

学 位 論 文 要 旨

氏 名 別當 朋広



論 文 題 目

「The role of vascular endothelial growth factor receptor 1
signaling in DSS-induced colitis」

(DSS 誘発性大腸炎における血管内皮増殖因子受容体 1 の役割)

指 導 教 授 承 認 印

小泉 和二郎



The role of vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling in DSS-induced colitis

(DSS 誘発性大腸炎における血管内皮増殖因子受容体 1 の役割)

別當 朋広

要旨

[背景・目的]

潰瘍性大腸炎は非特異的な炎症性腸疾患で、本国では現在約 18000 人が罹患している。その機序は粘膜バリアの破綻や、免疫細胞の異常が原因とされるが未だ不明な部分が多い疾患である。

我々は胃潰瘍や肝障害の実験モデルにおいて血管内皮増殖因子受容体(VEGFR; Vascular Endothelial Growth Factor)1 の発現が亢進し、VEGFR1 Tyrosine kinase (TK)シグナリングが骨髄由来の血液幹細胞を炎症局所に動員することで血管新生を促進し、粘膜治癒や組織修復に寄与することを報告してきた。しかし、潰瘍性大腸炎の炎症抑制や修復に VEGFR1 TK シグナリングが関与するかどうかは不明である。

本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム (DSS; dextran sulfate sodium) 誘発性大腸炎を用いて潰瘍性大腸炎における VEGFR1TK シグナリングの役割について検討した。

[方法]

(1) 使用マウスと大腸炎モデルの作成

雄性 8-10 週齢の C57BL/6 マウス野生型 (WT) 及び VEGFR1 TK 欠損マウス (VEGFR1 TK^{-/-}) を用いて比較検討した。VEGFR1TK^{-/-}マウスは細胞内 TK ドメインが欠損しており、リガントが受容体に結合しても、シグナルが発生しないマウスである。DSS 誘発性大腸炎は 2.0%DSS 水溶液の飲水開始日を第 0 日とし、第 7 日までの 7 日間自由飲水させ作成後、通常水に交換し経日的に評価した。

(2) 炎症大腸粘膜における VEGFA、VEGFR1、VEGFR2 発現の評価

WT マウスの炎症粘膜における VEGFA、VEGFR1、VEGFR2 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR にて評価した。

(3) 炎症大腸粘膜の障害度評価と血管新生の評価

大腸長 (終末回腸から肛門管まで) の計測、遠位結腸の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色にて潰瘍部位の全長を測定し、病理組織学的評価を行った。また血管内皮細胞のマーカーである CD31 の mRNA 発現量測定と免疫染色を大腸粘膜で施行し陽性血管数を測定した。この他、血管新生を誘導する上皮成長因子 (EGF; epidermal Growth Factor) の mRNA 発現量を測定した。

(4) 生体の影響

炎症に伴うマウスへの影響を体重測定及び、体重と、血便の有無、便性で Disease Activity Index (DAI)スコアを作成し評価した。また生存率を評価した。

(5) 大腸粘膜における集積細胞と各種サイトカインの発現の評価

大腸粘膜に集積した細胞、産生されるサイトカインの発現について mRNA 発現、免疫染色で評価した。

(6) 末梢血中の細胞の評価

末梢血中の細胞の割合について flow cytometry で評価した。

(7) 骨髄移植モデルの作成

green fluorescent protein (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大腸粘膜の骨髄由来細胞の集積を評価した。GFP⁺WT の骨髄を WT に (WT→WT)、GFP⁺VEGFR1 TK^{-/-} の骨髄を WT に (VEGFR1 TK^{-/-}→WT) それぞれ移植し、大腸長、骨髄由来細胞の集積の差を評価した。

[結論]

(1) 炎症大腸粘膜における VEGFR1 mRNA の発現の増加

WT の炎症大腸粘膜における VEGFA、VEGFR1、VEGFR2 の mRNA 発現は、VEGFA 及び VEGFR2 は DSS 投与中に漸減し、投与終了の第 7 日目を最低値としその後から漸増を認めた。これに対して VEGFR1 は DSS 投与中の第 3 日目を最低値としその後速やかに増加を認めた。以上より、DSS 誘発性大腸炎モデルで VEGFR1 の発現が腸管粘膜の修復過程に関連があることが示唆された。

(2) 炎症大腸粘膜の病理組織学的評価と血管新生への影響

VEGFR1 TK^{-/-}は WT と比較し有意に大腸長短縮の遷延、大腸粘膜の潰瘍残存を認めた。また炎症大腸粘膜の CD31、EGF の mRNA 発現は、VEGFR1 TK^{-/-}にて有意な抑制を認めた。さらに CD31 陽性の新生血管数は VEGFR1 TK^{-/-}にて有意な減少を認めた。以上の結果より、VEGFR1TK シグナリングが血管新生及び粘膜治癒に関連することが示唆された。

