

骨髄間葉系前駆細胞 (Fibrocyte) による 新規血管新生メカニズムの解明

中道 美保

東邦大学医学部形成外科学講座

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細胞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 の機能は不明な点が多い。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 の発現様式を解析し、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 日目の創部組織を採取し、mRNA 抽出と組織標本作製に供した。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 反応特異性を検証するため、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、これを導入した皮膚組織において Fibrocyte 発現性の特異性を検証した。本研

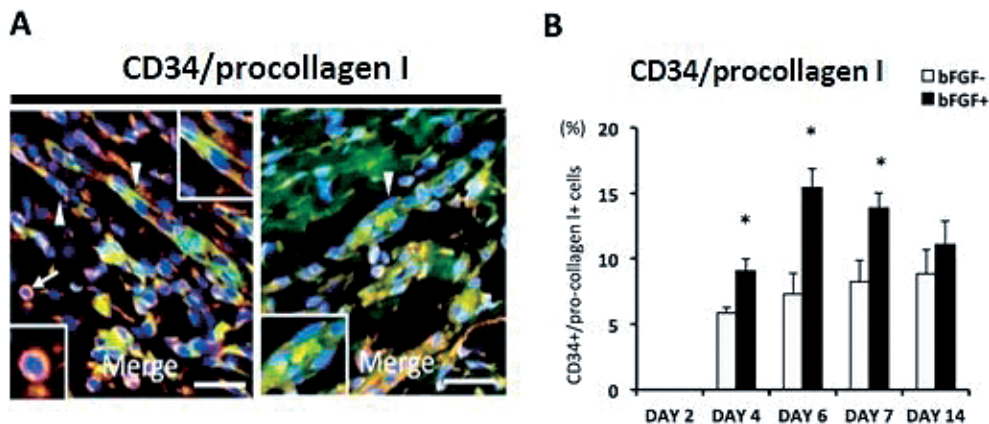


Fig. 1

A : bFGF 誘導性 CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte による血管様構造の形成。内腔に赤血球の自家蛍光を認める。Scale bars = 10 μm.

B : bFGF 投与による CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte の増加。* P < 0.05

究は東邦大学医学部動物実験委員会より承認を得た（動承15-33-239）。

結果：血管新生過程で投与4日目にCD34⁺/procollagen 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（Fig. 1A）。CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte数はbFGF投与4, 6, 7日目に有意な増加を認めた（ $p < 0.05$ ）（Figure 1B）。しかしタイプの異なるCD45⁺/procollagen I⁺ fibrocyteとCD11b⁺/procollagen I⁺ fibrocyteはbFGFによる有意な発現増加がなく、両細胞による血管様構造も認められなかった（Fig. 2A, B）。またVEGF-A投与創におけるCD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyteの増加や血管様構造は確認できなかった（Fig. 3A, B）。一方EPCはVEGF-A投与創で有意な発現増加を認めたが、bFGFによる増加はなかった。さらにFGFR1mRNAノック

ダウン組織では、bFGF投与6日目でCD34⁺/procollagen 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（Fig. 4A, B）。したがってbFGFによるCD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte誘導による血管新生にはbFGF/FGFR1システムの関与が証明された。

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⁺/procollagen 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⁺/procollagen I⁺ fibrocyte誘導から血管新生を促進し、従来線維化が主体と想定されてきたFibrocyteに血管

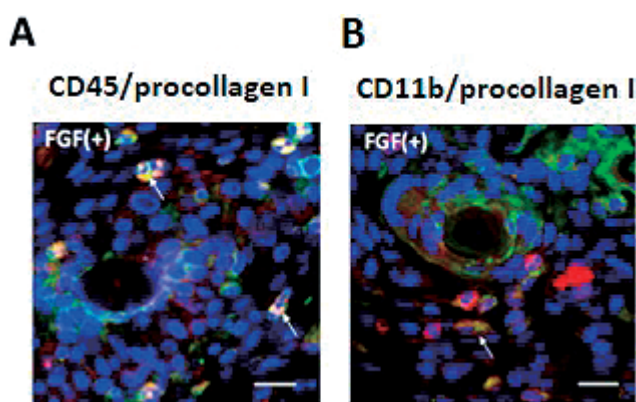


Fig. 2

A, B: CD45⁺/procollagen I⁺ fibrocyte (A) と CD11b⁺/procollagen I⁺ fibrocyte (B) は bFGF 投与修復組織において血管様構造を形成しない。Scale bars = 10 μm.

