

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10688

研究課題名(和文)片肺全摘後の代償性肺再生における骨髄由来VEGFR1陽性幹細胞の役割

研究課題名(英文)The role of vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling in compensatory contralateral lung growth following unilateral pneumonectomy.

研究代表者

松井 啓夫 (Matsui, Yoshio)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：00365123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺組織の成長因子の一つである血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)に着目し、片肺全摘モデルを用いて代償性肺再生におけるVEGF receptor 1 (VEGFR1) シグナルの役割について検討した。左肺全摘後、残存右肺重量は野生型マウスと比較し、VEGF過剰発現マウスで有意に増加を認め、VEGFR1チロシンキナーゼ欠損マウスでは抑制された。また、骨髄移植実験よりVEGFR1チロシンキナーゼシグナルが再生肺に骨髄細胞を動員し、さらにそれが肺胞上皮の分化に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

片肺摘出の刺激によりVEGFR1チロシンキナーゼシグナルが骨髄組織のストローマ因子を活性化させ、骨髄組織からVEGFR1陽性細胞が動員され肺に集積しVEGFの産生を促すことで肺の代償性再生を増強している可能性が示唆された。本研究の成果は、骨髄由来のVEGFR-1発現細胞の気管内もしくは静脈内投与が、肺再生に関する新たな治療法になり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors promote lung regeneration. The present study was to examine the role of VEGF receptor 1 (VEGFR1) signaling in lung regeneration after pneumonectomy. After left pneumonectomy, the right lung weight was higher in VEGF transgenic mice than wild-type (WT) mice and was suppressed significantly in mice injected with a VEGF neutralizing antibody and in VEGF receptor-1 tyrosine kinase-deficient mice (TK-/- mice). The mobilization of progenitor cells expressing VEGFR1+ cells from bone marrow and the recruitment of these cells to lung tissue were also suppressed in the TK-/- mice. WT mice transplanted with bone marrow from TK-/- transgenic GFP+ mice had significantly lower numbers of GFP+/aquaporin 5+, GFP+/surfactant protein A+, and GFP+/VEGFR1+ cells than WT mice transplanted with bone marrow from WTGFP+ mice. Overall, these results suggest that VEGF signaling contributes to compensatory lung growth by mobilizing VEGFR1+ cells.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺再生 VEGF VEGFR1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来に伴い手術患者において低肺機能、特に慢性閉塞性肺疾患(COPD)を合併する患者が多い。COPDの主病態である肺気腫は、肺泡の破壊と消失を特徴とし、やがて呼吸不全に至る疾患である。現在、COPDの患者に対しては、消失したガス交換能を回復する確立した方法はないため在宅酸素療法即ち対症療法が中心であり、肺胞壁の再生を目標とした治療法の確立が期待されている。近年、骨髄細胞がさまざまな細胞に分化するという多分化能を有することが報告され、肺の構築にも骨髄由来細胞が関与していることが報告された。血管新生促進因子の一つである血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)が代償性肺再生を促進させることが報告されたが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで申請者は、肺切除後の代償性肺再生において、(1)VEGF及びどの受容体が関与するか(2)再生肺における骨髄由来細胞の役割について検討した。

### 2. 研究の目的

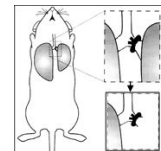
近年、肺癌根治手術は手術手技の改良、麻酔技術の進歩により、術後呼吸不全に至る症例が少なくなってきた。しかし、術後の肺容量に伴う呼吸機能の低下は依然として認められている。現在、術後低肺機能患者の治療に対し確立された有効な治療方法はなく在宅酸素療法を初めとする対症療法が中心であるため、肺胞壁ならびに肺血管床の再生を目標とした新規治療法の確立が期待されている。そこで申請者は、肺組織の成長因子の一つである血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)に着目し、片肺全摘モデルを用いて代償性肺再生におけるVEGF及びその受容体の役割について以下の研究で明らかにすることにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 代償性肺再生の過程におけるVEGFの発現効果の検討

