

論文内容の要旨

Comprehensive analysis of keloid vasculature by tissue clearing and 3D imaging

組織透明化および三次元イメージングによるケロイド血管構造の包括的解析

日本医科大学大学院医学研究科

形成再建再生医学

大学院生 Nguyen Dinh Long

Wound Repair and Regeneration. 第33巻 第2号 2025年3月 掲載

(e70015)

ケロイドは、過剰な創傷治癒反応によって形成される複雑な瘢痕組織であり、元の創傷境界を越えて厚い線維性組織が過剰に増殖することが特徴である。ケロイド形成と血管系との重要な関係性はこれまでも指摘されているが、血管構造の特徴については相反する報告が存在しており、一方では血管ネットワークの発達、他方では血管の相対的な減少が報告されている。このような背景から、より高精度かつ空間的解像度の高い解析手法による検討が求められている。

本研究では、従来の二次元組織学的手法の限界を克服するため、組織透明化法と免疫組織化学を組み合わせた三次元イメージング手法を導入した。まず、線維化皮膚組織への本手法の適合性を検討する目的で、CUBIC (clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis) 法と iDISCO+ (immunolabelling-enabled 3D imaging of solvent-cleared organs) 法という 2 種類の組織透明化プロトコルを比較した。その結果、iDISCO+ 法が 1 mm および 5 mm 厚のケロイド試料においてより高い透明化性能と明瞭な CD31 免疫蛍光シグナルを示したため、本研究では iDISCO+法を採用した。

次に、iDISCO+法で透明化および CD31 による免疫染色を施したケロイド組織をライトシート蛍光顕微鏡 (LSFM) で撮像し、乳頭層から深層網状層にかけての血管ネットワーク全体を可視化した。その結果、特に乳頭層および上部網状層において血管密度が高いことが明らかとなった。

さらに、胸部、背部、顔面、陰部の 4 つの解剖学的部位から採取したケロイドおよび隣接する正常皮膚サンプルを用いて、乳頭層および網状層の三次元画像を共焦点顕微鏡で取得し、各層における血管構造を視覚的に比較した。いずれの部位においても、ケロイドでは乳頭層および網状層の両方で、正常皮膚と比べて高い血管密度が観察された。

加えて、胸部のケロイドとその隣接正常皮膚から得られた試料 (n=4) を用いて、血管構造の定量解析を行った。解析対象として、正常皮膚では乳頭層および網状層の 2 層を、ケロイドでは乳頭層に加え、上部網状層 (Reticular-1: 乳頭層上端から 300~450 μ m)、下部網状層 (Reticular-2: 600~750 μ m) の 3 層を設定した。ImageJ を用いて共焦点画像の前処理を行い、各層に 150×150 μ m の非重複 ROI を 60 箇所設け、血管密度、分岐点数、血管径について定量評価を実施した。

その結果、乳頭層ではケロイド組織の血管密度が正常皮膚の約 1.5 倍であった一方、分岐点数および血管径には有意差が認められなかった。正常皮膚の網状層では、乳頭層に比べて血管密度が低下していたが、ケロイドの上部網状層 (Reticular-1) では血管密度および分岐点数が有意に増加し、血管径には両群間で差がみられなかった。さらに、下部網状層 (Reticular-2) でも、正常皮膚に比べて血管密度が高い傾向を示したが、Reticular-1 よりは低く、血管は主に垂直方向に配列していた。この構造的特徴が、Reticular-2 における分岐点数の減少

に関係する可能性がある。以上より、ケロイド組織では乳頭層および上部網状層を中心に過剰な血管新生が誘導されており、これがケロイドの病態形成に関与している可能性が示唆された。

本研究により、ケロイドにおいて乳頭層および上部網状層に血管密度と構造の複雑性が高く分布していることが明らかとなり、これらの領域が血管新生の局在において特に重要である可能性が示された。また、真皮深層においては血管が主に垂直方向に配列し、深さに応じた秩序ある構造が存在する傾向も認められた。三次元イメージングにより、真皮全体における血管構造の空間的パターンを可視化することが可能となり、ケロイドにおける血管新生の空間的特性や、その制御機構に関する新たな示唆が得られた。

さらに、我々の三次元イメージング手法は、血管構造の解析にとどまらず、炎症や線維化に関与する他の細胞種における空間分布や活性化状態の可視化にも応用可能である。本手法の応用によって、ケロイド病変における細胞動態をより包括的に理解することが可能となり、病態解明の深化に寄与することが期待される。