

肥厚性癭痕モデルマウスを用いた コラーゲンペプチドによる治療効果

特定チーム（課題番号：187204）

研究期間：平成30年7月31日～平成31年3月31日

研究代表者：木村公彦

1. 背景

コラーゲンは、皮膚、腱、軟骨、骨、および結合組織の主要な構成タンパク質である。コラーゲンを酸で処理して得られたゼラチンの酵素分解産物は、コラーゲンペプチドと呼ばれ、健康食品等として市販されている。その中のジペプチドである prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) は、経口摂取された後、血液中に分解されず検出されるジペプチドのなかで最も出現頻度が高く (Iwai, Hasegawa et al. 2005)、その生理活性についてさまざまな報告がある (Nakatani, Mano et al. 2009, Shigemura, Iwai et al. 2009)。さらに、最近の我々の研究 (Jimi, Sato et al. 2017) において、マウス正常組織内の濃度は極めて低いものの、損傷後の組織内において、Pro-Hyp 量は肉芽反応に一致し有意に増加することを明らかにした。この反応性増加は、創部でのコラーゲン分解反応の結果であり、創部組織のリモデリングと何らかの関係が考えられ、Pro-Hyp が創部の治癒に影響する可能性がある。

がんなどの腹腔内臓器の病変部を摘出するため、また帝王切開を行うためには開腹手術が必要である。帝王切開による切開創が治癒した後の肥厚性癭痕は、見た目の醜悪さから患者の QOL を低下させる。腹部には腹圧や呼吸等による機械的ストレスが絶えずかかっており、その中で機械的張力は、肥厚性癭痕の増悪因子として知られている。

一般的な創傷治癒過程は、炎症、肉芽組織形成、創傷収縮、および上皮再生であり (Gonzalez, Costa et al. 2016) 連続的かつ重複して進行する。これらの過程のうち、肉芽の形成は、欠損部位の補填および細胞活性を維持するのに必要な血液供給の軸として作用するため重要である (Christov, Chretien et al. 2007)。肉芽組織の基本構造は、線維芽細胞およびコラーゲンを含む細胞外マトリックス (ECM) 成分からなり、創傷後、肉芽

組織の中で増殖する線維芽細胞は、コラーゲンを含む ECM の形成のみならず創部の収縮にも関与している (Hinz, Celetta et al. 2001)。線維芽細胞は、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) により、 α -平滑筋アクチン (α SMA) 陽性筋線維芽細胞に分化することが知られており (Desmouliere, Geinoz et al. 1993)、肉芽組織の収縮に中心的な役割を果たし、強力なコラーゲン合成能も維持している (Hinz, Phan et al. 2012)。最終段階において、創傷部位の肉芽は退縮し、緻密なコラーゲンや結合組織に置き換わる事で癭痕化し修復する。しかし、ECM の過剰な蓄積による創部の異常な癭痕化は治癒を遅延させ肥厚性癭痕の一因となる。最近の報告 (Lu, Lin et al. 2016) で、機械的張力により TGF- β 非存在下においても、TGF- β /Smad シグナル伝達経路が活性化される事が報告されているが、腹壁に形成される肉芽組織への影響は未だ不明である。

肥厚性癭痕のモデルマウスを作製する場合、マウスの皮膚は非常に柔軟であり、通常の皮膚切開や切除ではヒトと同様の病変を作製することは困難である。そのため、特別な装具を用い、外部から張力を負荷したモデルマウスが作製されている。しかし、生理的環境下での肥厚性癭痕の形成メカニズムをモニタリング出来るモデルマウスは存在しない。

そこで本研究では、生理的環境下で肥厚性癭痕形成の要因となる機械的張力がかかる腹壁に創傷を作製することで肥厚性癭痕モデルマウスを作製し、線維芽細胞による結合組織の恒常性維持メカニズムの解明、および外来性に投与された Pro-Hyp による治療促進効果を明らかにすることを目的とし検討を行った。