(3) 生体への影響

VEGFR1 TK^{-/-}は WT と比較し有意な体重減少と DAI の高値及び遷延を認めた。VEGFR1 TK^{-/-}は WT と比較し生存率の有意な低下を認めた。

(4) VEGFR1TK シグナリングによる炎症大腸粘膜と末梢血中の VEGFR1⁺CXCR4⁺細胞の増加

炎症大腸粘膜において走化性因子である Stromal cell-derived Factor (SDF)-1 と SDF-1 の受容体である C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)の発現が WT と比較し VEGFR1 TK^{-/-}で有意な抑制を認めた。また VEGFR1 と CXCR4 に対し免疫組織学的検討を行い、VEGFR1 TK^{-/-}で VEGFR1⁺CXCR4⁺細胞の有意な低下を認めた。さらに VEGFR1 TK^{-/-}は WT と比較し、flow cytometry にて末梢血中の VEGFR1⁺CXCR4⁺細胞の割合の低下を認めた。以上より VEGFR1⁺細胞は SDF-1/CXCR4 軸を介して末梢血中から炎症大腸粘膜に動員されることが示唆された。

(5) VEGFR1TK シグナリングによる Foxp3⁺VEGFR1⁺CXCR4⁺陽性細胞の動員を介した抗炎症効果に関する影響

潰瘍性大腸炎は抑制調節性に機能する免疫細胞の一つである制御性 T 細胞が、その成因に深く関与することが報告されている(Rubtsov YP et al 2008; Wang Y et al 2011)。制御性 T 細胞と VEGFR1 シグナリングの関連を検討するため、制御性 T 細胞のマスター転写因子である Forkhead box protein P3 (Foxp3)をマーカーとし、炎症大腸粘膜について免疫組織学的に評価すると、VEGFR1 TK^{-/-}において Foxp3⁺細胞の有意な低下を認め、さらに VEGFR1⁺Foxp3⁺細胞数は VEGFR1 TK^{-/-}で有意な低下を認めた。また局所炎症部位における制御性 T 細胞の分化維持に必要な IL-2 の mRNA 発現は VEGFR1 TK^{-/-}で抑制を認め、抗炎症性サイトカインで、主に制御性 T 細胞で産生される TGF-β、IL-10 の mRNA 発現も VEGFR1 TK^{-/-}で抑制された。さら免疫組織学的に炎症粘膜での TGF-β と

Foxp3 の発現を評価したところ、VEGFR1 TK^{-/-}で Foxp3⁺TGF-β⁺ 細胞数の有意な低下を認めた。VEGFR1、Foxp3 及び CXCR4 の三重染色にて VEGFR1⁺Foxp3⁺細胞に CXCR4 の発現を認め、その数は WT と比較し VEGFR1TK^{-/-}では集積細胞数の有意な低下を認めた。以上から VEGFR1TK シグナリングにより CXCR4⁺VEGFR1⁺制御性 T 細胞は TGF-β を産生し、粘膜局所の炎症に関与することが示唆された。

(6) VEGFR1TK シグナリングによる骨髄由来 VEGFR1⁺EGF⁺細胞の局所炎症粘膜への集積及び同部位での血管新生及び粘膜修復

炎症大腸粘膜で VEGFR1 と EGF に対する二重染色で VEGFR1⁺EGF⁺細胞数は WT と比較し VEGFR1 TK^{-/-}では有意にその数の低下を認めた。VEGFR1TK シグナリングにより動員され VEGFR1⁺EGF⁺細胞が増加し、血管新生、粘膜修復が促進されることが示唆された。骨髄移植実験では WT→WT と比較し、VEGFR1TK^{-/-}→WT で大腸長の短縮を認め、また炎症大腸粘膜における EGF、CD31、VEGFR1、GFP の mRNA 発現に低下を認めた。免疫染色では VEGFR1TK^{-/-}→WT において GFP⁺VEGFR1⁺EGF⁺細胞及び GFP⁺VEGFR1⁺CXCR4⁺細胞数の低下を認めた。

[結論]

VEGFR1TK シグナリングは VEGFR1⁺Foxp3⁺細胞の CXCR4 発現を刺激し、炎症大腸粘膜への動員を促進することで DSS 誘発性大腸炎の増悪を抑制し、また骨髄由来の VEGFR1⁺EGF⁺細胞を炎症大腸粘膜に動員することで血管新生、及び粘膜修復に関連することが示唆された。