

学位論文

「制御性 T 細胞の集積による肉芽組織形成と血管新生促進における
mPGES-1 の役割」

DM19022 兵頭 徹也

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】

血管新生(angiogenesis)とは既存の血管から新しく血管が形成される過程のことである。血管新生は発生、炎症、腫瘍増殖だけでなく、創傷や胃潰瘍などの組織修復にも関与する。この血管新生は様々な内因性の因子により制御されているが、プロスタグランジン (PG) E₂を含むプロスタグランジン(PG)はその一つである。PGはシクロオキシゲナーゼ(COX) (COX-1 または COX-2) とそれぞれの合成酵素により合成される。我々は血管新生が COX-2 によって誘導され、選択的 COX-2 阻害剤の投与により抑制されることを報告した。さらに COX-2 誘導血管新生は血管内皮増殖因子 (VEGF) 発現と関連している。膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1 (microsomal PGES-1, mPGES-1) は、炎症状態において PGE₂ の合成を特異的に触媒する酵素である。mPGES-1 欠損マウスでは肉芽形成と血管新生が減弱し、さらにマウスの胃潰瘍治癒時の血管新生に関与していることから、mPGES-1 由来の PGE₂ が生体内での血管新生を媒介することが示唆される。

一方、制御性 T 細胞 (Treg, regulatory T cells) は、免疫寛容と組織の恒常性に関与する抗炎症性作用を示す T 細胞のサブセットとして知られ、CD4 と CD25 [インターロイキン(IL)-2 サイトカイン受容体]の表面マーカーと転写因子 Forkhead box protein 3(Foxp3) を発現するという特徴がある。Treg 欠損マウスでは皮膚創傷の閉鎖が遅れ、COX 阻害薬である aspirin は、皮下移植されたスポンジ組織における血管新生と肉芽形成を抑制し、肉芽組織における Foxp3⁺ Treg 細胞集積を減少させる。

【目的】

以上の研究背景から、創傷誘導血管新生と肉芽組織形成促進には mPGES-1 による Treg 集積が関与するのではないかという仮説をたて、その可能性を検証するために血管新生を定量的に評価するスポンジ移植モデルを用いて、本研究を計画した。

【材料と方法】

雄性 mPGES-1 欠損 (mPGES-1^{-/-}) および C57BL/6 野生型 (WT) マウスの背部皮下組織にポリウレタンスポンジディスクを移植した。移植後 7、14 日にスポンジを摘出し、スポンジ肉芽組織の湿重量の測定を行なった。また肉芽組織における CD31、VEGF、Foxp3、トランスフォーミング増殖因子β (TGF-β) などの血管新生因子の発現を real time PCR にて、さらに肉芽組織周囲の CD31、FOXP3、TGF-β の蛋白レベルの発現を免疫組織化学にて比較検討し、血管新生を推定した。

肉芽形成における Treg の関与については CD25 および 4 型葉酸受容体 (FR4) 中和抗体を投与することで検討した。さらに mPGES-1 によって産生される PGE₂ が肉芽組織の血管新生と Treg の集積に寄与しているかどうかを検討すべく、WT および mPGES-1^{-/-} のスポンジに PGE₂ を局所投与し、vehicle 投与群との比較検討を行った。

【結果】

mPGES-1^{-/-}マウスは WT マウスに比べ血管新生が抑制され、Foxp3 の発現や Foxp3⁺Treg の集積が抑制されていた。Foxp3/TGF- β と Foxp3/VEGF の二重陽性の細胞数は WT マウスに比べ mPGES-1^{-/-}マウスで少なかった。CD25 または FR4 に対する抗体 (Abs) で Treg を中和すると、WT マウスでは Foxp3⁺ Treg の血管新生と集積が抑制されたが、mPGES-1^{-/-}マウスでは抑制されなかった。移植したスポンジに PGE2 を局所投与すると、WT および mPGES-1^{-/-}マウスにおいて、TGF- β および VEGF を発現する Treg の血管新生と集積が促進された。

【結論】

TGF- β および VEGF を発現する Treg は創傷に集積し、mPGES-1 由来の PGE2 を通じて血管新生に寄与する。mPGES-1 の誘導は Treg を集積させることにより皮膚創傷の血管新生を制御する可能性が示唆された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 材料と方法	
2-1. 動物	1
2-2. 皮下スポンジ埋め込み手技	2
2-3. 組織サンプル調製	2
2-4. 薬物	2
2-5. 組織学および免疫組織化学的解析	2
2-6. 蛍光免疫染色解析	3
2-7. 定量的リアルタイム RT-PCR	3
2-8. 酵素結合免疫吸着法(ELISA)	4
2-9. 統計解析	4
3. 結果	
3-1. mPGES-1 ^{-/-} マウスにおける肉芽組織形成の抑制	4
3-2. mPGES-1 ^{-/-} マウスにおける血管新生抑制と Treg 集積抑制	5
3-3. Treg 細胞数低下による血管新生および肉芽形成抑制	5
3-4. PGE2 注入による肉芽組織の血管新生亢進と Treg 集積	6
4. 考察	6
5. 結論	8
6. 謝辞	8
7. 脚注	9
8. 引用文献	9

9. 図	-----	12
9-1. 図 1 : mPGES-1 欠損による肉芽組織形成の減弱	-----	12
9-2. 図 2 : mPGES-1 ^{-/-} マウスの肉芽組織における血管新生と Foxp3 発現の減少	-----	14
9-3. 図 3 : WT および mPGES-1 ^{-/-} マウスの肉芽組織形成および血管新生に対する CD25 中和抗体の効果	-----	16
9-4. 図 4 : WT および mPGES-1 ^{-/-} マウスの肉芽組織形成および血管新生に対する FR4 中和抗体の効果	-----	18
9-5. 図 5 : PGE2 局所投与による WT および mPGES-1 ^{-/-} マウスの 14 日目の創傷肉芽形成および血管新生の促進	-----	20

1. 序論

既存の血管系から新しい血管が形成される過程を血管新生という。これは、胚発生、炎症、癌などの生理的および病理的な条件下で行われる^(1,2)。したがって、創傷や胃潰瘍からの組織修復は、血管新生に依存している^(3,4)。様々な内因性因子が血管新生過程を高度に制御している⁽⁵⁾。PGE₂を含むプロスタグランジン (PG) は血管新生を刺激することが示されており⁽⁶⁾、PG はシクロオキシゲナーゼ (COX) (COX-1 または COX-2) とそれぞれの PG 合成酵素により合成される。我々はマウスの皮下にポリウレタンスポンジディスクを移植し、周囲の肉芽組織に血管新生を誘発させ、生体内での血管新生のメカニズムを解析した^(7,8)。血管新生は COX-2 誘導に伴って起こり、選択的 COX-2 阻害剤の投与により抑制されることが報告されている^(8,9)。さらに COX-2 による血管新生は、主な血管新生因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) 発現の上昇と関連している^(8,10)。膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1 (microsomal PGES-1, mPGES-1) は、炎症状態において PGE₂ の合成を特異的に触媒する酵素であり、mPGES-1 欠損マウスでは炎症性肉芽組織形成と血管新生の減弱が認められる⁽¹¹⁾。さらに mPGES-1 は、マウスの胃潰瘍治癒時の血管新生に関与している⁽³⁾。これらの結果から、mPGES-1 由来の PGE₂ が *in vivo* での血管新生作用を媒介することが示唆される。