2. 方法

In vivo での肥厚性癭痕モデルマウスの作製には C57

BL/6 雌マウスを用いた。麻酔下で腹部表皮を1.5cm 切開後、腹壁を直径5mmの円形に切除した後、表皮を上下2か所のみ縫合しフィルムドレッシング剤で被包した。腹壁切除病変に対するPro-Hypの効果は、Pro-Hyp 500nmol/200 μ L (Pro-Hyp群:n=4)を、対照として生理食塩液200 μ L (コントロール群:n=4)を実験期間7、14、21日間、1日1回腹腔内投与し、屠殺後に腹壁から採取した切片を顕微鏡下で検討した。肉芽組織を評価するために、hematoxylin and eosin (HE) および Masson's trichrome (MT) 染色を行った。また、NIMP-R14(好中球)、 α SMA、TGF- β 1、およびリン酸化 Smad 3 (p-Smad 3) による免疫組織染色を行い評価した。in vitro でのPro-Hypによる正常ヒト包皮由来線維芽細胞株 Hs27の α SMA 発現およびコラーゲンゲル収縮に対する効果を、 α SMA 免疫蛍光染色およびコラーゲンゲル収縮アッセイにより検討した(各群:n=3)。さらに、骨格筋を染色する myoglobin の免疫組織染色により、筋肉再生を評価した。

3. 結果

3-1. Pro-Hyp 投与による腹壁治癒過程への効果

腹壁切除部の治癒過程およびPro-Hyp腹腔内連続投与が、腹壁円形切除部の治癒に有効かどうか腹腔側からの創部を観察した。創部は、時間経過に伴い中央に向かって小さくそして平坦になった。創作製後14日目 (Day14) では創部の境界が肥厚し、Day21では創中央部の厚さが増した。Pro-Hyp 投与群のDay14と21において、創部はより小さく平滑化した (Figure 1 A)。半定量的解析において、Pro-Hyp 投与は、コントロール群に対して有効性を示した (Figure 1 B)。腹壁を切除した直後の創部面積は、全ての動物で差が無かった。また、手術後の体重も腹腔内投与による影響は見られなかった。

3-2. 腹壁切除部に形成された肉芽の組成

次に、Pro-Hyp 投与による組織学的創部組織の変化について検討を行った。切開された表皮(黒三角)は、Day 7において両群共に完全に閉鎖され、腹壁切除部には肉芽が形成された。肉芽内には、紡錘形の細胞と毛細血管が多く、創中央部において、紡錘形の細胞は、ECMと共に平行に整列していた (Figure 2 A)。筋肉断端の肉芽には、核が内在化した再生筋肉細胞(黒矢印)が混在し境界は不明瞭だったが、筋膜外周に複数の核を持つ正常筋肉との境界は明らかだった(点線)。そこで、肉芽と再生筋肉を含む総創傷面積を計測したところ、両群ともにDay 7からDay14で約3.5倍に有意に増加しDay21で有意に減少したが、両群間に差は見られなかった (Figure 2 B)。

3-3. Pro-Hyp 投与による創部の組織学的変化

得られた組織サンプルについて、組織学的評価を実施した。皮下筋肉より腹腔側に形成された肉芽組織の連続切片を、組織学的に評価した (Figure 3)。実験期間中NIMP-R14陽性好中球は、両群共に、ほとんど検出されず炎症は少なかった。 α SMA 陽性筋線維芽細胞は、創部を橋渡しするように水平に並んで発現していたが、Day14以降には、太く成熟したコラーゲン線維が蓄積した部位からは消失していった。しかし、コントロール群では、Day21にも創部中央に残存していた。TGF- β 1の発現は、実験期間中において、両群共にかなり少なかった。しかしながら、p-Smad 3の発現は、両群共にDay 14から強くなり、Pro-Hyp 群ではDay21に減少した。

