

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

中道美保より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 558 号

学位申請者 : 中 道 美 保

学位審査論文 : Basic fibroblast growth factor induces angiogenic properties of fibrocytes to stimulate vascular formation during wound healing

(好塩基性線維芽細胞成長因子は血管新生性の骨髄間葉系前駆細胞を誘導して創傷治癒期の血管新生を促進する)

著 者 : Miho Nakamichi, Yuri Akishima-Fukasawa, Chie Fujisawa, Tetsuo Mikami, Kiyoshi Onishi, Yoshikiyo Akasaka

公 表 誌 : The American Journal of Pathology DOI:10.1016/j.ajpath.2016.08.015

論文内容の要旨 :

【背景と目的】 受傷した皮膚では一過性の修復組織である肉芽組織が生じ、炎症消退とともに瘢痕に置き換わる。この肉芽組織は線維芽細胞や血管内皮から複雑に構成され、両細胞の由来は解明されていない。近年白血球マーカーを発現し細胞外基質を産生する骨髄由来間葉系前駆細胞 Fibrocyte が同定され、線維化における骨髄血球の直接的関与が *in vitro* で推定されているが、*in vivo* での Fibrocyte は不明な点が多い。また一過性に生じる肉芽組織を構成する線維芽細胞や内皮細胞の相互関係や、両細胞の発生母地における Fibrocyte の関与も不明である。本研究では血管増殖刺激因子 Basic fibroblast growth factor (bFGF) による人為的な血管新生の促進過程で Fibrocyte の発現性を解析し、同細胞による血管新生への関与を検討し、骨髄細胞による組織修復の直接的関与を実証することを目的とした。

【方法】 Sprague-Dawley rat (雄、12 週齢) に全層性皮膚潰瘍を作成し ①bFGF (10 ng/cm²) 投与群、②Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A; 1 μg/cm²) 投与群、③PBS 投与群を作成した。投与 2、4、6、7、14 日目の創傷組織を採取し、mRNA 抽出と組織標本作製に供した。新生血管数の定量化は von Willebrand factor 免疫染色と、CD34、α-smooth muscle actin、Podoplanin を用いた免疫三重染色から評価した。Fibrocyte は CD34、CD45、CD11b と Pro-collagen I の蛍光二重染色で 3 種類の異なる Fibrocyte を同定し、それらの発現性を検討した。さらに Real-time PCR 法から mRNA レベルの発現性も検討した。血

管新生に深く関与する血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell: EPC)は CD34, Flk-1 を用いた蛍光二重染色から同定し、EPC と Fibrocyte を比較検討した。bFGF 反応性の検証のため、bFGF シグナル伝達に重要な受容体 FGF-receptor1 (FGFR1) のノックアウト実験を施行した。すなわちヒト・ラットに共通した FGFR1 シークエンスに対する Small interfering RNA (siRNA) を作成し、これを遺伝性導入した皮膚組織において bFGF 反応の特異性を検証した。

【結果】 血管数の定量や内皮細胞マーカー mRNA 発現による Real-time PCR 法から bFGF 投与による血管新生促進効果が認められ、bFGF 投与創でも投与 4 日、6 日目で細小動静脈の増加が確認された。この血管新生過程で投与 4 日目に CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte は緩やかな細胞網を形成し始め、6 日後には血管内皮様構造を形成した。CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte 数は bFGF 投与 4、6、7 日目に有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。しかしタイプの異なる CD45+/pro-collagen I+ fibrocyte と CD11b+/pro-collagen I+ fibrocyte は有意な増加がなく、両細胞による血管様構造も認められなかった。一方、bFGF 投与創では EPC の増加はなく、また VEGF-A 投与創で CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte の増加や血管様構造は確認できなかった。さらに FGFR1 mRNA ノックダウン組織では、bFGF 投与 6 日目で CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte と血管様構造の減少による有意な阻害効果が確認された。したがって bFGF による CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte 誘導による血管新生には bFGF/ FGFR1 システムが関与することが証明された。