制御性 T 細胞 (Treg) は、免疫寛容と組織の恒常性を媒介する T 細胞の最も重要な抗炎症性サブセットとして知られている⁽¹²⁾。Treg は表面分子 CD4 と CD25 (インターロイキン (IL) -2 サイトカイン受容体)、および転写因子 Forkhead box protein 3 (Foxp3) の発現により特徴づけられる⁽¹³⁾。血管新生調節における Treg の役割は、ますます注目されている^(14,15)。Treg の血管新生促進作用は、その強力な治療可能性から、主に腫瘍学においてであるが、様々な疾患状態において模索されている。さらに、Treg 欠損マウスでは、皮膚創傷の閉鎖が遅れることが示されている⁽¹⁶⁾。また COX 阻害剤である aspirin は、移植されたスポンジ組織における血管新生と創傷肉芽形成を抑制し、肉芽組織における Foxp3+ Treg 細胞の集積が減少することが示されている⁽¹⁷⁾。

これらの結果から、我々は mPGES-1/PGE₂ が Treg を誘導することにより、創傷誘発性の血管新生と肉芽組織形成を促進するという仮説をたてた。そこで本研究では、この可能性を検証するために、血管新生を定量的に評価するスポンジ移植モデルを用いた。

2. 材料と方法

2-1. 動物

雄性 C57BL/6 (野生型マウス、WT マウス) (8 週齢) は、CLEA Japan (日本、東京) から入手した。雄性 mPGES1 欠損マウス (mPGES-1^{-/-}マウス) は既報に従い作出した⁽¹⁸⁾。湿度 (50%±5%)、温度 (25°C±1°C) 一定で、12 時間の明暗サイクルの施設で維持し、餌と水を

自由に摂取させた。すべての実験手順は、北里大学医学部動物実験・倫理委員会の承認 (2020-107、2021-83) を受け、日本学術会議「動物実験適正実施ガイドライン」に基づき、北里大学医学部が定める動物実験指針に従って実施した。

2-2. 皮下スポンジ埋め込み手技

ポリエーテルポリウレタンフォームシートから円形のスポンジディスク (厚さ 5mm、直径 15mm²) を作製した。0.3 mg/kg の塩酸メデトミジン (日本全薬工業、福島、日本)、4.0 mg/kg のミダゾラム (アステラス製薬、東京、日本) および 5.0 mg/kg のブトルファンール (明治製菓、東京、日本) を含む混合薬による腹腔内注射麻酔下にて、既報に従いマウス背部皮下組織にスポンジディスクを移植した⁽¹⁹⁾。メデトミジン効果は、術後に 0.75 mg/kg のアチパメゾール (日本全薬工業) の腹腔内注射で拮抗させた。

2-3. 組織サンプル調製

マウスは術後 7 日目または 14 日目にイソフルランで安楽死させた。採取したスポンジ肉芽組織を 2 つに分け、一方を 0.1-M リン酸緩衝液 (PBS ; pH7.4) 中の 10% パラホルムアルデヒドで直ちに固定し組織評価を、他方を TRIzol Reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) に浸して RNA 単離し、PCR (ポリメラーゼ鎖反応) 定量を実施した。

2-4. 薬物

プロスタグランジン E2 (PGE2 ; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) (30nmol / 50 μ l / スポンジ) または vehicle (PBS 中の酢酸メチル) を、スポンジ移植の翌日からイソフルランによる麻酔下で 1 日 1 回皮下移植したスポンジに局所的に注入した。別の実験では、4 型葉酸受容体 (FR4) に特異的な中和抗体 (マウス 1 匹あたり 50 μ g、クローン eBio TH6; eBioscience, San Diego, CA, USA) をスポンジディスク移植の 0、3、6、9、12 日目に腹腔内投与した。対照群には、アイソタイプコントロール IgG (ラット IgG2b, Embedded Image, BioLegend, San Diego, CA, USA) を投与した。さらに別のマウス群に、生理食塩水に溶解した CD25 (IL-2 受容体 α 鎖) 中和抗体 (マウス 1 匹あたり 250 μ g、Bio X Cell Co., West Lebanon, NH, USA)、またはアイソタイプコントロール IgG (マウス IgG1, λ , BioLegend) を、スポンジ移植の 0、7 日目に腹腔内投与した。

2-5. 組織学および免疫組織化学的解析

摘出標本は、既報に従い調製した⁽¹⁹⁾。切片をヘマトキシリン・エオジン (H&E) で染色するか、免疫組織化学のために処理した。後者については、切片を抗 CD31 抗体 (ウサギポリクローナル; Abcam, Cambridge, MA, USA)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β) (Abcam)、及び Foxp3 (eBioscience) で染色した。免疫反応性シグナルは

3,3'-ジアミノベンジジンで検出し、標本はメイヤーのヘマトキシリンまたはメチルグリーンで対比染色を行った。顕微鏡 (Biozero BZ-700 Series; Keyence, 大阪、日本) を用いて H&E または免疫染色された切片の画像を撮影した。CD31 抗体 で染色した個々の微小血管を 5 か所の高倍率視野 (400 倍) で数え、微小血管密度 (MVD) は、観察面積あたりの微小血管数 (血管数/視野) として評価した⁽¹⁹⁾。

2-6. 蛍光免疫染色解析

切片は、蛍光免疫染色のために既報に従い調製した⁽¹⁹⁾。切片をウサギ抗マウス mPGES-1 モノクローナル抗体 (Abcam)、ラット抗マウス CD68 抗体 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)、ウサギ抗マウス TGF- β ポリクローナル 抗体 (Abcam)、ヤギ抗マウス VEGF ポリクローナル 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、又はラット抗マウス Foxp3 (eBioscience) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。その後、切片を二次抗体の混合液で室温にて 1 時間インキュベートした。Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rat IgG, Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG, および Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG は Molecular Probes (Eugene, OR, USA) から入手した。画像の撮影には蛍光顕微鏡を用いた (Biozero BZ-700; Keyence, 大阪、日本)。標識後、高倍率光学系 5 視野 (倍率 400 倍) を無作為に選択し、陽性細胞数を数えた。

2-7. 定量的リアルタイム RT-PCR

mPGES-1、CD31、VEGF、TGF- β 、Foxp3、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) をコードする転写物をリアルタイム RT-PCR 分析により定量化した。定量 PCR の増幅には TB Green Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus ; タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を使用した。リアルタイム RT-PCR に使用した遺伝子特異的プライマーは、GenBank のデータを基に Primer 3 ソフトウェアを用いて設計した。プライマーの配列は以下の通りである。mPGES-1 は 5' -AGGATGCGCTG AAACGTGGAG-3' (センス) および 5' -CCGAGGAA-GAGGAAA GGATAG-3' (アンチセンス) である。CD31 については 5' -ACTTCTGAACTCC AACAGCGA-3' (センス) 及び 5' -CCATGTTCTG GGGTCTTTAT-30 (アンチセンス) ; VEGF については 5' -GAGAGGCCGAAGTCCTTT-3' (センス) 及び 5' -TTGGAACCGGCATCTTTATC-3' (アンチセンス) であった。TGF β については 5' -AACAAATTCCTGGCGTTACCTT-3' (センス) 及び 5' -TGTATTCCGTCTCCTTGTTTC-3' (アンチセンス) ; Foxp3 については 5' -AGTGCCTGTCCTCAATGTC-3' (センス) 及び 5' -AGGCCA GCATAGGTGCAAG-3' (アンチセンス) であった。GAPDH は 5' -ACATCA AGAAGGTGGTGAAGC-3' (センス) および 5' -AAGGTGGAAGA GTGGAGTTG-3' (アンチセンス) であった。データは GAPDH の発現量に対して正規化した。

2-8. 酵素結合免疫吸着法(ELISA)

スポンジ肉芽組織の重量を測定した後、スポンジ肉芽組織の滲出液を、1ml シリンジでサンプリングした。滲出液中の TGF- β 濃度は、ELISA キット (R&D 社製) を用いて測定した。

2-9. 統計解析

全ての結果は、平均値±標準偏差 (SD) で表した。GraphPad Prism ソフトウェアバージョン 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用して、すべての統計解析を行った。データは両側スチューデントの t 検定を用いて独立した 2 群間で比較し、一元配置分散分析に続いてテューキーの事後検定を用いて複数群間で比較した。p 値<0.05 を統計的に有意とした。グラフでは、有意性をアスタリスクで示した。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001。