3-4. Pro-Hyp 投与によるコラーゲン蓄積の抑制

Day14と21の創傷中央における、コラーゲン線維の変化を、MT 染色画像を用いて検討した。コントロール群のDay14において、コラーゲン線維は、創傷と並行に

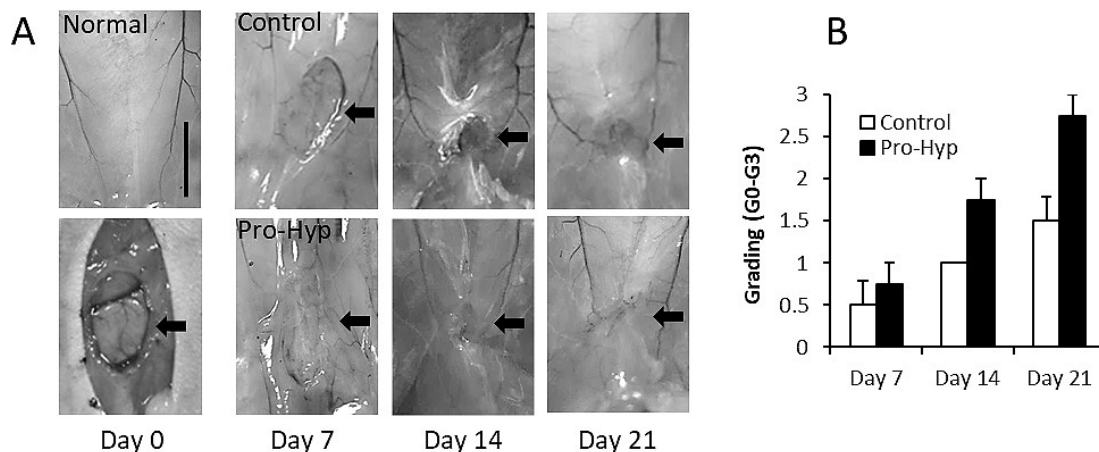


Figure 1. Pro-Hyp 投与による創部の経時的変化 (A) 光学写真による創部の変化 Bar = 10mm (B) Pro-Hyp 投与による創部の半定量的評価

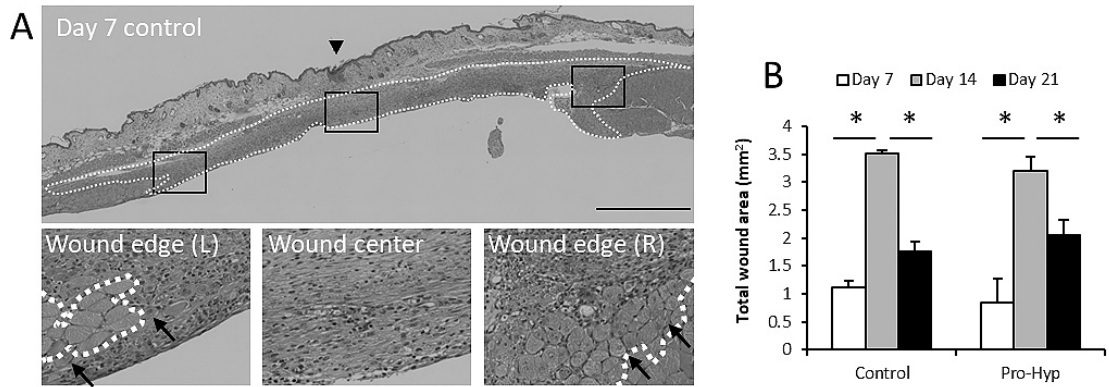


Figure 2. モデルマウスの組織像 (A) コントロール群の Day 7 における HE 染色像 Bar=500 μ m (B) Pro-Hyp 投与による総創傷面積の変化

