行った。脱パラフィン化した切片をTarget Retrieval Solution(DAKO Cytomation社)で抗原賦活化し、ビオチンブロッキング(DAKO Cytomation社)、内因性ペルオキシダーゼブロッキング(DAKO Cytomation社)、プロテインブロッキング(DAKO Cytomation社)処理を行った。マクロファージ、好中球、Tリンパ球に対する1次抗体として、抗CD68マウスモノクローナル抗体(Abcam社)、抗ミエロペルオキシダーゼラビットポリクローナル抗体(Abcam社)、抗CD3ラットモノクローナル抗体(Abcam社)でそれぞれ単染色(2時間室温)した後、ビオチン化2次抗体(それぞれ抗マウスIgG、抗ラビットIgG、抗ラットIgG)にて1時間室温で反応させた(抗体はいずれもAbcam社)。その後 horseradish peroxidase-conjugated avidin-biotin complex を反応させ、DAB染色を行った。ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。血管の免疫組織染色は、切片を脱パラフィン化、抗原賦活化した後、プロテインブロッキングを行い、血管平滑筋、血管内皮細胞に対し、それぞれ抗 α -SMA-Cy3抗体(Sigma-Aldrich社)、抗CD31抗体(Abcam)+Dylight550-抗ラビットIgGヤギ抗体で標識した。表皮厚の評価は、HE染色切片でImage Jソフトを用いて行った。

磁石埋め込みモデル潰瘍縁における増殖因子発現

皮膚潰瘍作製7日後の潰瘍縁皮膚から lysis buffer を用いてタンパクを抽出した。VEGF, PDGF-BB の発現をそれぞれのプロトコルに従い、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) (R&D 社) にて解析した。

磁石埋め込みモデル潰瘍縁における表皮変化に関与する因子の mRNA 発現

潰瘍縁における表皮変化に関与する因子の mRNA 発現レベルを qPCR (定量リアルタイム PCR) にて解析した。皮膚潰瘍作製7日後の潰瘍縁皮膚から、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen 社) を用いて、添付されているプロトコルに従い全 RNA を抽出し、PrimeScript® RT Master Mix (TaKaRa 社) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応により合成した cDNA を鋳型とし、SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) を用い、Step One Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) による qPCR を行った (50°C2分、95°C2分の後、95°C3秒と 60°C30秒を 40 サイクル)。反応は 10 μ l 各 3 サンプルずつ行った。qPCR に用いたプライマーの配列は以下のとおりである。

プライマー名	配列	
マウス	Forward	Reverse
β -actin	5'-gtcctcctgagcgcaag-3'	5'-catctgctggaaggtggaca-3'
TGF- β R I	5'-atggtccgagaggcagaga-3'	5'-ccatgtcccattgtctttgtg-3'
TGF- β R II	5'-gcggcgagactttctca-3'	5'-ggactgctggtggtgtattcttc-3'
TGF- β R III	5'-aaagccccaaggttg-3'	5'-ggaaggtgctgtaaggattgga-3'
SMAD2	5'-agcagtgaaaagtctggtgaaaag-3'	5'-tgcaattctgagtggatgg-3'
TGF- β 1	5'-ctgctcttgacagcaaagataac-3'	5'-cggttcatgcatggatgg-3'
KGF	5'-aaagggaccaggagatgaag-3'	5'-cactttccacccttgattg-3'

β -actin の発現量に対するそれぞれの因子の発現量比を $\Delta\Delta$ CT 法にて算出した。

細胞混合シートの作製と磁石埋め込みモデルへの貼付

末梢血単核球は Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories 社) を用いてマウス末梢血から比重遠心法で分離、線維芽細胞はマウスの尾からコラゲナーゼ (和光社) を用いて分離し、それぞれ 10%ウシ血清 (Thermo Fisher Scientific 社) 含有の CTS AIM-V メディウム (Thermo Fisher Scientific 社) で培養した。細胞混合シート作製のため、PBMNC 1ml (2×10^6 細胞/ml) と線維芽細胞 1ml (1.25×10^5 細胞/ml) を温度応答性細胞培養皿である UpCell (CellSeed 社) 24 well plate に播種した。細胞を 2 日間通常酸素条件下 (37°C、20%酸素、5%二酸化炭素) で培養したのちに、1 日低酸素条件下 (33°C、20%酸素、5%二酸化炭素) で培養し、低酸素プレコンディショニングを行った。1000 μ l ピペットを用いて細胞混合シートを吸引し、磁石埋め込みモデルの皮膚潰瘍上へ載せた。皮膚潰瘍をウルゴチュール (Laboratories Surgo 社) 及びデルマエイド (ALCARE 社) で被覆し、弾性接着包帯 (ニチバン社) で固定した。

細胞混合シートの磁石埋め込みモデルにおける効果の解析

磁石埋め込みモデル完成直後と磁石埋め込みモデルに介入 (細胞混合シート貼付群、皮膚潰瘍の治療法として臨床現場で汎用されているトラフェルミンの噴霧群、生理食塩液滴下群) を行った翌日に、潰瘍縁から上述の如くタンパクを抽出し、TNF- α 、IL-6、MIP-1 α の発現を ELISA (R&D 社) にて解析した。さらに、介入 7 日後の表皮厚の変化を、磁石埋め込みモデルに細胞混合シートを貼付する群としない群で比較した。また、磁石埋め込みモデルに細胞混合シートを貼付する群としない群において、介入前および介入後 3, 5, 7 日目の潰瘍面積をそれぞれ Image J にて測定し、各時点における潰瘍治癒率 (潰瘍面積縮小率) を比較した。

ヒト臨床サンプルの採取と mRNA 発現解析

閉塞性動脈硬化症 (ASO ; arteriosclerosis obliterans) にて足趾切断を行われた 6 例の患者より、同意を得た上で、廃棄組織である足趾を実験に使用した。また本実験は、事前に山口大学倫理委員会からの承認を得ており (H27-193)、携わる全ての研究者はヘルシンキ宣言に従っている。切断足趾の断端付近 (正常部)、潰瘍縁の 2 箇所から皮膚組織を採取し、上述のごとく mRNA を抽出し qPCR を行った。用いたプライマーの配列は以下のとおりである。

プライマー名	配列	
ヒト	Forward	Reverse
β -actin	5'-gctcctcctgagcgcaag-3'	5'-catctgctggaaggtggaca-3'
TGF- β R I	5'-gctcaggtttaccattgcttgttc-3'	5'-ttcctctccaaacttctccaaatc-3'
TGF- β R II	5'-gtgtggctgtatggagaaagaatg-3'	5'-gtcatggtaggggagcttgg-3'
TGF- β R III	5'-agcagttacttcattcaccgaactc-3'	5'-ctatgttgcaactttggagggaaac-3'
SMAD2	5'-aacttcccagcaggaattgag-3'	5'-ggcacttgtttctccatcttcac-3'
TGF- β 1	5'-cgtggaggggaaattgagg-3'	5'-cggtagtgaaccggttgatg-3'
KGF	5'-tgaacaaggaaggaaaactctatgc-3'	5'-gctgatgcatatgtgttgtaatgg-3'