3. 結果

3-1. mPGES-1ノーマウスにおける肉芽組織形成の抑制

肉芽組織形成における mPGES-1 の役割を明らかにするために、スポンジディスクを移植した (図 1A)。移植後 14 日目に WT マウスではスポンジの周囲に厚い肉芽組織の形成が観察されたが、mPGES-1ノーマウスでは薄い肉芽組織が観察された (図 1B)。WT マウスでは、スポンジ移植後、スポンジ重量は徐々に増加した。また 7 日目および 14 日目の WT マウスのスポンジ重量は、mPGES-1ノーマウスのそれよりも有意に重かった (図 1C)。肉芽組織の形成は、H&E 染色切片で評価した (図 1D)。スポンジ組織の組織学的解析により、肉芽組織面積は WT マウスよりも mPGES-1ノーマウスで低いことが実証された (図 1D)。これらの結果は、mPGES-1 が肉芽組織形成に関与していることを示唆する。

次に、スポンジ肉芽組織における mPGES-1 の発現を測定した (図 1E)。WT マウスの mPGES-1 mRNA レベルは、スポンジ移植後に増加した。mPGES-1ノーマウスでは、予想通り mPGES-1 の発現が消失していた。WT マウスの肉芽組織における mPGES-1 の発現を免疫組織染色により評価した (図 1F)。免疫組織学的解析の結果、肉芽組織に複数の mPGES-1+細胞が存在することが確認された。さらに WT マウスの肉芽組織では、炎症様細胞が集積しており、mPGES-1 が発現していた。蛍光免疫二重染色をすると、CD68+細胞にも mPGES-1 が発現しており、マクロファージが mPGES-1 を発現していることが示された (図 1G)。mPGES-1 は、Foxp3 とは共局在していなかったが、Foxp3+細胞は CD68+細胞に比べて少ないことが確認された (図 1G)。

3-2. mPGES-1^{-/-}マウスにおける血管新生抑制と Treg 集積抑制

創傷肉芽組織の形成には血管新生が必要であることから、CD31 (内皮細胞マーカー) の発現に基づく血管新生を検討した。リアルタイム RT-PCR 解析の結果、14 日目の CD31 mRNA レベルは WT マウスよりも mPGES-1^{-/-}マウスで低いことがわかった (図 2A)。VEGF の mRNA 発現も同様であった (図 2A)。また、血管新生は CD31 免疫染色による血管内腔形成の定量化により評価した。免疫染色解析の結果、CD31+血管数は WT マウスよりも mPGES-1^{-/-}マウスで少なかった (図 2B)。定量的解析により、血管密度 (MVD, microvessel density) は WT マウスよりも mPGES-1^{-/-}マウスで低いことが明らかになった (図 2B)。

Treg が血管新生に関与していることから、Treg マーカーである Foxp3 の mRNA レベルも測定した。WT マウスでは、7 日目と 14 日目に Foxp3 の発現が増加し、mPGES-1^{-/-}マウスよりも高かった (図 2C)。免疫組織化学的解析では、Foxp3+細胞数は WT マウスにおいて、mPGES-1^{-/-}マウスよりも多かった (図 2C) ことから、mPGES-1 は肉芽組織における Treg の集積に関与していることが示唆された。また、TGF- β は強力な血管新生刺激因子であるため⁽²⁰⁾、肉芽組織の TGF- β mRNA レベルを測定したところ、WT マウスに比べ mPGES-1^{-/-}マウスで低いことが分かった (図 2D)。mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における TGF- β の発現は、免疫組織学的に示されるように、WT マウスのそれよりも低いものであった。

mPGES-1^{-/-}マウスに移植されたスポンジディスクの滲出液中の TGF- β 濃度は、WT マウスのそれと比較して低かった (図 2D)。蛍光免疫染色では、TGF- β または VEGF の発現が Foxp3+細胞と共局在することが示された (図 2E)。肉芽組織中の Foxp3+ / TGF- β + および Foxp3+ / VEGF+細胞数は、WT マウスよりも mPGES-1^{-/-}マウスで少なかった (図 2E)。以上の結果から、スポンジ移植後の肉芽組織の形成は、Treg の集積と TGF- β および VEGF の発現亢進と関連していることが分かった。

3-3. Treg 細胞数低下による血管新生および肉芽形成抑制

抗 CD25 または抗 FR4 抗体を用いて WT および mPGES-1^{-/-}マウスの Treg を枯渇させることにより、Treg が肉芽組織形成および血管新生に寄与するかどうかを検討した。WT マウスに CD25 抗体を投与すると、コントロール IgG 群の WT マウスと比較して、14 日目のスポンジ重量が有意に減少した (図 3A)。逆に mPGES-1^{-/-}マウスでは、CD25 抗体とコントロール IgG 投与の処置間でスポンジ重量に統計的な有意差は観察されなかった。CD31 の mRNA (図 3B) 及びタンパク質発現 (図 3C) 並びに MVD によって示されるように、コントロール IgG 群の WT マウスと比較して、CD25 抗体投与群の WT マウスでは血管新生が抑制された。しかしながら、mPGES-1^{-/-}マウスの CD25 抗体投与群は、コントロール群における血管新生の減少にさらなる影響を与えなかった。WT マウスの肉芽組織

における Foxp3 mRNA レベルおよび Treg の集積は、CD25 抗体投与群において減少したが、mPGES-1^{-/-}マウスでは減少しなかった (図 3D)。最後に、TGF- β mRNA レベルは、CD25 抗体投与群の WT マウスでは、コントロール IgG 群の WT マウスより低かった。CD25 抗体投与群の WT マウスにおける TGF- β mRNA レベルの低下は、CD25 抗体またはコントロール IgG を投与した mPGES-1^{-/-}マウスの mRNA レベルと同様であった (図 3E)。VEGF mRNA レベルについても同様であった (図 3E)。この結果は、肉芽組織における Treg の集積は、血管新生と TGF- β および VEGF 発現増強に関連し、Treg 集積は mPGES-1 に依存することを示唆している。

さらに、WT マウスに抗 FR4 抗体を投与すると、IgG 投与群と比較して 14 日目のスポンジ重量が減少した。しかし、mPGES-1^{-/-}マウスの重量には、2 つの処置の間に統計的な有意差はなかった (図 4A)。CD31 mRNA レベルおよび MVD によって血管新生を評価すると、FR4 抗体投与群の WT マウスにおいて、IgG 群の WT マウスと比較して減弱された (図 4B および C)。肉芽組織における Foxp3 mRNA レベル及び FoxP3⁺細胞の数は、FR4 抗体投与群の WT マウスにおいて、IgG 群の WT マウスと比較して低かった (図 4D)。これらは、FR4 抗体投与群の WT マウスにおける TGF- β 及び VEGF mRNA レベルの低下と関連していた (図 4E)。FR4 抗体投与群とコントロール IgG 投与群との間では、mPGES-1^{-/-}マウスのスポンジ重量、Treg の集積、血管新生、及び TGF- β と VEGF の発現に統計的な有意差はなかった。

3-4. PGE₂ 注入による肉芽組織の血管新生亢進と Treg 集積

最後に、活性化した mPGES-1 によって産生される PGE₂ が肉芽組織の血管新生と Treg の集積に寄与しているかどうかを検討した。WT および mPGES-1^{-/-}マウスのスポンジに PGE₂ を局所投与したところ、vehicle 投与と比較して、スポンジ重量、CD31 mRNA 発現および血管密度で測定した血管新生、Treg 集積、肉芽組織および Foxp3⁺ Treg における TGF- β および VEGF 発現レベルの上昇が見られた (図 5)。これらの結果は、PGE₂ が WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織の血管新生と Treg の集積を促進することを示唆した。これらの結果から、mPGES-1 由来の PGE₂ は、肉芽組織の血管新生と Treg の集積を促進することが示唆された。