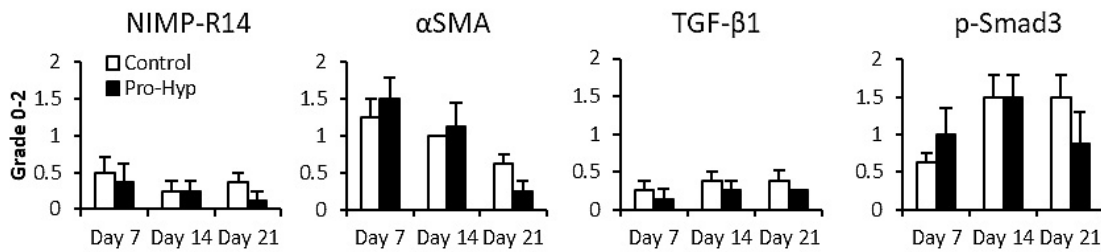


Figure 3. 創部肉芽組織の免疫染色による半定量的解析

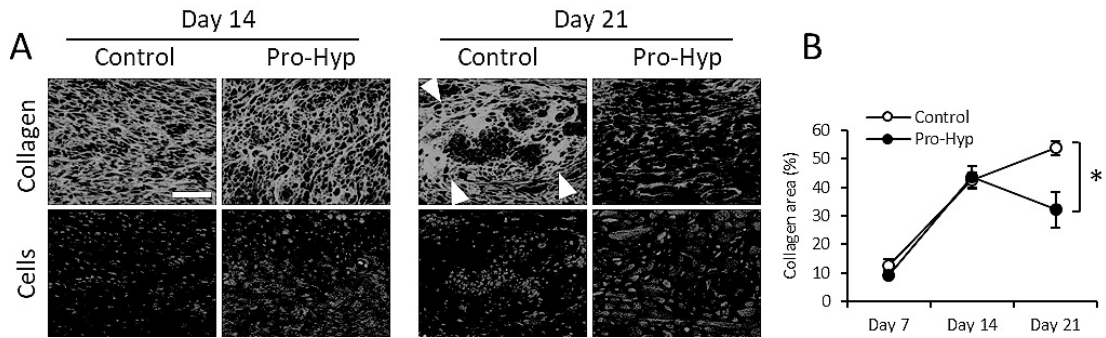


Figure 4. Pro-Hyp 投与による創部のコラーゲン線維の変化 (A) Day14および Day21における創中央部の MT 染色像 Bar=50 μ m (B) 単位面積あたりのコラーゲン面積の変化

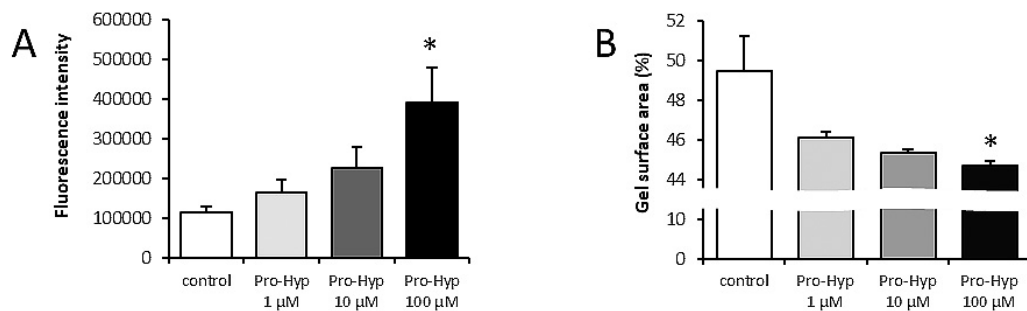


Figure 5. Pro-Hyp 処理による Hs27 の α SMA 発現およびコラーゲンゲル収縮率の変化 (A) Pro-Hyp (1, 10, 100 μ M) 添加24時間後の α SMA 発現強度の変化 (B) Pro-Hyp (1, 10, 100 μ M) 48時間処理後、ゲルを遊離した90分後の初期コラーゲンゲルに対する収縮率

形成されていたが、Pro-Hyp 群では、創傷に対して垂直方向に密に変化していた。コントロール群の Day21 において、ヒトの肥厚性癬痕組織と類似した、形態が変化した筋線維芽細胞の周囲にコラーゲンが蓄積した硝子様構造が多く観察された（白三角）。一方、Pro-Hyp 群において、硝子様構造は少なく、再生筋肉細胞が多く観察された（Figure 4 A）。次に、単位面積あたりのコラーゲンおよび細胞の面積を、形態計測法を用いて計測した。コラーゲン面積は、コントロール群において Day 21 まで有意に増加したが、Pro-Hyp 群は、Day21 に有意に減少した（Figure 4 B）。