β -actin の発現量に対するそれぞれの因子の発現量比を $\Delta\Delta$ CT 法にて算出した。

TGF- β 1 リコンビナントタンパク添加によるヒト線維芽細胞の反応

ヒト線維芽細胞は、健常人ボランティアより採取した口腔粘膜からコラゲナーゼ (和光社) 処理にて分離し、5%自己血清含有の CTS AIM-V メディウム (Thermo Fisher Scientific 社) で培養した。自己血清は自己血より Serum Collection Set (JMS 社) を用いて回収した。ヒト線維芽細胞 (2×10^4 細胞/well) を 24 well plate に播種して 24 時間後に、TGF- β 1 のリコンビナントタンパクを 1, 5, 10 ng/mL ずつ添加した。24 時間培養後、ヒト線維芽細胞から mRNA を抽出し、上述の如く qPCR を行った。

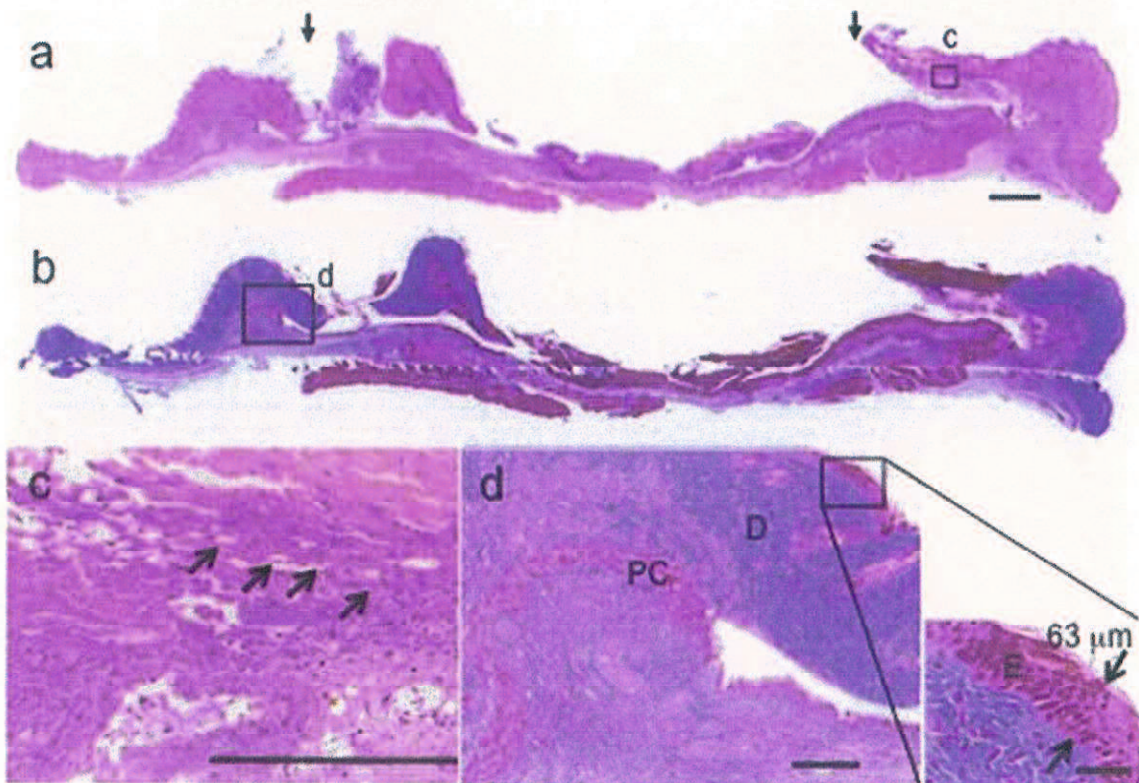
統計学的解析

全てのデータを平均値 \pm 標準偏差で表記した。多群間の統計学的な比較は one-way ANOVA 検定で評価し、Bonferroni 法で補正した。2 群間の統計学的な比較は Student's t-test で評価した。 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意差ありとした。統計学的解析は全て、STATA software (StataCorp 社) を用いた。

5. 結果

磁石埋め込みモデルの肉眼的および組織学的特徴

肉眼的に、磁石埋め込みモデルでは潰瘍縁に障害がおよび、潰瘍底が粗造となっていたのに対し、単純切り取りモデルでは潰瘍縁、潰瘍底ともクリアであった。組織学的には、磁石埋め込みモデルは皮筋以浅の皮膚が欠損しており（図 2a, b）、欠損部周囲の潰瘍縁では真皮層と表皮層がそれぞれ、単純切り取りモデルと比較し肥厚していた（図 a, b, e, f）。特に表皮層の厚さは、ある単純切り取りモデルで $12\mu\text{m}$ であったのに対し（図 2h）、ある磁石埋め込みモデルでは $63\mu\text{m}$ と肥厚しており（図 2d）、磁石埋め込みモデルにおける表皮肥厚化は、検討した 13 匹全てのマウスに認められた。さらに、磁石埋め込みモデルの真皮層において虚血障害により引き起こされたと考えられる凝固壊死像を認めたが（図 2c）、単純切り取りモデルでは認めなかった（図 2g）。