4. 考察

我々はスポンジ移植モデルを用いて、創傷誘発性血管新生と創傷肉芽組織形成に mPGES-1 が関与していることを示した。創傷肉芽の血管新生には Treg の集積、TGF- β や VEGF の発現亢進が関与していた。CD25 または FR4 に対する中和抗体で処理すると、mPGES-1 依存的に創傷肉芽形成、血管新生、Treg の集積が抑制された。PGE₂ の局所投与は、WT および mPGES-1^{-/-}

マウスの肉芽組織の血管新生と Treg の集積を促進した。創傷肉芽組織の形成過程では、血管新生が必須である。創傷誘発性血管新生には、エイコサノイドが重要な役割を担っている⁽²¹⁾。中でも PGE₂ は皮膚創傷治癒時の血管新生に重要な役割を担っている⁽²¹⁾。さらに我々は、PGE₂ が創傷治癒において血管新生促進活性を有することを明らかにしてきた^(6, 22)。創傷治癒過程における血管新生を評価するために、外科用スポンジモデルが用いられてきた^(4, 9, 10, 19)。スポンジ肉芽組織における血管新生の増加は、本研究において、炎症部位での PGE₂ 発生の産生を媒介する酵素である mPGES-1 の発現増加と関連していた⁽²³⁾。一方、mPGES-1^{-/-}マウスでは、血管新生と肉芽組織の発達が減弱していた。mPGES-1 の発現低下は、スポンジ肉芽組織における PGE₂ 量の低下と密接に関連している可能性がある。本研究結果は、WT マウスにおいて PGE₂ 注入が血管新生を促進することを明らかにし、我々の過去の結果と一致した^(9, 22)。さらに、mPGES-1^{-/-}マウスに PGE₂ を外来投与すると、血管新生が改善された。これらの結果から、mPGES-1 由来の PGE₂ が血管新生と肉芽組織形成に関与していることが示唆された。

本研究では、肉芽組織に集積されたマクロファージが mPGES-1 を発現していることを明らかにした。このことは、マクロファージが mPGES-1 を誘導して PGE₂ を産生していることを示唆している。このことと矛盾しないように、浸潤したマクロファージから放出される PGE₂ は創傷治癒を促進するのに役立つ^(24, 25)。さらに、マクロファージにおける mPGES-1 由来の PGE₂ は、胃潰瘍や肝虚血再灌流障害からの血管新生や組織修復に寄与する^(3, 26)。創傷治癒のために肉芽組織に動員されたマクロファージに加えて、Treg が血管新生に関与していることを示す研究成果が最近報告されてきている⁽¹⁵⁾。VEGFR-1+CXCR4+Foxp3⁺ を発現する Treg は、化学物質による急性大腸炎後の血管新生と粘膜治癒にも寄与している⁽²⁷⁾。さらに、CD25 に対する中和抗体は、スポンジで誘発された肉芽組織の血管新生を抑制するが⁽¹⁷⁾、これは我々の結果と一致する。さらに本研究では、FR4 に対する中和抗体で Treg を枯渇させることでこれを確認し、FR4 抗体による処理が血管新生を抑制することを実証した。これらのことは、Treg が創傷誘発性血管新生に関与していることを示唆している。また我々のデータは、創傷誘発性血管新生における Treg の関与が、mPGES-1/PGE₂ 経路に依存することを示した。Treg の濃度と微小血管密度の関連は、がんモデルで報告されている⁽¹⁵⁾。

本研究の結果は、Treg が mPGES-1 依存的に VEGF 産生を増強することにより、創傷誘発性血管新生を促進することを示唆するものであった。スポンジ移植に伴う肉芽組織形成過程では、COX-2/PGE₂ による血管新生が VEGF 発現の増強と関連していた^(9, 10, 19, 22)。

さらに PGE₂ 注入により、WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における VEGF 発現が亢進し、血管新生が促進されることが明らかになった。VEGF に対する中和抗体はスポンジ肉芽組織の血管新生を抑制した^(17, 19)。これらの結果を総合すると、内因性 mPGES-1 は VEGF を産生することにより、創傷誘発性血管新生に寄与していることが示唆される。Treg の集積は、腫瘍環境における VEGF の発現と相関しており、これと矛盾しない⁽²⁸⁾。Treg は、VEGF レベルを増加させることにより、直接血管新生を促進する⁽²⁹⁾。Foxp3 と VEGF 遺伝子発現および腫瘍内微小血

管密度の関連性が報告されている⁽³⁰⁾。

VEGFは主な血管新生因子であるが、TGF- β のような他のいくつかの血管新生因子も創傷誘発性の血管新生を促進する⁽²⁰⁾。本研究では、創傷肉芽組織に動員されたTregは、mPGES-1/PGE₂依存的に血管新生を誘導するTGF- β を産生した。我々は以前、アスピリンが肉芽組織の血管新生を抑制することを示したが、これはTGF- β の発現とともにTregの集積が減少することと関連している⁽¹⁷⁾。さらに我々は、創傷治癒過程においてTGF- β が血管新生を誘導することを明らかにしている⁽³¹⁾。さらに、子宮内膜組織に集積されたTregはTGF- β を産生する⁽³²⁾。

これらの所見から、TregはVEGFやTGF- β を含む血管新生促進因子を増加することにより、創傷誘発性血管新生を促進する。しかし、Treg細胞がVEGFやTGF- β のシグナル伝達を制御するメカニズムはまだ不明である。

Tregは、C-C motif chemokine ligand (CCL) 28⁽²⁹⁾によって増殖するがん組織やCCL17とCCL22⁽³²⁾などのケモカインにより、子宮内膜症組織に集積する。リンパ球のリンパ系器官からの遊出を阻害するFTY720を投与すると、創傷肉芽組織でのTregが減少することから、創傷皮膚の二次リンパ系器官からTregが移動している可能性がある⁽¹⁶⁾。本研究では、創傷肉芽組織へのmPGES-1依存的なTregの集積を示したが、創傷組織にTregが動員されるメカニズムは未解明であった。

5. 結論

結論として、我々のデータは、mPGES-1由来のPGE₂が、集積したTregにTGF- β とVEGFを産生することにより、創傷誘発性血管新生を促進し、創傷肉芽組織形成を引き起こすことを示している。mPGES-1の誘導は、皮膚創傷における血管新生に対するストラテジーとなりうる可能性がある。

6. 謝辞

本研究をまとめるにあたり、貴重なご指導・ご鞭撻を賜りました、形成外科・美容外科学 武田啓教授に深謝致します。研究の計画・遂行にあたり、丁寧かつ熱心にご指導いただきました、薬理学 天野英樹教授、薬理学 馬嶋正隆前教授に心より謝意を表します。貴重な遺伝子改変動物 (mPGES-1欠損マウス) をご供与いただきました大阪市立大学大学院医学研究科・医学部 ゲノム免疫学 植松智教授ならびに大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 審良静男教授に感謝します。日常の実験に際し様々なご指導やご助言、ご協力をいただきました、薬理学 伊藤義也先生、細野加奈子先生、薬理学技術職員 荻野三智子氏、吉川恭子氏、形成外科・美容外科学技術職員 曾根由美子氏、大塚沙緒里氏の皆様に深く御礼申し上げます。