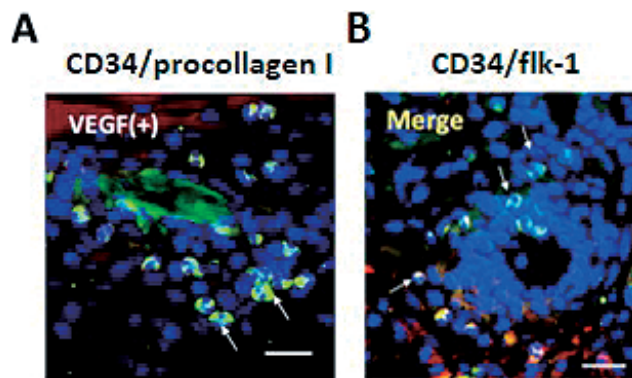


Fig. 3

A: VEGF-A 投与修復組織では CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte による血管様構造形成は認めない。
B: VEGF-A は CD34⁺/flk-1⁺ cell (EPC) を誘導する。Scale bars = 10 μm.

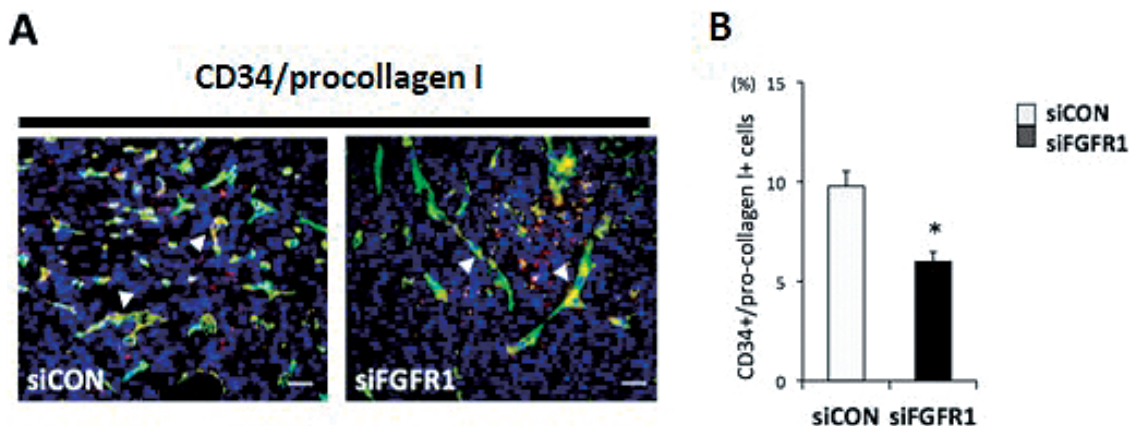


Fig. 4

A: siRNA control (siCON) 投与修復組織 (左), FGFR1 siRNA (siFGFR1) 投与修復組織 (右). FGFR1 knock down により CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte の血管様構造形成は抑制される。Scale bars = 10 μm.
B: siFGFR1 投与による CD34⁺/procollagen I⁺ fibrocyte の減少。* $P < 0.05$

新生能を初めて証明した。

結語：本研究はこれまで不明であった修復組織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 による血管新生の関与を証明し、新規の血管新

生メカニズムを提唱した。

本講演の要旨は、Am J Pathol. 2016 ; 186 (12) : 3203-16 に掲載された内容である。

中道美保先生 略歴



2008年3月	東邦大学医学部卒業
2008年4月	第102回医師国家試験合格(医籍登録 第473970号) 独立行政法人国立病院機構東京医療センター 初期臨床研修医
2010年4月	東邦大学医療センター佐倉病院形成外科 レジデント
2012年3月	東邦大学医療センター大橋病院形成外科 レジデント
2013年4月	東邦大学大学院医学研究科博士課程 入学
2016年4月	日本形成外科学会形成外科専門医取得(第15-2788号)
2017年3月	東邦大学大学院医学研究科博士課程 修了 医学博士取得
2017年4月	東邦大学医療センター大森病院形成外科 助教

DOI: 10.14994/tohoigaku.2018-004