3-5. Pro-Hyp 添加による Hs27 細胞株の α SMA 発現とコラーゲンゲル収縮に及ぼす影響

In vitro において、Pro-Hyp が線維芽細胞に対して α SMA 発現を増加するか、また、コラーゲンゲルの収縮に影響を及ぼすか正常ヒト包皮由来線維芽細胞 Hs27 細胞株を用いて検討を行った。 α SMA 発現変化は、Hs 27 に（1、10、100 μ M）の Pro-Hyp を添加し、蛍光免疫染色を用いて検討した。24 時間後、Hs27 の α SMA 発現は、Pro-Hyp の濃度に依存して増加した。Hs27 細胞株は、Pro-Hyp 未処置においても α SMA を発現し、筋線維芽細胞様であった。Pro-Hyp 100 μ M 添加群では、コントロール群に対して約 4 倍 α SMA 発現強度を増加した（Figure 5 A）。次に、Hs27 を懸濁したコラーゲンゲルに同濃度の Pro-Hyp を添加し 48 時間作用させた。ゲルを遊離して 90 分後に、初期のゲルサイズに対する比を計測したところ、コラーゲンゲルは、Pro-Hyp の濃度に依存して収縮し、Pro-Hyp100 μ M 添加群では、コントロール群に対して約 5% ではあるが有意に収縮した（Figure 5 B）。

3-6. Pro-Hyp 投与による腹壁筋肉の再生に対する効果

創部の腹壁筋肉の再生における、Pro-Hyp 投与の効果を検討した。腹壁筋肉は、骨格筋を染色する myoglobin 抗体を用いて免疫染色により同定した。Pro-Hyp による

再生筋肉面積の変化を、形態計測法を用いて測定した。時間経過に伴い、再生筋肉を含む総創傷面積は減少するため、総創傷面積に占める再生筋肉面積の割合を算出した。再生筋肉面積は、コントロール群において Day14 まで変化がなく、Day21 において増加した。一方、Pro-Hyp 群は、Day14 と 21 共に有意に増加した。さらに、Pro-Hyp 群における再生筋肉面積は、コントロール群に対しても有意な増加を示した（Figure 6）。

4. 考察

Pro-Hyp による生物学的作用として、線維芽細胞の増殖（Shigemura, Iwai et al. 2009）、ヒアルロン酸合成促進（Ohara, Ichikawa et al. 2010）、軟骨細胞（Dar, Schott et al. 2017）、骨芽細胞（Kimira, Odaira et al. 2017）、脂肪細胞（Minaguchi, Ogata et al. 2017）の分化促進などが報告されている。しかし、Pro-Hyp による分子生物学的な創傷治癒促進効果の詳細は、未だ明らかにされていない。創傷治癒過程での組織変化は、炎症期、増殖期、消退期、癬痕期があり、それぞれは相互に影響する（Gonzalez, Costa et al. 2016）。また、組織修復は短期間で進行するため、創部では極めて複雑な反応が起こっていると考えられる。それぞれの変化の停滞や増幅は治癒遅延の病理学的原因となる。創傷治癒に対する Pro-Hyp の作用を検討する場合、以上のような組織反応を考慮しなければならない。

生理的環境下において、生体が通常有する腹圧がかかる環境下で腹壁の治癒を観察できるモデルは、これまでに報告されていない。本マウスは自由行動が可能で、動物の動きや呼吸などにより、腹壁にかかる張力負荷に変動がある状態となり、固定化された創組織とは異なり、組織障害と治癒を繰り返すことで、結果的に肉芽が成長したと考えられた。本モデルは、肥厚性癬痕やケロイドの病因を含むことから、これら疾患の新規病態モデルになる可能性がある。この病態モデルを用い、Pro-Hyp の投与による検討を行った。創作製後、創部へ確実に Pro-Hyp を到達させるため、腹腔内投与を採用した。一部は腹腔内臓器に浸透し、血液を介し患部へと到達するが、高濃度の Pro-Hyp が直接患部へと浸透したと考えられる。以前の報告（Kusubata, Koyama et al. 2015）では、食事性に摂取されたコラーゲンペプチドが炎症部位に特異的に蓄積することを示している。損傷部位での透過性亢進がその作用機序であると考えられるが、今回の投与法はこの経路を含み、さらに直接的であることから、Pro-Hyp による腹壁の創傷治癒への影響を見る上で適した投与方法と言える。