7. 脚注

利益相反

著者は、本研究に関連する利益相反を宣言しない。

8. 引用文献

1. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003, 9(6): 669-676.
2. Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* .2000, 407(6801): 249-257.
3. Ae T, Ohno T, Hattori Y, Suzuki T, Hosono K, Minamino T, et al : Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the facilitation of angiogenesis and the healing of gastric ulcers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 299(5): G1139-1146.
4. Oba K, Hosono K, Amano H, Okizaki S, Ito Y, Shichiri M, Majima M: Downregulation of the proangiogenic prostaglandin E receptor EP3 and reduced angiogenesis in a mouse model of diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2014, 68(8): 1125-1133.
5. Werner S, Grose R: Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003, 83(3): 835-870.
6. Majima M, Amano H, Hayashi I: Prostanoid receptor signaling relevant to tumor growth and angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 2003, 24(10): 524-529.
7. Majima M, Isono M, Ikeda Y, Hayashi I, Hatanaka K, Harada Y, et al : Significant roles of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in angiogenesis in rat sponge implants. *Jpn J Pharmacol .* 1997, 75(2): 105-114.
8. Amano H, Haysahi I, Yoshida S, Yoshimura H, Majima M : Cyclooxygenase-2 and adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Hum Cell.*2002, 15(1): 13-24.
9. Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, et al : Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med.* 2003, 197(2): 221-232.
10. Majima M, Hayashi I, Muramatsu M, Katada J, Yamashina S, Katori M : Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol .*2000, 130(3): 641-649.
11. Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, et al :

- Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin synthase-1. *J Biol Chem.*2004, 279(32): 33684-33695.
12. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M : Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.*2008, 133(5): 775-787.
 13. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ : How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.*2008, 8(7): 523-532.
 14. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G : Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front Immunol.*2019, 10:43,.
 15. Lužnik Z, Anchouche S, Dana R, Yin J : Regulatory T cells in angiogenesis. *J Immunol.*2020, 205(10): 2557-2565.
 16. Nosbaum A, Prevel N, Truong HA, Mehta P, Ettinger M, Scharschmidt TC, et al : Cutting Edge: Regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing. *J Immunol.*2016, 196(5): 2010-2014.
 17. Inoue Y, Amano H, Asari Y : Roles of regulatory T cells in enhancement of angiogenesis in a sponge implantation model. *Kitasato Med J.*2018, 48: 105-117.
 18. Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S : Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol.*2002, 168(11): 5811-5816.
 19. Park K, Amano H, Ito Y, Kashiwagi S, Yamazaki Y, Takeda A, et al : Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) signaling enhances angiogenesis in a surgical sponge model. *Biomed Pharmacother.* 2016, 78: 140-149.
 20. DiPietro LA : Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol.*2016, 100(5): 979-984.
 21. Yasukawa K, Okuno T, Yokomizo T : Eicosanoids in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.*2020, 21(22): 8435.
 22. Kamoshita E, Ikeda Y, Fujita M, Amano H, Oikawa A, Suzuki T, et al : Recruitment of a prostaglandin E receptor subtype, EP3-expressing bone marrow cells is crucial in wound-induced angiogenesis. *Am J Pathol.*2006, 169(4): 1458-1472.
 23. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. : Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.*2007, 59(3): 207-224.
 24. Fairweather M, Heit YI, Buie J, Rosenberg LM, Briggs A, Orgill DP ,et al : Celecoxib inhibits early cutaneous wound healing. *J Surg Res.*2015, 194(2): 717-724.
 25. Iwanaga K, Okada M, Murata T, Hori M, Ozaki H : Prostaglandin E2 promotes

- wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP2, EP3, and EP4 prostanoid receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*.2012, 340(3): 604-611.
26. Nishizawa N, Ito Y, Eshima K, Ohkubo H, Kojo K, Inoue T, et al : Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates liver repair after hepatic injury in mice. *J Hepatol*.2018, 69(1): 110-120.
 27. Betto T, Amano H, Ito Y, Eshima K, Yoshida T, Matsui Y, et al : Vascular endothelial growth factor receptor 1 tyrosine kinase signaling facilitates healing of DSS-induced colitis by accumulation of Tregs in ulcer area. *Biomed Pharmacother*.2019, 111: 131-141.
 28. Morimoto Y, Tamura R, Ohara K, Kosugi K, Oishi Y, Kuranari Y, et al : Prognostic significance of VEGF receptors expression on the tumor cells in skull base chordoma. *J Neurooncol*.2019, 144(1): 65-77.
 29. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al : Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*.2011, 475(7355): 226-230.
 30. Gupta S, Joshi K, Wig JD, Arora SK : Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol* .2007, 46(6): 792-797.
 31. Okizaki S, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Kojo K, et al : Vascular endothelial growth factor receptor type 1 signaling prevents delayed wound healing in diabetes by attenuating the production of IL-1 β by recruited macrophages. *Am J Pathol*.2016, 186(6): 1481-1498.
 32. Wang XQ, Zhou WJ, Luo XZ, Tao Y, Li DJ : Synergistic effect of regulatory T cells and proinflammatory cytokines in angiogenesis in the endometriotic milieu. *Hum Reprod*. 2017, 32(6): 1304-1317.