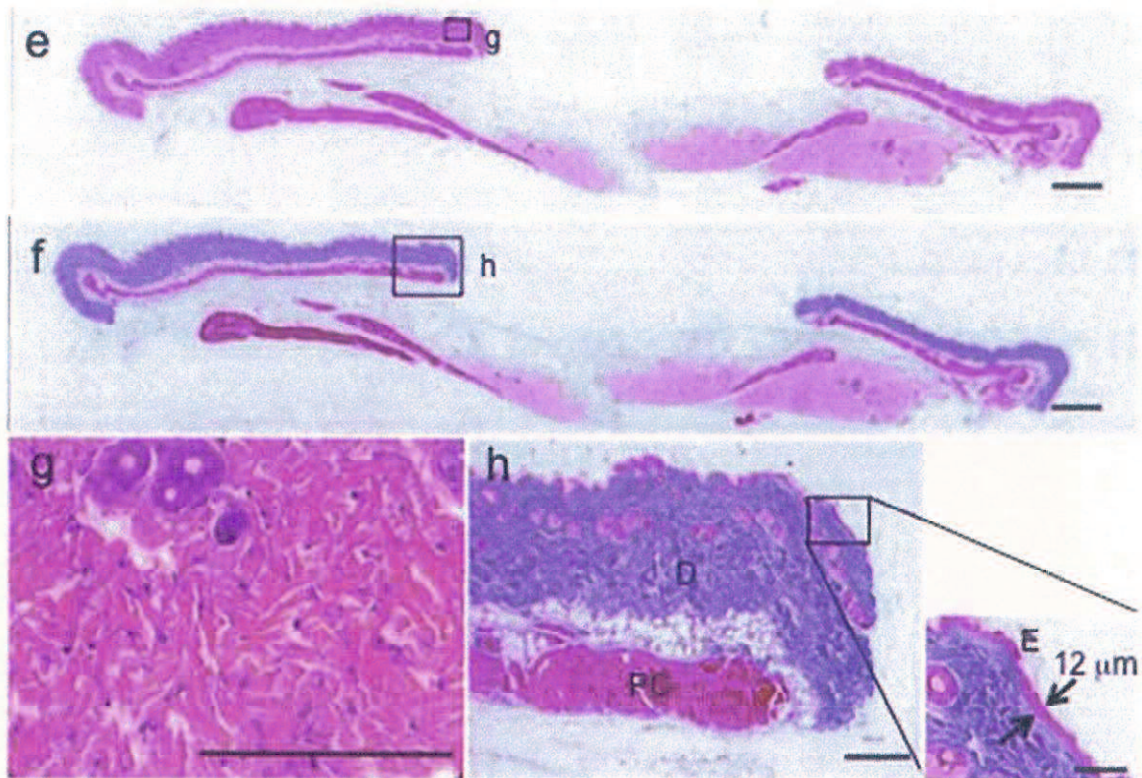


図 2. 磁石埋め込みモデルの肉眼的および組織学的特徴

(a-d) 磁石埋め込みモデル

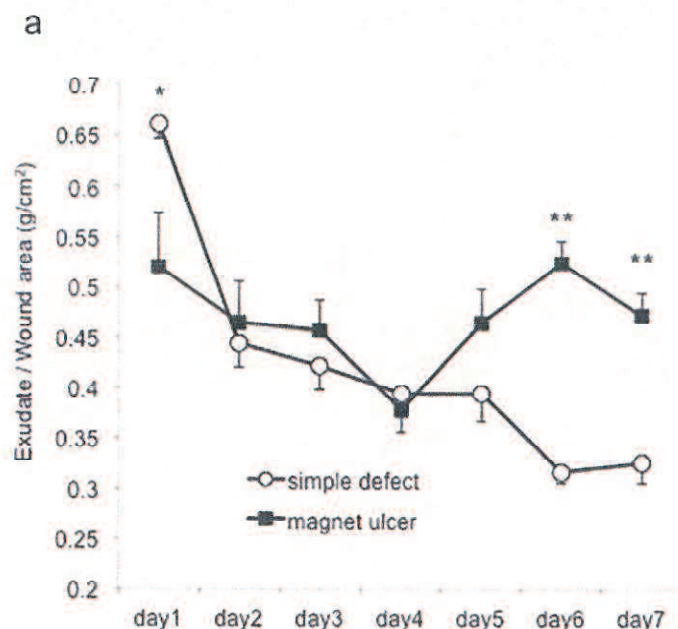
(a) HE 染色、スケールバーは 1000 μm を表す。矢印は潰瘍縁を表す。(b) MT 染色、スケールバーは 1000 μm を表す。(c) 図 2a の皮膚潰瘍縁の真皮層（四角で囲まれた部位）を拡大したものである。スケールバーは 200 μm を表す。矢印は凝固壊死に陥った箇所を示す。(d) 図 2b の潰瘍縁の皮膚全層（四角で囲まれた部位）を拡大したものである。スケールバーは 200 μm を表す。表皮層の厚さは 63 μm であった。E：表皮、D：真皮、PC：皮筋の意である。

(e-h) 単純切り取りモデル

(e) HE 染色、スケールバーは 1000 μm を表す。矢印は創縁を表す。(f) MT 染色、スケールバーは 1000 μm を表す。(g) 図 2e の創縁の真皮層（四角で囲まれた部位）を拡大したものである。スケールバーは 200 μm を表す。矢印は凝固壊死に陥った箇所を示す。(h) 図 2f の創縁の皮膚全層（四角で囲まれた部位）を拡大したものである。スケールバーは 200 μm を表す。表皮層の厚さは 12 μm であった。E：表皮、D：真皮、PC：皮筋の意である。

磁石埋め込みモデルにおける炎症反応

過剰な浸出液は、遷延する炎症反応の結果であり、創の難治化を示す重要な因子である[19]。磁石埋め込みモデルの潰瘍面積当たりの浸出液産生量は、皮膚潰瘍完成 1 日目では単純切り取りモデルより少なかったが、5 日目より増加し、6, 7 日目においては単純切り取りモデルを上回った (図 3a)。また、過剰な浸出液産生は、炎症細胞浸潤や血管透過性の亢進と関連していると考えられる。そこで、皮膚潰瘍完成 7 日後の組織にて免疫染色を行い、マクロファージや好中球、T リンパ球といった炎症細胞浸潤の程度および、血管透過性と関与する未熟血管の数を解析した。マクロファージは主に潰瘍底に (図 3b, c)、好中球は全層に (図 3e, f)、T リンパ球は主に潰瘍縁の表皮基底層に局在していたが (図 3h, i)、いずれの細胞も、単純切り取りモデルより磁石埋め込みモデルの方が有意に多かった (図 3d, g, j)。さらに、CD31 陽性 α -SMA 陰性の未熟血管、CD31 陽性 α -SMA 陽性の成熟血管を識別し、全血管にしめる未熟血管の割合を解析したところ、その割合は磁石埋め込みモデルで有意に高かった (図 3k, l, m, n, o)。一方磁石埋め込みモデルでは、VEGF 及び PDGF-BB のタンパク発現レベルが低下していた (図 3p)。