【考察】 従来から血管新生には VEGF による EPC の分化誘導が重要と考えられてきた。実際、本研究でも VEGF 投与で EPC 誘導と血管新生促進が確認できたが、異なる血管増殖刺激因子である bFGF による血管新生メカニズムとの違いは不明だった。今回の結果から bFGF 投与では EPC 誘導がなく、CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte 誘導による血管新生が認められた。よって VEGF と異なり bFGF は、CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte 誘導から血管新生を促進し、従来線維化能が主体と想定されてきた Fibrocyte による血管新生能を初めて証明した。

受傷後生じる修復組織である肉芽組織では線維芽細胞や血管内皮細胞が短時間に発現し消失するため、判別が困難で両者の相互関係は不明な点が多い。文献的には bFGF 投与による血管内皮細胞の線維芽細胞への形質転換が報告されている。この形質転換は、CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte が、本実験で示したように血管新生期に内皮細胞様変化を示し、時間経過とともに線維芽細胞への分化が予想される現象と類似であることが示唆された。また VEGF 投与による恒久的な血管形成のメカニズムと今回の修復組織における一過性の血管新生のメカニズムとの相違は明らかとされていない。今回の結果から後者の一過性の血管新生メカニズムとしては、血管新生期に一過性に血管構築に関与し時間経過とともに線維芽細胞に分化し癒着化への寄与が予想される Fibrocyte の役割が示唆され、EPC と Fibrocyte による血管新生能の違いが示唆された。

【結語】 本研究はこれまで不明であった修復組織の一過性の血管新生メカニズムに、最終的に線維化に寄与すると想定される Fibrocyte の血管新生への関与を証明し、新規の血管新生メカニズムを解明した。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 558 号	氏 名	中 道 美 保
学位審査担当者	主 査	高 橋 啓
	副 査	諸 井 雅 男
	副 査	林 明 照
	副 査	島 田 英 昭
	副 査	武 城 英 明

学位審査論文の審査結果の要旨 :

学位審査会は平成 29 年 1 月 23 日午後 3 時より 4 時まで、医学部第 2 セミナー室にて、5 名の審査員の出席の下（書面による事前審査員含む）に開催された。

研究概要：修復組織の線維化に重要な線維芽細胞は、骨髄由来間葉系前駆細胞 Fibrocyte に由来することが in vitro で証明されたが、in vivo における Fibrocyte の機能は不明な点が多い。本論文は、血管増殖刺激因子 Basic fibroblast growth factor (bFGF) による人為的な血管新生の促進過程で Fibrocyte の発現性を解析し、同細胞の発現増加による血管増生から骨髄細胞による新たな血管新生メカニズムを提唱した。方法としては Sprague-Dawley rat に全層性皮膚潰瘍を作成し、bFGF もしくは Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) 刺激を加えた後、経時的に創部組織を採取し検討した。その結果、血管数定量と内皮細胞マーカー mRNA 発現による Real-time PCR 解析から bFGF による血管新生促進効果が確認された。この血管新生過程で bFGF 誘導性 CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte による明らかな血管様構造の発現増加をみた。一方、VEGF-A 投与創では CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte による血管様構造の誘導は確認できなかった。さらに、FGFR1 mRNA ノックダウン実験では CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte と血管様構造の誘導は有意に阻害された。この結果から bFGF は CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte を特異的に誘導し、同細胞の血管新生に直接関与していることが明らかとなり、骨髄由来細胞である Fibrocyte による新たな血管新生メカニズムが確認された。

学位審査会では申請者による研究要旨の発表後、活発な質疑応答がなされた。FGFR1 siRNA 遺伝子導入実験の方法論、難治性潰瘍に対し臨床的に推奨される bFGF の使用方法、瘢痕化と Fibrocyte の減少との関係性や、Fibrocyte を使用した新規治療法への展望などが、主査と副査から質問された。それらすべての質問に対して申請者は的確に回答した。

以上より、これまで線維化に関与するとされてきた Fibrocyte が示す血管新生機構が新たに証明されたことは、特に組織修復過程における一過性の血管新生メカニズム解明に大きく寄与するものであり、さらには今後臨床展開も期待し得る点で、本研究の意義は高く、審査員全員一致で学位授与に相当すると判断し、学位審査会を終了した。