9. 図

9-1. 図1: mPGES-1欠損による肉芽組織形成の減弱

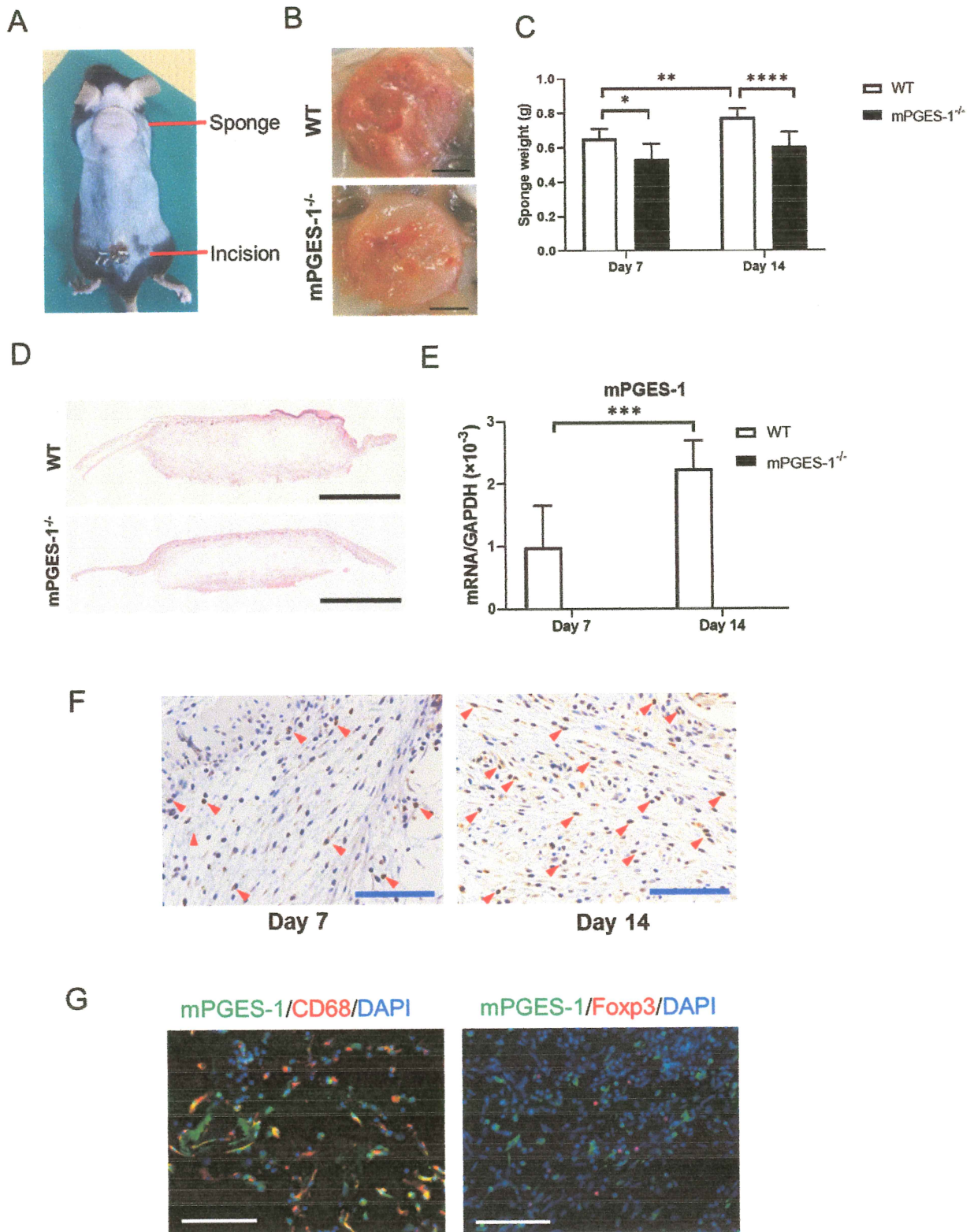


図 1 : mPGES-1 欠損による肉芽組織形成の減弱

- A マウス背部の皮下組織に移植されたスポンジの典型的な外観。
- B WT および mPGES-1^{-/-}マウスから取り出した 14 日目のスポンジ移植の代表的写真。スケールバー、5mm。
- C 7 日目および 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスのスポンジ重量。データは平均 ±SD で表した (1 群あたり n=8~10 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.0001。
- D 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスのスポンジ肉芽組織切片の代表的な顕微鏡写真。スケールバー、5mm。
- E 7 日目および 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における、mPGES-1 をコードする mRNA の発現量。データは平均 ±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。***p<0.001。
- F 7 日目および 14 日目の WT マウスからの肉芽組織における mPGES-1 の免疫組織化学的染色。スケールバー、100 μm。赤い矢印は mPGES-1+細胞を示す。
- G 7 日目の WT マウスの肉芽組織における mPGES-1 (緑) /CD68 (赤) または Foxp3 (赤) に対する免疫蛍光二重染色。スケールバー、100 μm。

9-2. 図2: mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における血管新生と *Foxp3* 発現の減少

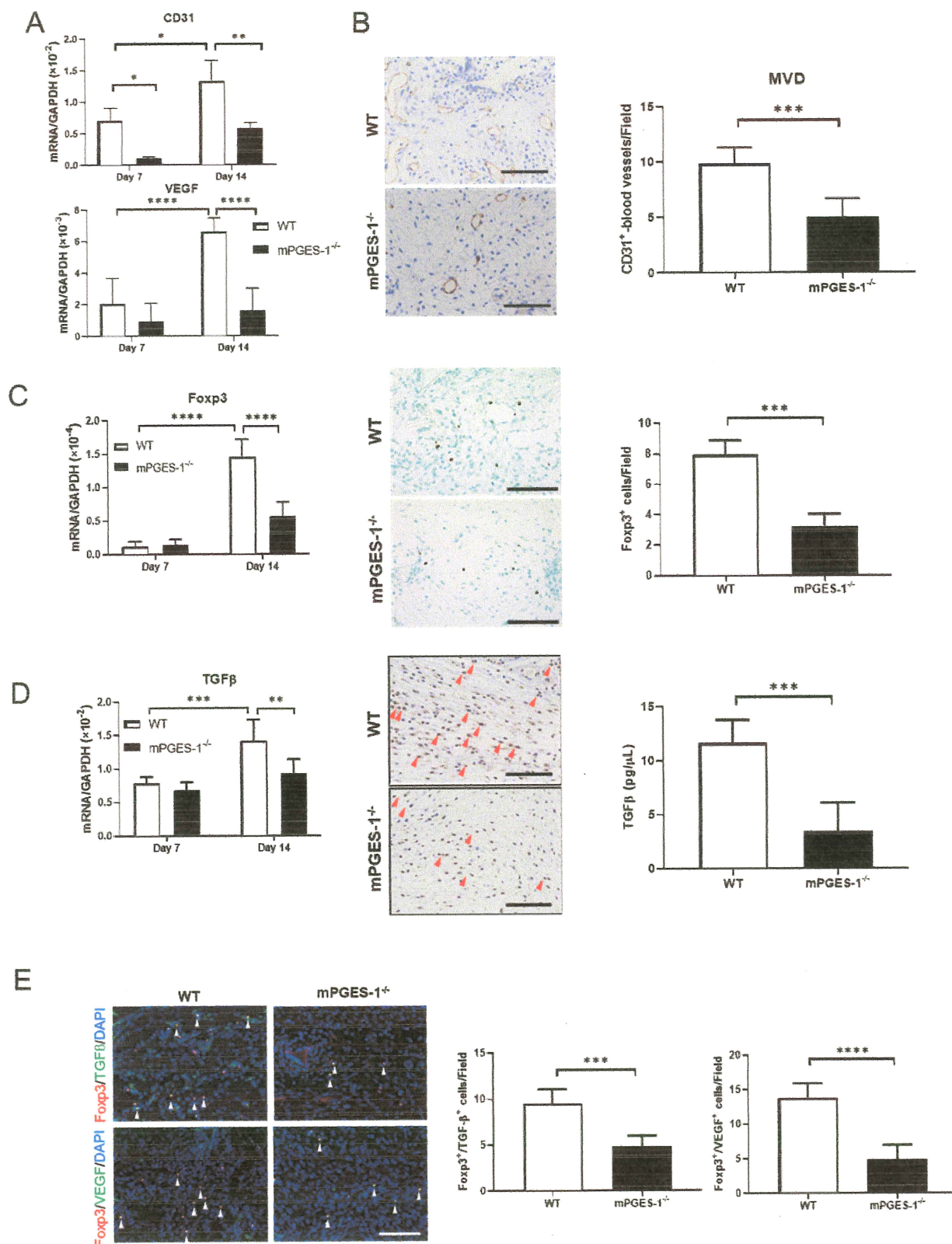


図 2 : mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における血管新生と Foxp3 発現の減少

- A 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における CD31 および VEGF をコードする mRNA のレベル。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.0001。
- B 肉芽組織における CD31 の免疫染色。スケールバー、100 μm。14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスのスポンジ肉芽組織における微小血管密度 (MVD)。密度は CD31 免疫染色により決定した。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。***p<0.001。
- C (左) 7 日目および 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における Foxp3 をコードしている mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。****p<0.0001。(中央) 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における Foxp3 に対する免疫染色。暗褐色に染色された細胞は Foxp3+細胞を示す。スケールバー、100 μm。(右) 14 日目の肉芽組織における Foxp3+細胞数。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。***p<0.001。
- D (左) 7 日目および 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における TGF-β をコードしている mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。**p<0.01、***p<0.001。(中央) スポンジインプラント周囲の肉芽組織における TGF-β 免疫染色。赤い矢印は TGF-β+細胞を示す。スケールバー、100 μm。(右) 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスのスポンジインプラント滲出液中の TGF-β 濃度。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。***p<0.001。
- E (左) 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスからの肉芽組織における Foxp3 免疫蛍光二重染色 (赤) / TGF-β (緑) または VEGF (緑)。白い矢印は二重陽性細胞を示す。スケールバー、100 μm。(右) 14 日目の WT および mPGES-1^{-/-}マウスからの肉芽組織における Foxp3 / TGF-β および Foxp3 / VEGF に対する二重陽性細胞数を示す。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。***p<0.001 および ****p<0.0001。

9-3. 図3: WTおよびmPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織形成および血管新生に対するCD25中和抗体の効果