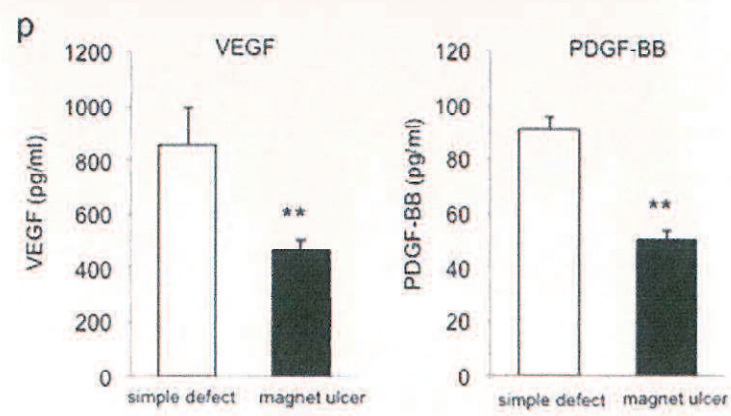
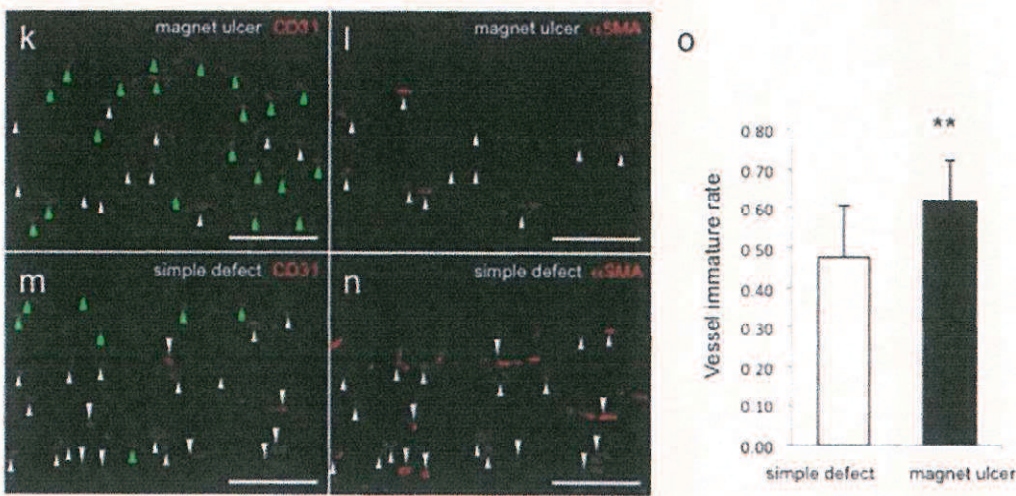
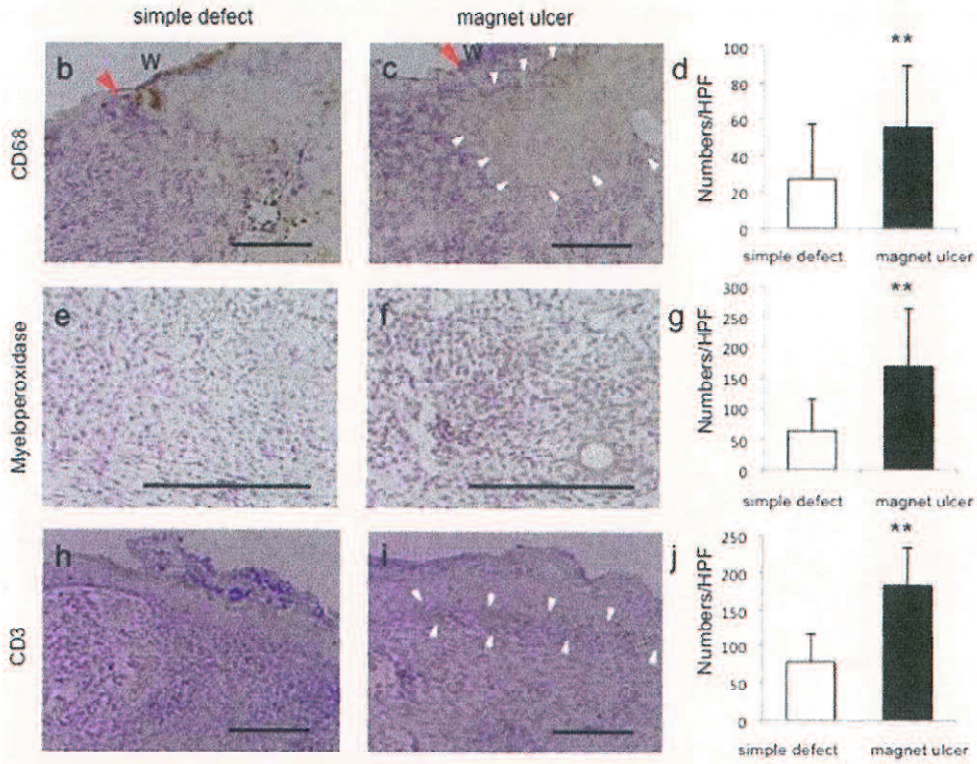


図 3. 磁石埋め込みモデルにおける炎症反応

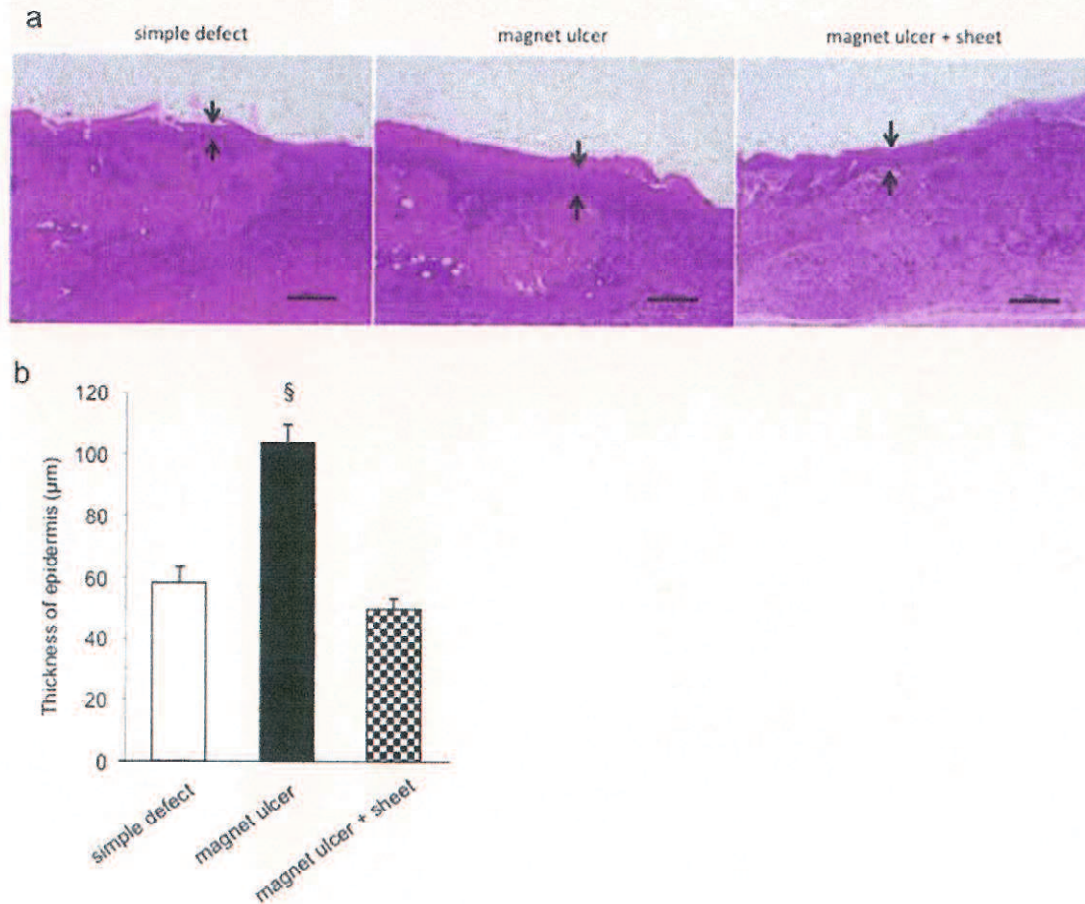
(a) 皮膚潰瘍からの浸出液を毎日測定し、その推移をグラフに示す。* は $p < 0.05$ vs. 単純切り取りモデルを、**は $p < 0.01$ vs. 単純切り取りモデルを表す。

