

学 位 論 文 要 旨

氏 名 藏重 千絵



論 文 題 目

**「Roles of Receptor Activity-Modifying Protein 1 in Angiogenesis
and Lymphangiogenesis during Skin Wound Healing in Mice」**

(マウス創傷治癒時の血管新生・リンパ管新生における

受容体活性調節蛋白1の役割)

指 導 教 授 承 認 印

岡本浩司



マウス創傷治癒時の血管新生・リンパ管新生における受容体活性調節蛋白1の役割

藏重 千絵

【背景】受容体活性調節蛋白1 (RAMP1) は、カルシトニン受容体様受容体 (CLR) とヘテロダイマーを形成し、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 受容体を形成している。CGRP は 37 個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、主に神経系に幅広く発現し、多様な生理作用が知られている。分子薬理研究室では、これまでにさまざまなモデルを用いて CGRP が血管新生に関与しているということを報告してきた。本研究では RAMP1 に着目し、創傷の治癒過程および創傷部位の脈管新生における CGRP-RAMP1 シグナルの役割について検討を行った。

【方法】8 週齢の野生型 C57BL/6 雄性マウス (WT) および RAMP1^{-/-}を使用し、創傷治癒モデルを作成した。マウス背部の皮膚に直径 6mm の創を作成し、WT と RAMP1^{-/-}とで治癒経過を比較した。また創傷肉芽組織を対象として、免疫組織化学的評価や real time PCR を行い、脈管新生の評価を行った。

【結果および考察】WT に比べ RAMP1^{-/-}では、早期における創傷治癒の遅延が認められた。また、肉芽組織における血管内皮マーカー CD31 の免疫染色では、RAMP1^{-/-}で血管密度が有意に抑制された。また real-time PCR を行い、肉芽組織における CD31 と血管新生増強因子 VEGF-A の発現量を調べたところ、いずれも治癒早期の段階で RAMP1^{-/-}において発現の抑制が認められた。これらの結果から、創傷部の肉芽組織における VEGF-A を介した血管新生に CGRP-RAMP1 シグナルが関与していることが示唆された。

次に、抗 RAMP1 抗体および抗 CD31 抗体を用いて免疫染色を行い、血管における RAMP1 の局在について評価したところ、創周辺部の健常皮膚組織の血管上には RAMP1 の発現が認められたが、肉芽組織内の新生血管上には RAMP1 の発現が認められなかった。この結果から、CGRP-RAMP1 シグナルは血管新生には関与するものの、新生血管の内皮細胞には直接的に作用していない可能性が考えられた。

そこで、肉芽の主要構成細胞である線維芽細胞とマクロファージに着目し、それぞれの細胞上に RAMP1 が発現しているか検討を行った。線維芽細胞に対しては抗 S100A4 抗体、マクロファージに対しては抗 CD11b 抗体を用いて、抗 RAMP1 抗体との二重染色を行ったところ、それぞれ共発現部位が観察されたことから、線維芽細胞とマクロファージの表面に RAMP1 が発現していることが分かった。

そこで次に *in vitro* の検討として、線維芽細胞とマクロファージを CGRP アゴニストで刺激し、VEGF-A の遺伝子発現量の変化を評価した。その結果、線維芽細胞の細胞株である L929 では VEGF-A の発現は減少したが、マクロファージでは VEGF-A の発現が用量依存的に増加した。この結果から、マクロファージ上の RAMP1 が CGRP の刺激を受けて、VEGF-A の産生を促進し、血管新生を誘導していることが示唆された。

また同実験において、リンパ管新生増強因子 VEGF-C および VEGF-D の遺伝子発現量の変化についても評価した。その結果、L929 では VEGF-C・VEGF-D いずれも発現量に変化は認められなかった。一方マクロファージでは、VEGF-D の発現量に変化は認められなかったが、VEGF-C の発現は用量依存的に増加した。この結果から、マクロファージが CGRP の刺激を受けて、VEGF-C の産生を促進し、リンパ管新生も誘導している可能性が考えられた。

そこで、肉芽組織におけるリンパ管内皮マーカーLYVE-1 の免疫染色を行い、リンパ管新生を評価してみると、RAMP1-/-でリンパ管密度が有意に抑制された。また *real-time PCR* を行い、肉芽組織における VEGF-C とリンパ管内皮マーカーVEGFR-3 の発現量を調べたところ、いずれも治癒早期から中期にかけて RAMP1-/-において発現の抑制が認められた。さらに、創作成後 7 日目のマウスの創直下に FITC デキストランを投与し、新生リンパ管のドレナージ機能を評価したところ、RAMP1-/-ではリンパ管新生の抑制に伴いドレナージ機能が有意に抑制された。これらの結果から、創傷部の肉芽組織における VEGF-C を介したリンパ管新生に CGRP-RAMP1 シグナルが関与していることが示唆された。

次に、創傷肉芽組織のマクロファージは骨髄から動員されてくることが知られているため、骨髄移植モデルを作成し、骨髄由来マクロファージが創傷部へ動員され治癒を促進しうるかどうか、また動員された際の CGRP-RAMP1 シグナルの役割について検討を行った。

WT の骨髄を移植したマウスと RAMP1-/-の骨髄を移植したマウスとで創傷治癒経過を比較すると、RAMP1-/-骨髄移植マウスでは、早期における創傷治癒の遅延が認められた。

また肉芽組織の免疫染色では、RAMP1-/-骨髄移植マウスにおいて血管密度・リンパ管密度が有意に抑制された。これらの結果から、創傷治癒時の肉芽組織では、骨髄から動員されたマクロファージが CGRP の刺激を受け、VEGF-A、VEGF-C の産生を介して血管新生・リンパ管新生を増強させることが明らかとなった。

【結論】 今回の実験から、創傷治癒過程における脈管新生には、CGRP-RAMP1 シグナル伝達による VEGF 誘導の重要性が示唆された。RAMP1 は血管新生やリンパ管新生がかかわる疾患の治療標的として重要であると考えられる。