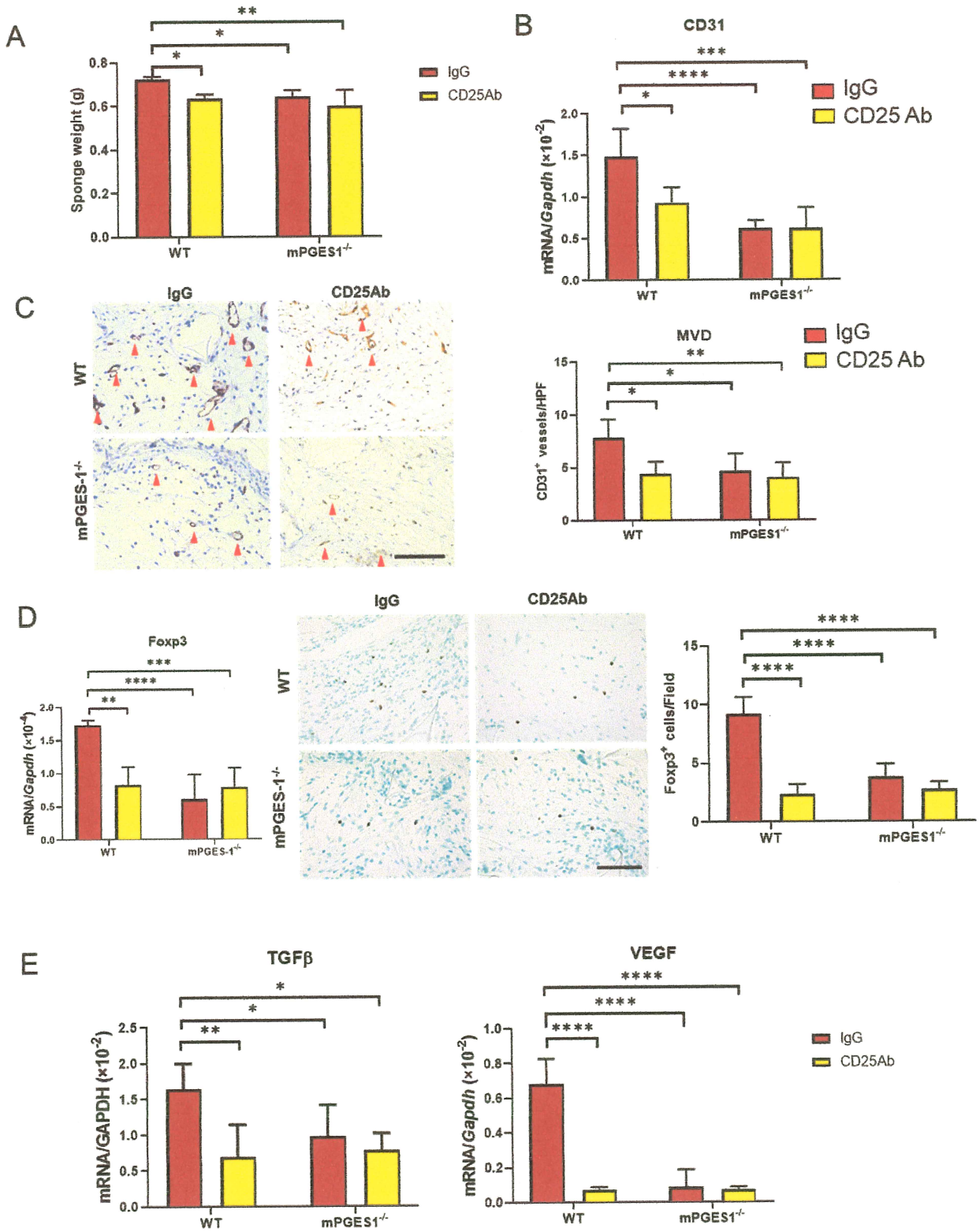


図 3: WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織形成および血管新生に対する CD25 中和抗体の効果

- A CD25 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスの 14 日目のスポンジ重量。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01。
- B CD25 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスにおける CD31 mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、***p<0.001、および***p<0.0001。
- C (左) スポンジインプラント周囲の肉芽組織における CD31 の免疫染色。スケールバー、100 μm。(右) CD25 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスからの 14 日目のスポンジ肉芽組織における MVD。密度は、CD31 免疫染色によって決定した。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01。
- D (左) 14 日目に CD25 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスからの肉芽組織における Foxp3 をコードする mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 グループあたり n=4~6 匹のマウス)。**p<0.01、***p<0.001、および***p<0.0001。(中央) 14 日目のスポンジインプラント周囲の肉芽組織における Foxp3 の免疫染色。暗褐色に染色された細胞は Foxp3⁺細胞を示す。スケールバー、100 μm。(右) 14 日目の肉芽組織における Foxp3⁺細胞数。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。****p<0.0001。
- E 14 日目に CD25 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織における TGF-β および VEGF をコードしている mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.0001。

9-4. 図4: WTおよびmPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織形成および血管新生に対するFR4中和抗体の効果