(b, c, e, f, h, i) 皮膚潰瘍完成 7 日後の磁石埋め込みモデル、単純切り取りモデルにおける、マクロファージ (CD68)、好中球 (ミエロペルオキシダーゼ)、T リンパ球 (CD3) の免疫組織染色を示す。(b, c) の赤色矢頭は潰瘍縁を示す。(c) の白色矢頭はマクロファージが浸潤している領域を示し、W は創部の意である。

(i) の白色矢頭は表皮の基底層に集簇する T リンパ球を示す。(d, g, j) 3 つの切片でそれぞれ 8 つの拡大視野で測定した炎症細胞数の平均値をグラフに示す。**は $p < 0.01$ vs. 単純切り取りモデルを表す。(k-n) 磁石埋め込みモデル、単純切り取りモデルにおける、CD31 と α -SMA の免疫組織染色を示す。4 つの図は連続切片である。白色矢頭は CD31 陽性 α -SMA 陽性血管、緑色矢頭は CD31 陽性 α -SMA 陰性血管を示す。スケールバーは 200 μm を表す。(o) 磁石埋め込みモデル、単純切り取りモデルにおける幼若血管の割合 (全ての CD31 陽性血管に対する CD31 陽性 α -SMA 陰性血管の割合) をグラフに示す。**は $p < 0.01$ vs. 単純切り取りモデルを表す。(p) VEGF と PDGF-BB のタンパクレベルを ELISA で解析したものをグラフに示す。**は $p < 0.01$ vs. 単純切り取りモデルを表す。

磁石埋め込みモデル潰瘍縁における表皮変化

磁石埋め込みモデルの潰瘍縁は肉眼的に障害されており、組織学的には表皮の過形成が起こっていた。表皮の厚さは単純切り取りモデルと比較し、有意に厚くなっていた (図 4a, b)。TGF- β シグナル経路の構成因子である TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII, SMAD2 の mRNA 発現レベルは、単純切り取りモデルと比較し磁石埋め込みモデルで有意に抑制されていた (図 4c)。一方で TGF- β 1 の mRNA とタンパク発現レベルは、磁石埋め込みモデルで有意に高かった (図 4c, d)。また、KGF (FGF7) の mRNA 発現レベルは磁石埋め込みモデルで有意に低かった (図 4c)。



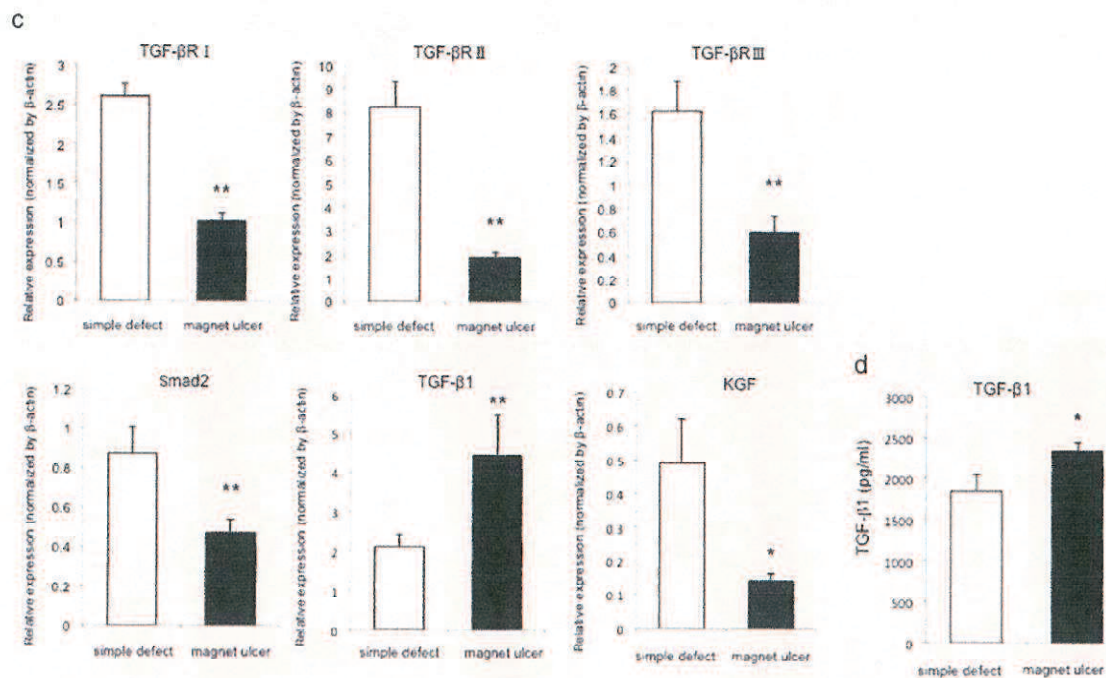


図 4. 磁石埋め込みモデル潰瘍縁における表皮変化

皮膚潰瘍完成 7 日後の磁石埋め込みモデル、単純切り取りモデルにおける表皮の厚さを評価し、関連因子の解析を qPCR と ELISA にて行った。

(a) 磁石埋め込みモデル、単純切り取りモデルそれぞれの代表的な組織像を示す (一番右に細胞混合シート貼付 7 日後の組織像も示している)。矢印は表皮の厚さを示す。スケールバーは 200 μm を表す。(b) 表皮の厚さを、3 つの切片、それぞれ 2 つの拡大視野で、Image J ソフトにて測定した値の平均値をグラフに示す。§は $p < 0.01$ vs. 単純切り取りモデル、細胞混合シート貼付磁石埋め込みモデルを表す。(c) TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII, SMAD2, TGF- β 1, KGF をコードする mRNA の発現レベルを qPCR にて測定し、 β -actin の発現量に対するそれぞれの因子の発現量比を示す。*は $p < 0.05$ vs. 単純切り取りモデルを、**は $p < 0.01$ vs. 単純切り取りモデルを表す。(d) ELISA にて測定した TGF- β 1 のタンパクレベルをグラフに表す。**は $p < 0.01$ vs. 単純切り取りモデルを表す。

細胞混合シートの磁石埋め込みモデルにおける効果

我々が新規に開発した、線維芽細胞と末梢血単核球からなる細胞混合シートを磁石埋め込みモデルに貼付し、その反応を検証した。磁石埋め込みモデルに生理食塩液を滴下した翌日（コントロール）の TNF- α と MIP-1 の発現レベルは、磁石埋め込みモデル完成直後と比較して、有意に上昇した（図 5a）。そして、トラフェルミンと細胞混合シートはその発現レベルを有意に低下させた（図 5a）。同様に、IL-6 の発現レベルは細胞混合シートにより有意に低下した（図 5a）。表皮の厚さは細胞混合シートを貼付することにより、有意に菲薄化した（図 4a, b）。潰瘍治癒率は、細胞混合シート貼付群で、介入 5, 7 日目において有意に高かった（図 5）。