本研究での腹壁切除後の組織内変化を見ると、創作製 7 日目以降において、肉芽組織と再生筋肉が混在するため、複雑な組織反応が起こっていると考えられた。そこ

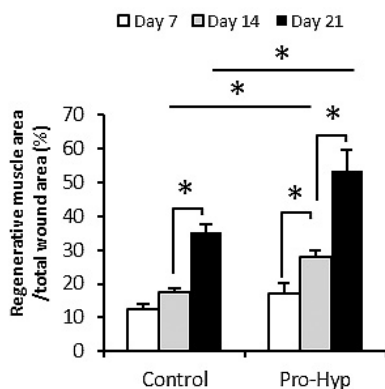


Figure 6. Pro-Hyp 投与による総創傷面積に対する再生筋肉面積率の変化

で、組織学的に異なる組織の治癒過程を包括的に評価するために注意が必要であった。肉芽と再生筋肉を含む総創傷面積は、14日目にピークになり21日目に減少したが、両群間に差は見られなかった。この組織学的な結果は、光学写真で確認された Pro-Hyp による治癒の促進と一見矛盾している。しかし、Pro-Hyp 投与は、治癒組織を構成する成分に影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。

創の収縮は治癒の最も重要で基本的な組織反応で、この反応に中心的に寄与する細胞は α SMA 陽性筋線維芽細胞である (Desmouliere, Geinoz et al. 1993)。筋線維芽細胞は、線維芽細胞から分化し、強力な収縮力を持つ事が知られている (Hinz, Celetta et al. 2001)。また、線維芽細胞は、外部からの機械的張力により筋線維芽細胞へ分化し、その張力に抵抗する方向に伸展し、収縮線維であるストレスファイバーを細胞内に形成する (Hinz, Mastrangelo et al. 2001)。

実験中の肉芽組織内において、筋線維芽細胞は、機械的張力がかかる創部を橋渡しする様に出現していた。またそれは、欠損部を埋める様に筋肉の切断端から中央部に向けて増加した。この反応の細胞内メカニズムとして、メカノレセプターの関与が考えられる (Ingber 2008)。ECM に接着する細胞は物理的刺激を受けると、細胞膜上に存在する integrin などが変化し、それに反応し、細胞骨格やイオンチャンネルなどが変化を起こす (Wong, Akaishi et al. 2011)。メカノレセプターのシグナル伝達系として、TGF- β /Smad、integrin、MAPK/G protein、TNF α /NF κ B、Wnt/ β カテニン、カルシウムイオンチャンネル伝達経路などが考えられている (Huang, Akaishi et al. 2012)。特に、TGF- β は、筋線維芽細胞の形質転換のための重要なサイトカインであり (Desmouliere, Geinoz et al. 1993)、コラーゲン産生 (Hinz, Phan et al. 2012) の強力な刺激因子でもある。今回観察された両群の肉芽内 TGF- β 1 発現に差はなく、また、以前報告した慢性創傷での TGF- β 1 発現 (Jimi, Kimura et al. 2017) に比べかなり弱い。しかし、その伝達経路の下流に位置する p-Smad 3 発現は亢進していた。これは、メカニカルストレスにより TGF- β /Smad 経路の活性化が起こったことを示唆している。つまり、腹壁側の肉芽ではメカニカルストレスを感受しながら、反応性に肉芽形成を促進させる必要がある。密な炎症を伴う慢性創傷を用いた以前の研究では、TGF- β 1 および α SMA の両方が肉芽組織 (Jimi, Kimura et al. 2017) において大いに発現されている。このモデルで見られるより少ない炎症は、TGF- β 1 発現の減少に対する影響因子であり得る。

また、in vitro の実験において Pro-Hyp は、TGF- β 無しで Hs27 の α SMA 発現を増加した。この結果は、外来性に投与された Pro-Hyp が肉芽内の筋線維芽細胞の収

縮力を増強できる事を示唆しており、治癒早期の肉芽形成において、張力に抵抗するための肉芽の質を改良した可能性が考えられる。Day21 の Pro-Hyp 群では、筋線維芽細胞は消失していったが、対照的に、コントロール群の創中央部において筋線維芽細胞が残存した。この反応には、機械的ストレスとマトリックスのリモデリングが強く影響している可能性がある。