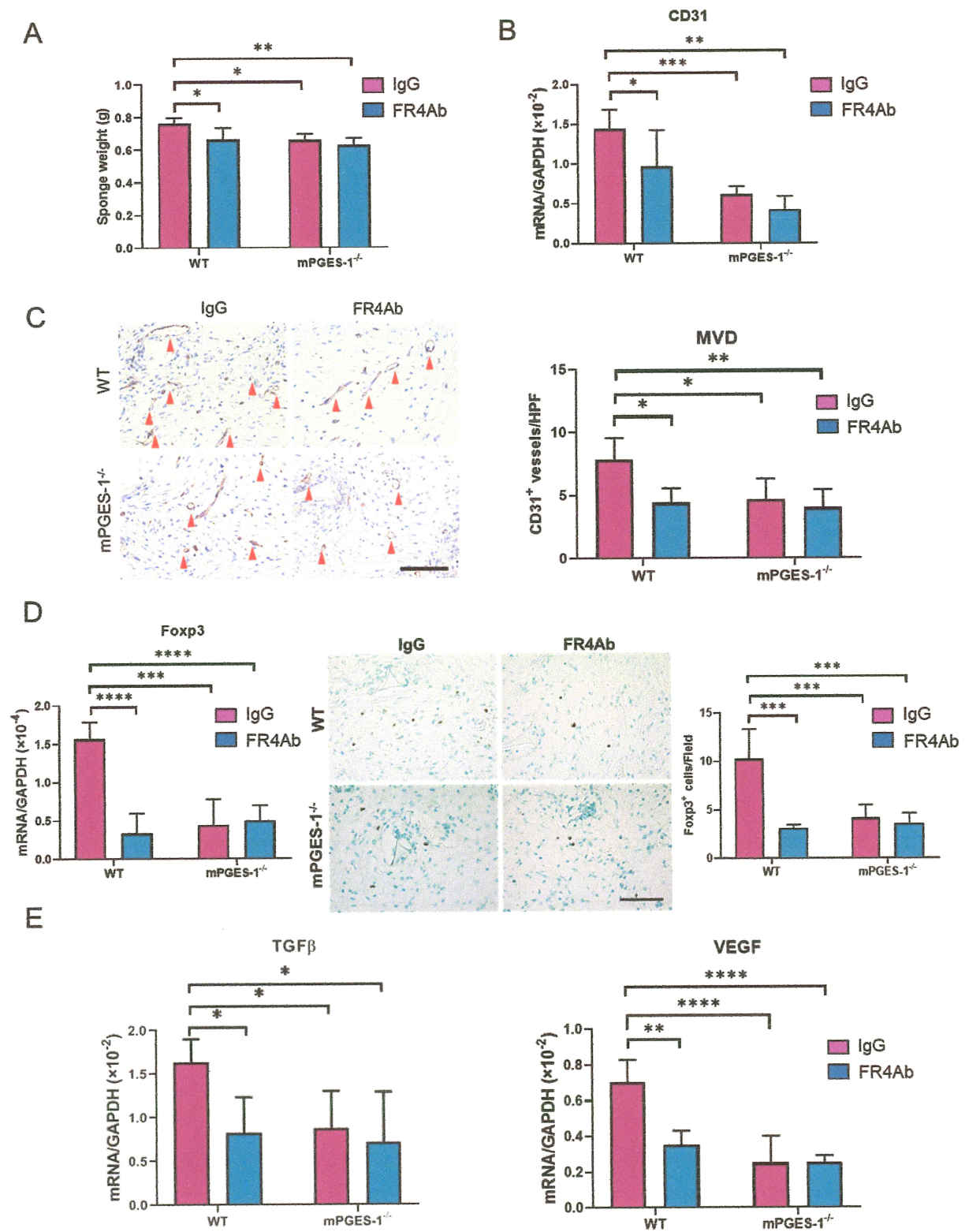


図 4 : WT および mPGES-1^{-/-}マウスの肉芽組織形成および血管新生に対する FR4 中和抗体の効果

- A FR4 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスの 14 日目のスポンジ重量。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01。
- B FR4 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスにおける CD31 mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01、および***p<0.001。
- C (左) スポンジインプラント周囲の肉芽組織における CD31 の免疫染色。スケールバー、100 μm。(右) FR4 抗体またはコントロール IgG を用いた WT および mPGES-1^{-/-}マウスからの 14 日目のスポンジ肉芽組織における MVD。密度は、CD31 免疫染色によって決定した。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01。
- D (左) 14 日目に FR4 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスからの肉芽組織における Foxp3 をコードする mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。***p<0.001 および***p<0.0001。(中央) 14 日目のスポンジインプラント周囲の肉芽組織における Foxp3 に対する免疫染色。暗褐色に染色された細胞は Foxp3+細胞を示す。スケールバー、100 μm。(右) 14 日目の肉芽組織における Foxp3+細胞数。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。***p<0.001。
- E 14 日目に FR4 抗体またはコントロール IgG で処理した WT および mPGES-1^{-/-}マウスからの肉芽組織における TGF β および VEGF をコードする mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.0001。

9-5. 図5: PGE₂局所投与による WT および mPGES-1^{-/-}マウスの14日目の創傷肉芽形成および血管新生の促進

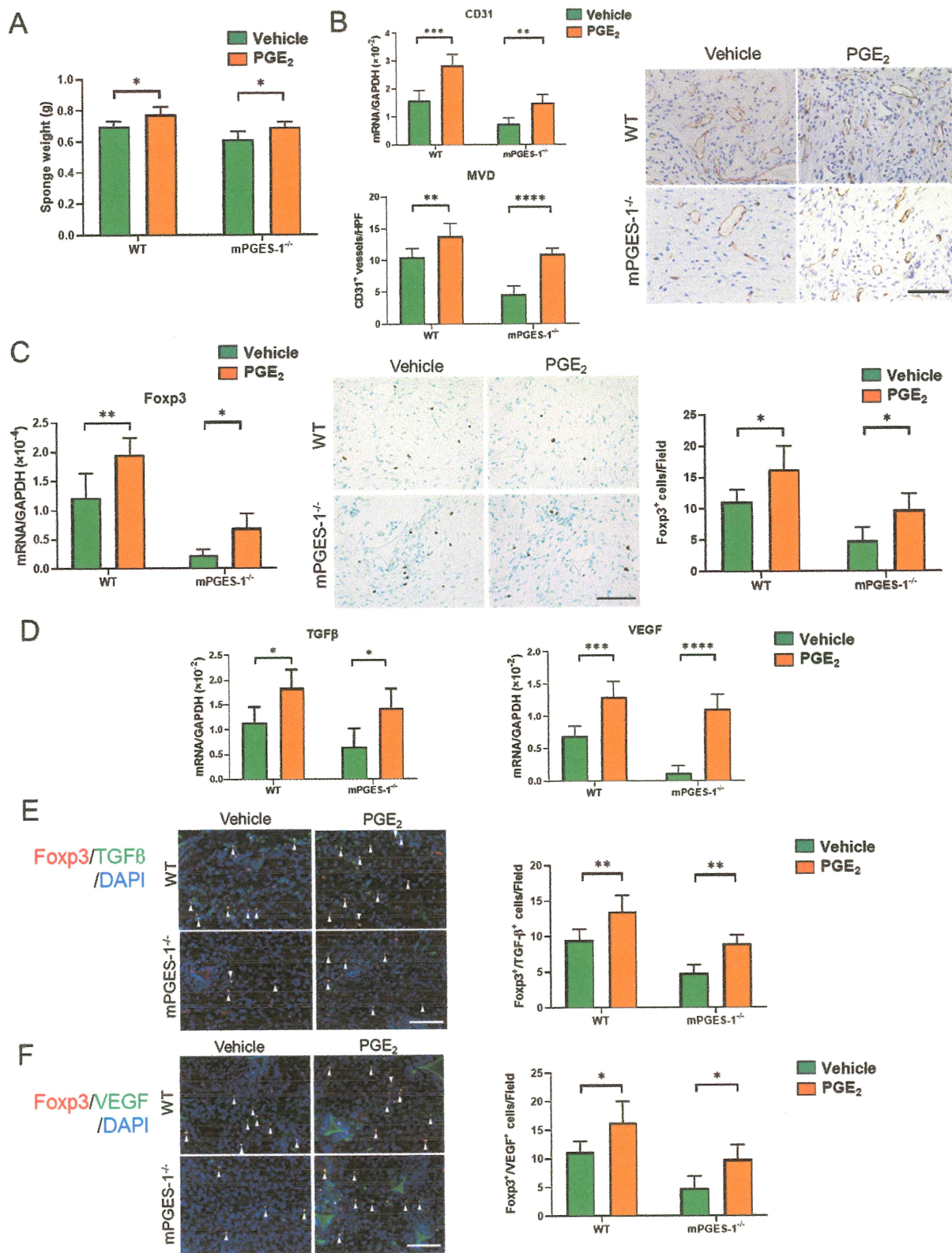


図 5 : PGE2 局所投与による WT および mPGES-1-/-マウスの 14 日目の創傷肉芽形成および血管新生の促進

- A vehicle または PGE2 で処理した WT および mPGES-1-/-マウスのスポンジ重量。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=5~6 匹のマウス)。*p<0.05。
- B WT および mPGES-1-/-マウスの肉芽組織における CD31 をコードする mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。**p<0.01、**p<0.001。WT マウスと mPGES-1-/-マウスに vehicle または PGE2 を投与した肉芽組織における MVD。密度は CD31 免疫染色により決定した。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。**p<0.01, ****p<0.0001。スポンジインプラント周囲の肉芽組織における CD31 免疫染色。スケールバー、100 μm。
- C WT および mPGES-1-/-マウスの肉芽組織における Foxp3 をコードする mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 グループあたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05、**p<0.01。WT および mPGES-1-/-マウスの肉芽組織に vehicle または PGE2 を投与したときの Foxp3 の免疫染色。暗褐色に染色された細胞は Foxp3+細胞を示す。スケールバー、100 μm。肉芽組織における Foxp3+細胞の数。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。*p<0.05。
- D WT および mPGES-1-/-マウスの肉芽組織における TGF-β および VEGF をコードしている mRNA の発現。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=4~6 匹のマウス)。*p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001。
- E vehicle または PGE2 で処理した WT および mPGES-1-/-マウスの肉芽組織における Foxp3 二重免疫蛍光染色 (赤色) /TGF-β (緑色)。白い矢印は二重陽性細胞を示す。スケールバー、100 μm。Foxp3/TGF-β の二重陽性細胞数。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=6 匹のマウス)。**p<0.01。
- F vehicle または PGE2 で処置した WT および mPGES-1-/-マウスの肉芽組織における Foxp3 (赤) /VEGF (緑) 免疫蛍光二重染色。白矢印は二重陽性細胞を示す。スケールバー、100 μm。Foxp3/VEGF の二重陽性細胞数。データは平均±SD で表した (1 群あたり n=5~6 匹のマウス)。**p<0.01。