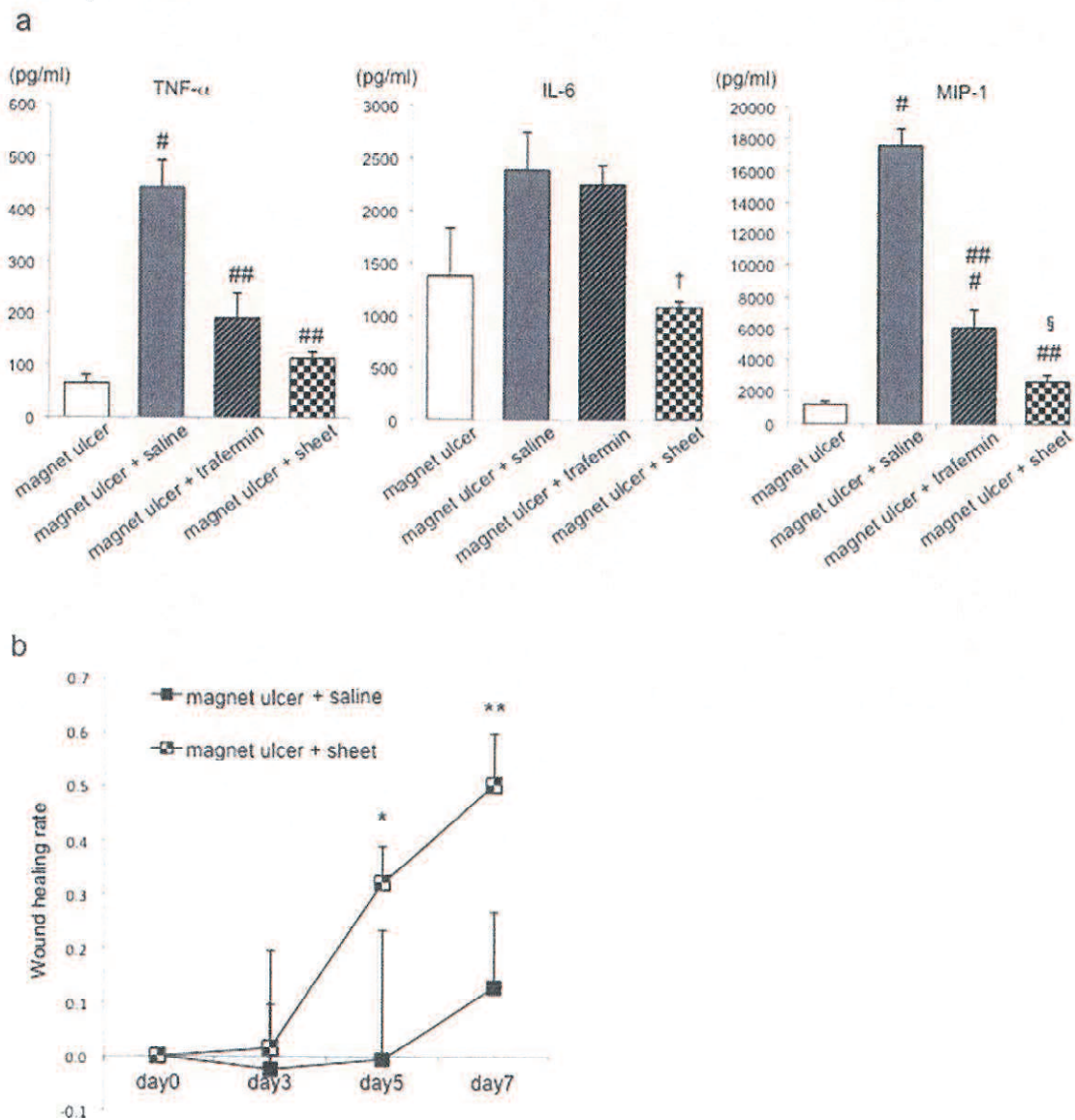


図 5. 細胞混合シートの磁石埋め込みモデルにおける効果

(a) 磁石埋め込みモデル完成直後と磁石埋め込みモデルに介入（生理食塩液滴下群、トラフェルミン噴霧群、細胞混合シート貼付群）を行った翌日の潰瘍縁における、TNF- α , IL-6, MIP-1 のタンパクレベル（ELISA で測定）をグラフに示す。#は $p < 0.01$ vs. 磁石埋め込みモデル完成直後、##は $p < 0.01$ vs. 生食滴下群、†は $p < 0.05$ vs. 生食滴下群を表す。(b) 生食滴下群と細胞混合シート貼付群の創傷治癒率をグラフに表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ vs. 生食滴下群を表す。

ヒト虚血性皮膚潰瘍における表皮肥厚に関する因子の mRNA 発現解析

6例の臨床サンプルにて実験を行った。6例の患者背景は以下の通りである。

症例	年齢	性別	皮膚潰瘍の原因	皮膚潰瘍罹患期間	局所治療	ドレッシング材
#1	83	女性	¹ ASO, 糖尿病	2年	なし	ガーゼ
#2	91	女性	¹ ASO	6ヶ月	なし	ガーゼ
#3	86	男性	ブルートウー症候群	2ヶ月	プロスタン ディン軟膏	ガーゼ
#4	73	男性	ブルートウー症候群、糖尿病	1ヶ月	なし	シリコンゲル
#5	71	女性	¹ ASO	1ヶ月	なし	ハイドロゲル
#6	76	男性	¹ ASO, 糖尿病	2ヶ月	なし	ガーゼ

¹ASO：閉塞性動脈硬化症

切断足趾の断端付近（正常部）および潰瘍縁の皮膚組織（図 6a）について表皮肥厚に関する因子の mRNA 解析を行ったところ、潰瘍縁における TGF- β RII, TGF- β RIII, KGF の発現レベルは正常部より有意に低下していた。TGF- β RI, SMAD2, TGF- β 1 に関しては、6例中4例で同様の発現パターンを呈しており、正常部と比較し潰瘍縁では、TGF- β RI, SMAD2 の発現は低く、TGF- β 1 の発現は高かった（図 6b）。

