創傷治癒過程において、 血管網の再構築が表皮幹細胞の分裂制御に果たす役割

神戸学院大学大学院薬学研究科

水谷健一

Endothelial cells (ECs) form an extensive network of blood vessels that has numerous essential functions in the vertebrate body. In addition to their well-established role as a versatile transport network, blood vessels can induce organ formation or direct growth and differentiation processes by providing signals in a paracrine (angiocrine) fashion. ECs are emerging as important signaling centers that coordinate regeneration and help to prevent deregulated, disease-promoting processes. Vascular cells are also part of stem cell niches and have key roles in hematopoiesis, bone formation, and neurogenesis. Here we established the experimental system to observe vascular networks in skin tissue, and found that vascular regularity in the back skin was predominantly disrupted with aging. Furthermore, the wound healing was significantly delayed in VEGFR-1 heterozygous knockout mice, suggesting that healing process requires the proper restoration of vasculature in the skin tissue.

1. 緒 言

血管系の発生過程では、脈管形成と呼ばれる、血管内皮 前駆細胞が集合して原始血管叢を形成し、続いて血管新生 の過程において、組織構築に伴い低酸素に応答して原始血 管叢が無血管領域へと浸潤し、より複雑な毛細血管網を構 築する。原始血管叢の発芽領域では、成長中の血管の先端 に位置する血管内皮細胞が、無数の糸状仮足を無血管領域 に向けて伸展する。この糸状仮足を伸ばす血管内皮細胞を、 血管先端内皮細胞、その背後から増殖して血管伸長を支え る血管内皮細胞を血管柄細胞と呼ぶ。血管先端内皮細胞は 無血管領域に発現する血管内皮成長因子(VEGF)の濃度勾 配に応じて糸状仮足を伸ばしながら遊走し、血管成長の方 向性を決定する。一方、血管柄細胞は活発な増殖により後 続する血管網の細胞数を規定し、両者は可塑性を保ちなが ら血管網を構築している。こうして形成される血管系を制 御するシグナル伝達系に関しては、数多くの研究が行われ てきた結果、VEGFに加え、アンジオポエチン、エフリン 等の諸因子が重要な役割を果たすことが明らかとなってい る。中でも、VEGFとそのチロシンキナーゼ受容体のシグ ナル伝達系は、生理的血管新生のみならず様々な病態にお ける血管新生においても中心的な役割を果たすことが知ら れている。VEGF 受容体の中でも、VEGF-A は VEGFR-1 (Flt-1) と VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 受容体型チロシンキ ナーゼを利用し、この2つの受容体には明確な違いがあり、



Interaction between the capillary-milieu and the epidermal stem cells regulates wound healing

Ken-ichi Mizutani

Laboratory of Stem Cell Biology, Graduate School of Pharmacentical Sciences, Kobe Gakuin University VEGF-Aとの結合の強さはVEGFR-1の方がVEGFR-2よりも10倍以上強い一方で、チロシンキナーゼ活性については、VEGFR-1はVEGFR-2に比べて10分の1程度であることが明らかとなっている。つまり、主要なシグナル伝達を担うのはVEGFR-2であり、VEGFR-1は調節的な役割を果たすことが強く示唆されており、ノックアウトマウスの解析結果はこれと合致している。また、最近の研究ではVEGFR-2は血管先端内皮細胞や微小血管に優位に発現する一方で、VEGFR-1は中・大動脈内皮細胞に優位に発現する傾向があることが分かっている。

近年、血管の酸素養分の運搬路という基本的な機能に加えて、血管によって構築される微小環境 (niche) の概念が提唱されており、組織形成の理解において、幹細胞を支持する生物学適所としての血管の役割に注目が集まっている。皮膚には、表皮、毛包をそれぞれ生み出す幹細胞が存在し、肌の恒常性の維持、毛の生え変わり、皮膚損傷の治癒などの役割を担っている。そこで本研究では、皮膚の恒常性の維持、創傷治癒における細胞外環境としての毛細血管の役割を明確化することを目的とした。

2. 方 法

2.1. 皮膚組織における毛細血管のイメージング技術の確立

組織内の毛細血管を明瞭に観察するためには、薄切切片では断片的な情報しか得られないため、できる限り組織を厚みのある状態で観察すると共に、蛍光免疫染色ではなく高感度で毛細血管を観察する必要がある。このため、VEGFR-1プロモーターの制御によりtDsRedを発現するトランスジェニックマウス¹⁾、およびVEGFR-2プロモーターの制御によりGFPを発現するトランスジェニックマウス²⁾を用いて背中皮膚組織を採取し、観察した。組織はPBS中で解剖後、4%パラホルムアルデヒ