肉芽は、欠損部補充のみならず、創部を結合する役割を持つ。その結合力に重要な役割を持つのは、線維芽細胞によって産生されるコラーゲンである。一般的に、肉芽形成期に出現するコラーゲン細線維は脆弱であるが、治癒が進行すると強靱なコラーゲン線維へと成熟する (Gonzalez, Costa et al. 2016)。しかしながら、創傷治癒における過剰なコラーゲンの蓄積は異常な瘢痕組織を形成し、肥厚性瘢痕に特徴的な病態を示す。また、様々な組織の修復においても線維化は予後を悪くする (Hinz, Phan et al. 2007)。筋線維芽細胞は、強力なコラーゲン産生能力を持つことも知られており、周囲のコラーゲン細線維に接着すると、収縮しコラーゲンを凝集する。さらに、コラーゲンを分泌し、密度と方向性を安定化させる。この反応を繰り返し、コラーゲンネットワークの短縮をもたらす (Tomasek, Gabbiani et al. 2002)。一方、筋線維芽細胞は、増殖過程では収縮できないとの報告がある (Hinz, Mastrangelo et al. 2001)。

実験7日目において、コラーゲン線維は、紡錘形をした筋線維芽細胞の周囲に形成され、14日目以降の Pro-Hyp 群において、筋線維芽細胞の形態変化と共にコラーゲン線維はランダムに波打った形に、太く変化した。この反応は、筋線維芽細胞が機械的張力に応答し、張力方向にコラーゲンマトリックスを形成する事により組織強度をあげるための反応と考えられる。また、投与された Pro-Hyp により張力に抵抗する事が出来る肉芽を早期に形成した結果、筋線維芽細胞の増殖が停止しコラーゲン線維を収縮したと考えられる。さらに、in vitro の collagen gel contraction assay において、Pro-Hyp はコラーゲンの収縮を促進した。今回用いた実験方法は、遊離コラーゲンを凝集させた後にゲルが収縮する。よって、生体内の張力ストレスがかかる創部を模しているため、Pro-Hyp が筋線維芽細胞による創部のコラーゲン凝集を増強したことを支持する。

Day21において、両群のコラーゲン面積には、大きな違いが見られた。コントロール群において、コラーゲン線維が硝子様に変化し、肥厚性瘢痕と類似した組織像を示した。一方、Pro-Hyp 群では、ほとんど見つからなかった。筋線維芽細胞は、創傷治癒の増殖性肉芽組織相が衰えるにつれてアポトーシスを起こす割合が増加することが知られており (Desmouliere, Redard et al. 1995)、筋線維芽細胞は、 β 1 integrin を介し機械的ストレスの解

除によりアポトーシスにより消失する (Tian, Lessan et al. 2002)。Pro-Hyp 群では外来性に Pro-Hyp が供給された事により、筋線維芽細胞が強固なコラーゲンマトリックスを形成したため張力が解除され、アポトーシスにより筋線維芽細胞が消失したと推察される。一方、コントロール群では機械的ストレスがかかり続け、その刺激によって残存した筋線維芽細胞により過剰なコラーゲンの蓄積が起こったと考えられる。Pro-Hyp によるコラーゲン産生および成熟の調節に関与する因子を同定するためにはさらなる研究が必要である。

今回の実験の Pro-Hyp 群において、コラーゲンの過剰蓄積はほとんど見られず、再生筋肉面積の割合が増加した。筋肉再生における過剰な線維化は、筋肉再生の遅延要因の一つであり、創傷治癒と同様に (筋) 線維芽細胞が産生するコラーゲンが深く関与している (Mann, Perdiguer et al. 2011)。再生筋肉の増加は、Pro-Hyp による癒痕形成の抑制が理由の一つと考えられ、肉眼での治癒促進効果と総創傷面積との矛盾点は、再生筋肉の増加により説明される。

5. まとめ

今回の研究で生理的環境下での肥厚性癒痕の病態を一部示すモデルマウスを作製することが出来たと考えられる。Pro-Hyp は、欠損した腹壁の筋肉間に形成される肉芽組織に作用し、筋線維芽細胞により創部を収縮するだけでなく創部の過剰な癒痕化を抑制する。この効果には、Pro-Hyp による治癒初期から中期の筋線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスの適切な調整が重要であると考えられる。

他の様々な研究により、徐々に Pro-Hyp の作用メカニズムや伝達経路の解明が進んでいるが、未だ明らかにはなっていない。加えて、腹壁の治癒には多様な細胞が関与しており、Pro-Hyp による過剰な癒痕化の抑制と筋肉再生に関与するシグナル伝達メカニズムをさらに明らかにする必要がある。