a



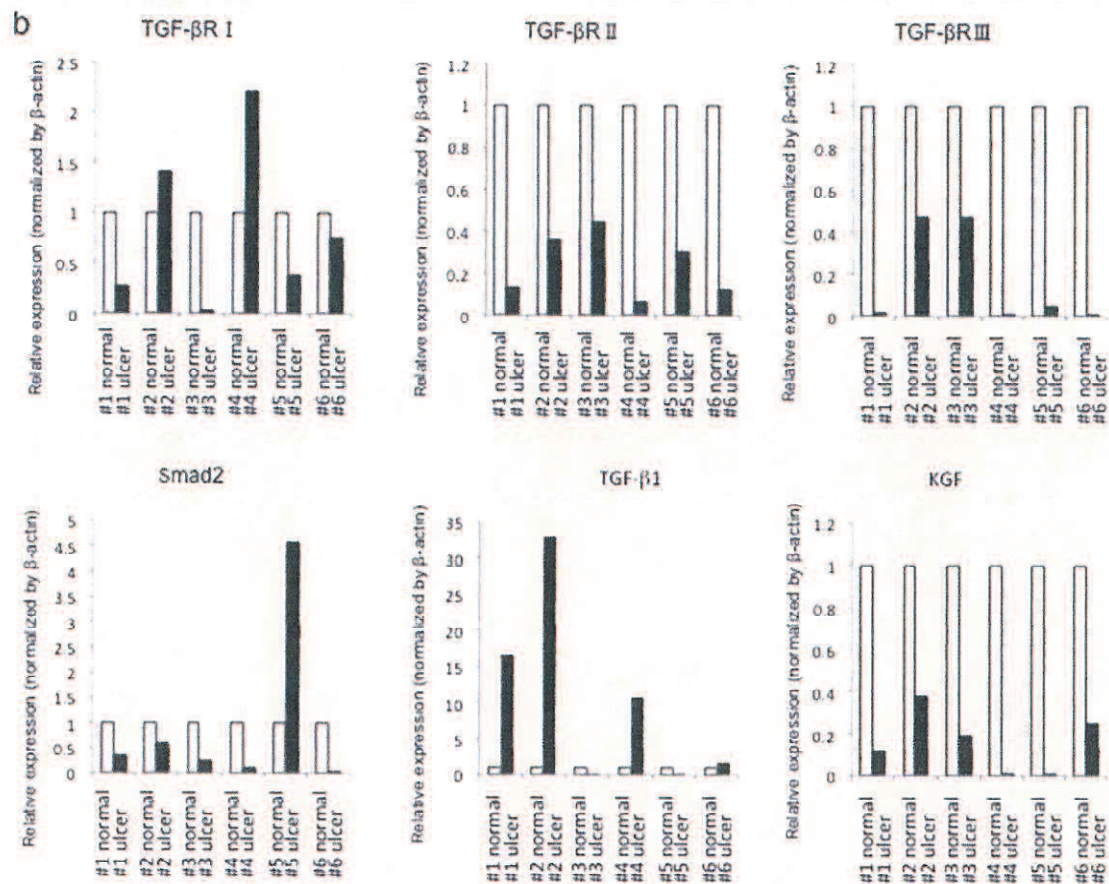


図 6. ヒト虚血性皮膚潰瘍における表皮肥厚に関する因子の mRNA 発現解析
 (a) #症例 3 の足趾の写真である。第 1 足趾の切断後、潰瘍周囲の皮膚（赤色矢頭）とコントロールとしての断端部（白色矢頭）を採取した。(b) TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII, SMAD2, TGF- β 1, KGF をコードする mRNA の発現レベルを qPCR にて測定し、 β -actin の発現量に対する発現量比に補正後、コントロール部に対する潰瘍周囲部の発現量比をグラフに表す。

TGF-β1 リコンビナントタンパク添加によるヒト線維芽細胞の反応

TGF-β1 リコンビナントタンパクで処理したヒト線維芽細胞では、KGF, TGF-βRI, TGF-βRII, TGF-βRIII, SMAD2 の発現レベルが低下していた (図 6c)。

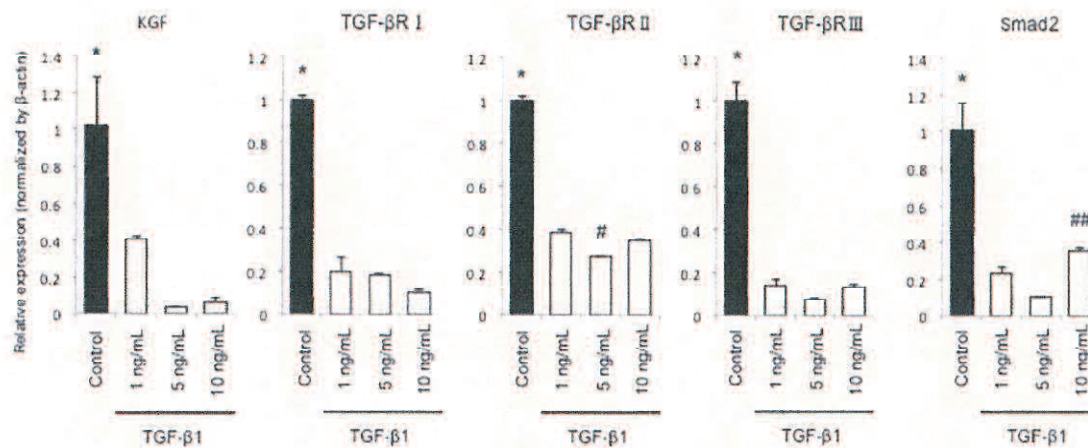


図 7. TGF-β1 リコンビナントタンパク添加によるヒト線維芽細胞の反応

*は $p < 0.01$ vs. 他の 3 群、#は $p < 0.01$ vs. 1ng/mL, 10 ng/mL、##は $p < 0.05$ vs. 5ng/mL を表す。

6. 考察

我々は、ヒトの難治性皮膚潰瘍に近いマウスモデルを新規に開発した。磁石埋め込みモデルは、潰瘍縁の真皮層で虚血障害を反映した凝固壊死をきたしていたが、これは、7日間持続的磁石が存在することで、背部皮膚の毛細血流が途絶し、磁石周囲に虚血性変化をきたしたものと思われる。微小循環が障害されているという点では糖尿病モデルにも似ている[20]。

創傷治癒は、大きく炎症期、増殖期、再構築期に分類されている。炎症期の特徴として磁石埋め込みモデルは、単純切り取りモデルと比較して持続的かつ多量の浸出液を産生し、未熟血管の割合が多く炎症細胞浸潤が目立っていた。多数の未熟血管の存在は血管透過性の亢進を示唆するが、これが多量の浸出液産生と炎症細胞浸潤につながったと考えられる[21]。適度な量の浸出液は潰瘍治癒に寄与するが[22, 23]、過剰な量の浸出液は潰瘍縁の皮膚を浸軟させ、潰瘍を難治化させる [19]ことが知られており、磁石埋め込みモデルはこの点から難治性皮膚潰瘍の要素を再現していると言える。

増殖期において、皮膚再構築のための細胞運搬のために血管新生は必須であり、VEGF と PDGF-BB は血管新生を促進する重要な増殖因子である。特に PDGF-BB は新生血管の成熟化にも重要な役割を果たしている[20]。磁石埋め込みモデルでは単純切り取りモデルと比較していずれも発現が低下しており、血管新生が抑制されていた。このことから磁石埋め込みモデルは、創傷治癒を妨げる分子学的メカニズムを再現している可能性がある。

再構築期には再上皮化が起こり潰瘍面を表皮が被覆していくが、TGF- β シグナルが抑制されると表皮過形成をきたし、ヒト静脈性潰瘍を難治化させることが知られている [6-8]。さらにヒト静脈性潰瘍における線維芽細胞は TGF- β 1 に対する増殖反応が抑制されているという報告もある[24]。我々の検討では、静脈性ではなく虚血性潰瘍においても、TGF- β RII と TGF- β RIII は 6 例全てのヒトサンプルで発現が抑制されており、TGF- β RI と SMAD2 は 6 例中 4 例で発現低下していた。TGF- β シグナルの障害は静脈性潰瘍のみならず虚血性潰瘍にも認められる可能性が示唆された。そして、磁石埋め込みモデルにおいて、表皮の過形成と TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII, SMAD2 の発現抑制を認めたことは、臨床における静脈性及び虚血性潰瘍の難治化メカニズムの一部を再現できた可能性がある。一方で TGF- β 1 レベルは慢性静脈性潰瘍で低下していると報告さ