ド/PBSで浸透固定した。固定した組織は、PBSで2回洗浄後、4℃で一晩、30%スクロース/PBS置換を行った。その後、OTCコンパウンドで包埋し、クライオスタットを用いて $100\,\mu m$ の厚さの凍結切片を作製した。凍結切片はPBS-0.1%Triton-X (PBST) で3回洗浄後、10% donkey serum/PBSTで室温にて1時間ブロッキングを行い、10% donkey serum/PBSTで希釈した1次抗体で、4℃で一晩反応させた。PBSTで3回洗浄した後、10% donkey serum/PBSTで希釈した2次抗体で、室温で1時間反応させ、PBSTで3回洗浄後にマウントして観察標本を作成した30。これらの組織切片の観察は、蛍光顕微鏡 IX 81 (Olympus) およびコンフォーカル顕微鏡 FV 1000 (Olympus) にて行った。

2. 2. VEGFR-1 ヘテロノックアウトマウスにおける 創傷治癒の解析

生後40日のVEGFR-1へテロノックアウトマウス⁴⁾ およびワイルドタイプマウスを麻酔し、背部に直径6mmの円形皮膚全層欠損創を皮膚生検トレパン(KAI STERILE DISPOSABLE BIOPSY PUNCHES口径6mm、カイインダストリー(株))を用いて作製し、治癒するまでの創傷部を経時的に観察することで完治するまでの日数を評価した。

3. 結果

皮膚は老化に伴って表皮や真皮の非薄化、細胞外マトリックスの減少等の組織学的な加齢変化が顕著であることが指摘されているが、皮膚を構成する毛細血管の加齢変化については不明な点が多い。そこで本研究では皮膚組織における毛細血管の規則性と老化に伴う組織学的な変化を見出すことを目的として、皮膚組織内の毛細血管が明瞭に観察できる実験系の構築を先ず行った。具体的には、VEGFR-1-EGFPおよびVEGFR-2-DsRed BACtgマ

ウスを用いて、若齢期から老齢期における皮膚組織を比較 し、蛍光蛋白を発現する血管内皮細胞を指標に、加齢に伴 ってどのように組織内の密度および分布が変化するかを詳 細に解析した。その結果、若齢期では組織内の血管密度が 高く、VEGFR-1あるいはVEGFR-2を発現する毛細血管 が規則的に毛包に沿って分布することが観察された (Fig. 1)。この際、VEGFR-1を発現する毛細血管、VEGFR-2 を発現する毛細血管、両者を発現する毛細血管が各々存在 し、皮膚組織内を構成する毛細血管が極めてヘテロな集団 であることが示唆された。一方、老齢になると組織内の毛 細血管の分布が大きく損なわれ、VEGFR-1を発現する毛 細血管においても、VEGFR-2を発現する毛細血管におい ても何れも組織内の密度が顕著に減少し (Fig. 1) 老齢期で は無血管な領域も観察された。こうした老齢期における毛 細血管の分布異常は、組織内に本来適切に供給されるべき 酸素、栄養分が枯渇するばかりでなく、微小環境の破綻に よって組織幹細胞が担う様々な生理現象への影響が懸念さ れる。

そこで次に、組織内の血管密度が破綻したVEGFR-1へテロ欠損マウスを用いて、創傷後の治癒過程を評価することで、毛細血管の規則的な分布が新生皮膚組織の再構築に果たす役割を解析した(Fig. 2)。その結果、VEGFR-1へテロ欠損マウスでは、ワイルドタイプと比較して、創傷治癒が優位に遅延することが確認された(Fig. 2)。現時点では、皮膚の恒常性の破綻と周囲の組織幹細胞の関連性については評価できていなが、VEGFR-1へテロ欠損の治癒過程では新生血管の遊走や浸潤、周囲の組織幹細胞との物理的な接触がいかに変化し、結果的に組織の再構築にどのような影響を及ぼすかについて、現在、解析を進めている。本研究課題の成果がさらに発展することで、創傷治癒における血管新生と組織幹細胞の分化制御の関連性が明確化され、これが様々な組織修復の基盤技術に応用されることが

