

学位論文

「Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1)  
signaling enhances angiogenesis in a surgical sponge model.

(血管内皮増殖因子受容体 1 (VEGFR-1) シグナルは  
外科的スポンジモデルにおいて血管新生を促進する)」

DM12021 朴 圭一

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
臨床医科学群 形成外科・美容外科学  
指導教授 武田 啓

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【背景】創傷治癒は炎症、肉芽組織形成、再上皮化からなる組織修復過程である。その中でも肉芽組織形成において血管新生が重要である。血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor VEGF) -A は肉芽組織における血管新生をもたらす創傷治癒を促進するが、その作用は主に VEGF 受容体 2 (VEGFR-2) への結合を介して起こることがわかっている。一方、VEGF-A のもうひとつの受容体である VEGFR-1 シグナルの血管新生における役割については明らかになっていない。私たちのグループでは、胃潰瘍や下肢虚血モデルの血流改善において VEGF-A、VEGFR-1 の発現が亢進し、VEGF-A/VEGFR-1 シグナルが重要な役割を担っていることを示してきた。

【目的】Sato らは胃潰瘍の組織修復において、Amano らは下肢虚血モデルの血流改善において、VEGFR-1 シグナルが骨髄由来細胞の誘導を伴って血管新生に重要な役割を担うことを示した。本研究では、皮膚における VEGFR-1 シグナルの血管新生促進メカニズムを調べることを目的として、スポンジ移植モデルを用いて創傷治癒、特に血管新生における VEGF-A/VEGFR-1 シグナルの役割について検討した。

#### 【方法】

マウス背部皮下にポリウレタン製スポンジを挿入し、処置後 1 週間後、スポンジに増生した肉芽組織内の新生血管を評価した。血管新生や集積細胞は免疫組織学的に評価した。green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスの骨髄移植を利用することで骨髄由来細胞の寄与についても検討した。

- 1) VEGF-A シグナルの血管新生における役割: 抗 VEGF-A 抗体投与群と対照群との血管新生を比較検討した。
- 2) 血管新生における VEGFR-2 シグナルの寄与: VEGFR-2 阻害薬である ZD6474 投与群と対照群で血管新生を比較した。
- 3) 血管新生における VEGFR-1 シグナルの寄与: VEGFR-1 チロシンキナーゼノックアウトマウス (TKKO) と野生型マウス (WT) との血管新生を比較検討した。
- 4) 新生肉芽組織における血管新生促進因子である VEGF-A、bFGF、MMP-2、IL-6 の発現量を PCR で解析した。
- 5) 新生肉芽組織内に集積する細胞の検討: 1-3) の各群で免疫組織化学染色を用いて VEGFR-1 陽性細胞の集積を評価した。
- 6) GFP トランスジェニック (GFP+) マウスの骨髄を移植することで肉芽組織内の骨髄由来細胞の集積を評価した。GFP+WT の骨髄を WT に (GFP WT→WT)、GFP+VEGFR-1 TKKO の骨髄を VEGFR-1 TKKO に (GFP TKKO→TKKO) それぞれ移植し、骨髄由来細胞の集積の差を評価した。またそれとともに免疫組織化学的に VEGFR-1 陽性細胞がどの程度骨髄由来であるかを解析した。
- 7) GFP+WT の骨髄を VEGFR-1 TKKO に移植 (GFP WT→TKKO) し、GFP+VEGFR-1 TKKO

の骨髄を移植した VEGFR-1 TKKO (GFP TKKO→TKKO) と比較して、血管新生や VEGFR-1 陽性骨髄由来細胞の集積が改善するかを検討した。

#### 【結果】

- 1) 抗 VEGF-A 抗体投与によってスポンジ内血管新生が抑制された。
- 2) VEGFR-2 阻害薬によってスポンジ内血管新生が抑制された。
- 3) VEGFR-1 TKKO は野生型に比較してスポンジ内の血管新生が抑制された。
- 4) VEGF-A、bFGF、MMP-2、IL-6 の発現量が VEGFR-1 TKKO において減少していた。
- 5) 新生肉芽組織において、VEGF-A 阻害薬、VEGFR-1 TKKO において VEGFR-1 陽性細胞の集積が有意に抑制された。一方で VEGFR-2 阻害薬投与群ではその傾向がみられなかった。
- 6) GFP WT→WT は GFP TKKO→TKKO に比較して GFP 陽性の骨髄由来細胞、そして骨髄由来の VEGFR-1 陽性細胞の集積が有意に多かった。
- 7) GFP WT→TKKO は GFP TKKO→TKKO と比較して血管新生が改善した上、GFP 陽性の骨髄由来細胞も VEGFR-1 陽性の骨髄由来細胞も有意差をもって新生肉芽組織内に多く集積していることが確認された。

【考察】マウススポンジ移植モデルにおいて VEGF-A シグナルの影響を解析することにより、VEGFR-1 シグナルが血管新生に重要な役割を果たすことが裏付けられた。VEGFR-1 シグナルが消失することによって新生肉芽組織に集積する骨髄由来細胞数が減少し、それとともに VEGF-A、bFGF、MMP-2、IL-6 の発現が抑制された。以上から VEGFR-1 シグナルが骨髄由来の VEGFR-1 陽性細胞を伴って血管新生を促進する重要な役割を担っていることを確認した。VEGFR-1 シグナルで誘導される骨髄由来の細胞の詳細な評価は今後さらなる検討が必要であるが、VEGFR-1 シグナルの特異的刺激は血管新生を促進する新しい治療体系となる可能性を示すことができた。