れているが[25, 26]、我々のヒト虚血性潰瘍の検討では、6例中4例で著名な増加を認めていた。磁石埋め込みモデルにおいても mRNA、タンパクいずれも TGF- β 1 の発現レベルは高かった。TGF- β 1 リコンビナントタンパクを添加することで、正常ヒト線維芽細胞での TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII, SMAD2 の発現を低下させたことから、虚血性潰瘍や磁石埋め込みモデルでも、持続的高レベルな TGF- β 1 の発現が TGF- β シグナルの抑制をもたらしていた可能性がある。

KGF は線維芽細胞に発現し、表皮ケラチノサイトには発現していない増殖因子である[27]。ケラチノサイトの移動や増殖を促進して再上皮化を促す働きがある[28]。磁石埋め込みモデルや我々が検討したヒト虚血性潰瘍では KGF の発現は低下していた。さらに TGF- β 1 リコンビナントタンパクの添加により正常ヒト線維芽細胞での KGF 発現も抑制されていた。このことから、KGF と TGF- β 1 の機能的な関係は不明であるが、TGF- β 1 の高発現が、TGF- β シグナルのみならず KGF の発現も抑制し、再上皮化を妨げている可能性が示唆された。

以上より我々の考案した磁石埋め込みモデルは、ヒト難治性皮膚潰瘍の数々の特徴を再現しているが、いずれ自然に治癒するという点では限界がある。従って、本モデルは極めて治癒しにくいという臨床病態を完全に反映しているとは言えず、この点に関しては今後改良を進めていきたいと考えている。

最後に、線維芽細胞と末梢血単核球からなる細胞混合シート[19]の効果を、磁石埋め込みモデルで検証したが、炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6、MIP-1 の発現レベルは細胞混合シートの貼付により低下した。細胞混合シートが創傷治癒を劇的に加速させる原因として、炎症性サイトカインの抑制効果が寄与した可能性がある。さらに、細胞混合シートは表皮の肥厚化を抑制する働きも有していたが、貼付後 5, 7 日目で高い潰瘍治癒率を有していたのは、このことが関与していた可能性もある。

7. 結語

我々の開発した磁石埋め込みモデルは、難治性潰瘍を特徴付ける、多量の浸出液や炎症細胞浸潤、潰瘍周囲の表皮肥厚といった性質を備えており、臨床病態により近い動物モデルであると言える。また、細胞混合シートは炎症期の遷延や上皮化抑制のメカニズムを断ち切る新たな潰瘍治療デバイスとなる可能性がある。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院 器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に深謝申し上げます。

また、実験のご指導を頂きました、細山徹先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、西本新先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、上野耕司先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

9. 参考文献

- [1] Gurtner, G. C. & Chapman, M. A. Regenerative Medicine: Charting a New Course in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **5**, 314–328 (2016).
- [2] Nunan, R., Harding, K. G. & Martin, P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech* **7**, 1205–1213 (2014).
- [3] Zielins, E. R. *et al.* Wound healing: an update. *Regen Med* **9**, 817–830 (2014).
- [4] Sasaki, M. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *J Immunol* **180**, 2581–2587 (2008).
- [5] Chen, H. *et al.* Macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma deficiency delays skin wound healing through impairing apoptotic cell clearance in mice. *Cell Death Dis* **6**, e1597, doi:10.1038/cddis.2014.544 (2015).
- [6] Glick, A. B. *et al.* Loss of expression of transforming growth factor beta in skin and skin tumors is associated with hyperproliferation and a high risk for malignant conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 6076–6080 (1993).
- [7] Pastar, I. *et al.* Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med* **16**, 92–101 (2010).
- [8] Ramirez, H., Patel, S. B. & Pastar, I. e Role of TGFbeta Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**, 482–491 (2014).
- [9] Wong, V. W., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Longaker, M. T. & Gurtner, G. C. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 969618, doi:10.1155/2011/969618 (2011).
- [10] Peirce, S. M., Skalak, T. C. & Rodeheaver, G. T.

- Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen* **8**, 68–76 (2000).
- [11] Stadler, I., Zhang, R. Y., Oskoui, P., Whittaker, M. S. & Lanzafame, R. J. Development of a simple, noninvasive, clinically relevant model of pressure ulcers in the mouse. *J Invest Surg* **17**, 221–227 (2004).
- [12] Chen, C. *et al.* Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wounds as a model for human chronic wounds. *Wound Repair Regen* **7**, 486–494 (1999).
- [13] Reid, R. R., Said, H. K., Mogford, J. E. & Mustoe, T. A. e future of wound healing: pursuing surgical models in transgenic and knockout mice. *J Am Coll Surg* **199**, 578–585 (2004).
- [14] Michaels, J. T. *et al.* db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model. *Wound Repair Regen* **15**, 665–670 (2007).
- [15] Dai, T. *et al.* Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence* **2**, 296–315 (2011).
- [16] Galiano, R. D., Michaels, J. 5th, Dobryansky, M., Levine, J. P. & Gurtner, G. C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* **12**, 485–492 (2004).
- [17] Gil, E. S., Panilaitis, B., Bellas, E. & Kaplan, D. L. Functionalized silk biomaterials for wound healing. *Adv Healthc Mate* **2**, 206–217 (2013).
- [18] Ueno, K. *et al.* Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and broblasts. *Sci Rep* **6**, 28538, doi:10.1038/srep28538 (2016).
- [19] Norris, R. Exudate management: e use of modern exudate management products under compression bandaging. *Br J Nurs* **21**, 14–16 (2012).
- [20] Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
- [21] Nathan, C. Points of control in in ammation. *Nature* **420**, 846–852 (2002).

- [22] Benbow, M. Exploring the concept of moist wound healing and its application in practice. *Br J Nurs* 17, S4, S6, S8 passim, 10.12968/bjon.2008.17.Sup6.30705 (2008).
- [23] Bishop, S. M., Walker, M., Rogers, A. A. & Chen, W. Y. Importance of moisture balance at the wound-dressing interface. *J Wound Care* 12, 125–128 (2003).
- [24] Lal, B. K. *et al.* Altered proliferative responses of dermal fibroblasts to TGF- β 1 may contribute to chronic venous stasis ulcer. *J Vasc Surg* 37, 1285–1293 (2003).
- [25] Cowin, A. J. *et al.* Effect of healing on the expression of transforming growth factor β (s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* 117, 1282–1289 (2001).
- [26] Schmid, P. *et al.* TGF- β s and TGF- β type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *J Pathol* 171, 191–197 (1993).
- [27] Finch, P. W., Rubin, J. S., Miki, T., Ron, D. & Aaronson, S. A. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 245, 752–755 (1989).
- [28] Werner, S. *et al.* The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 266, 819–822 (1994).