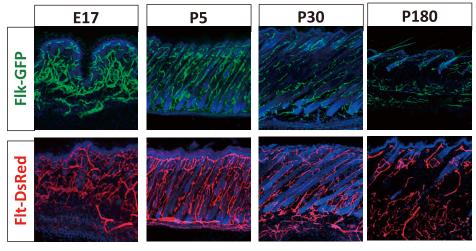


Fig. 1 血管リポーターマウスを用いた皮膚組織における毛細血管の加齢変化

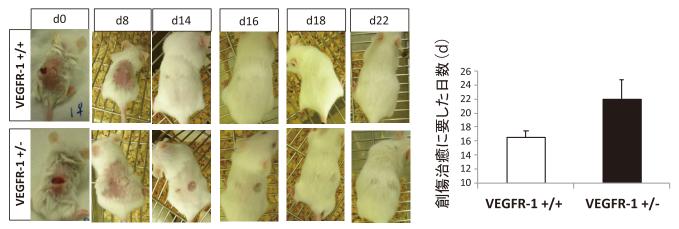


Fig. 2 VEGFR-1 ヘテロ欠損マウスにおける創傷治癒の解析

期待される。

4. 考察

血管は組織細部にわたり栄養分や酸素を運搬する極めて 重要な器官の一つであり、一定の組織空間に規則的に分布 する。血管が空間に如何に伸展し、その進展を止めるの かという、血管発生を調節する分子機構は未だ未解明の 問題が数多く残されており、最近の研究では、組織・臓器 ごとに血管発生・新生を制御する分子機構が大きく異な り、こうした血管内皮細胞の不均一性が、組織・臓器ごと の加齢変化の違いと密接に関連している可能性が指摘され ている。こうした背景から、本研究では細胞外環境として の毛細血管の役割に着目し、VEGFR-1プロモーターの制 御によりtDsRedを発現するトランスジェニックマウスと、 VEGFR-2プロモーターの制御によりGFPを発現するト ランスジェニックマウスを用いて、組織学的に詳細に解析 を行った。その結果、表皮や真皮の組織内で毛細血管が規 則的に分布することが本研究によって確認された。これま での先行研究では、組織を構築する幹細胞は周囲の血管と 密接な相互依存性があり、幹細胞が物理的に接することや 血管由来のシグナル分子に依存して、幹細胞の分裂・分化 が大きく変化することが知られている。たとえば、骨組織 においては、成体の早い時期から特徴的な毛細血管が減少 することで微小環境が破綻し、これが骨量の減少と密接に 関連することが報告されている。一方、損傷皮膚組織の治 癒過程では、炎症期、増殖期、成熟期を経て損傷を受けた 組織を元どおりに修復する分子機構があり、この際、新た に形成された肉芽組織に酸素と栄養を供給するために血管 新生が観察されるが、血管新生の乏しい肉芽組織は創傷治 癒が遅延、障害され、難治性になることが古くから指摘さ れてきた。このため、低酸素環境で血管内皮細胞の動員が 盛んであることに着目して⁵⁾、低酸素による血管新生促進 効果を期待した酸素不透過の被覆材が臨床の現場で広く用

いられている⁶⁾。今後、創傷治癒における血管新生と組織 幹細胞の関連性がさらに明確化され、これが様々な組織修 復に応用されることが期待される。

(引用文献)

- Matsumoto, K., Azami, T., Otsu, A., Takase, H., Ishitobi, H., Tanaka, J., Miwa, Y., Takahashi, S. & Ema, M. Study of normal and pathological blood vessel morphogenesis in Flt1-tdsRed BAC Tg mice. *Genesis* 50, 561-71 (2012).
- 2) Ishitobi, H., Matsumoto, K., Azami, T., Itoh, F., Itoh, S., Takahashi, S. & Ema, M. Flk1-GFP BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp. Anim.* **59**, 615-22 (2010).
- 3) Inoue, M., Iwai, R., Tabata, H., Konno, D., Komabayashi-Suzuki, M., Watanabe, C., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Matsuzaki, F., Nagata, K. & Mizutani, K. Prdm16 is crucial for progression of the multipolar phase during neural differentiation of the developing neocortex. *Development*, **144**, 385-399 (2017).
- 4) Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70 (1995).
- 5) Semenza, G.L., Vascular responses to hypoxia and ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 648–652 (2010).
- 6) Knighton, D.R., Silver, I.A., Hunt, T.K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* **90**, 262–70 (1981).