##### 片肺全摘モデルの作製

麻酔下で気管内挿管後、第4肋間を開胸し左肺門部を一塊に結紮・切離し左肺を摘出する。sham手術は、上記と同様に麻酔後、開胸して左肺をとらずに閉胸する。



##### 代償性肺再生の評価

片肺全摘モデル作製後、経時的に麻酔薬過剰投与後、残存右肺を摘出し、肺重量を測定。

##### VEGF-A過剰発現マウス(ATg)における残存右肺重量の検討

VEGF-ATgとWT(Balb/c)を用いて片肺全摘モデル作製後、1,2,3,5,7,14,21,28日目に肺を摘出し、残存右肺重量を測定し比較検討する。

##### 抗VEGF中和抗体投与による残存右肺重量変化の検討

片肺全摘モデル作製後、抗VEGF中和抗体投与群、対照群において7,14日目に肺を摘出し、残存右肺重量を測定し比較検討する。

#### (2) VEGFのどの受容体が最も代償性肺再生に関与しているかの検討

##### 残存右肺組織中における各VEGF受容体のmRNA発現の検討

片肺全摘モデル作製後、0,7,14日目に残存右肺を摘出し、定量的PCRを用いて残存肺におけるVEGF受容体1-3型のmRNA発現を測定する。

##### VEGFR1-TKK0における残存右肺重量の検討

VEGFR1-TKK0とWTを用いて片肺全摘モデル作製後、1,2,3,5,7,14,21,28日目に肺を摘出し、残存右肺重量を測定し比較検討する。

##### VEGFR2チロシンキナーゼ阻害剤投与による残存右肺重量、肺胞面積の検討

片肺全摘モデル作製後、VEGFR2チロシンキナーゼ阻害剤投与群、対照群において7,14日目に残存右肺重量を測定し比較検討する。

- (3) 代償性肺再生に骨髄細胞が関与していることを証明するため WT 及び VEGFR1-TK の GFP (Green Fluorescent Protein) 過剰発現マウスの骨髄細胞をそれぞれ WT に移植することで肺再生に骨髄細胞が関与しているか否か検討を行う。

VEGFR1-TKKO-GFP及びWT-GFPの骨髄移植による残存右肺重量、肺胞面積の検討

WT マウスに放射線を照射し骨髄機能を低下させ、WT-GFP 及び VEGFR1-TKKO-GFP の骨髄細胞 ( $1.0 \times 10^7$  個) を静脈注射し骨髄移植を行う (VEGFR1-TKKO-GFP WT 及び WT-GFP WT)。約 8 週間後にフローサイトメトリーでキメラ率を確認後、片肺全摘モデルを作製する。術後 7, 14 日目に残存肺を摘出し、残存右肺重量を測定する。

残存肺組織で集積されたGFP陽性細胞の解析

残存肺組織に集積された GFP 陽性細胞数が VEGFR1-TKKO-GFP WT 及び WT-GFP WT で差があるかを検討する。次に GFP 陽性細胞が VEGFR1、肺胞上皮細胞 (I 型: Aquaporin=AQA, II 型: Surfactant A=SPA) に陽性か否か蛍光免疫組織染色にて検討する。

4. 研究成果

- (1) 代償性肺再生の過程における VEGF の発現効果の検討

代償性肺再生を確認するため、7-9 週雄性の C57Bl/6 (=WT) に対し左肺全摘を施行した群 (PNX 群) と開閉胸のみの sham 群における残存肺重量を測定したところ PNX 群で sham 群と比較し有意に増加を認めた (Fig.1)。VEGF の代償性肺再生の関与を明らかにするため、VEGF 過剰発現マウス (=ATg) を用いて肺全摘後の残存肺重量を測定し WT と比較して有意な増加を認めた (Fig.2)。その代償性肺再生は VEGF 中和抗体を投与すると対象群に比べ、有意に抑制効果を認めた (Fig.3)。以上より内因性の VEGF シグナルが代償性肺再生に関与していることが明らかとなった。

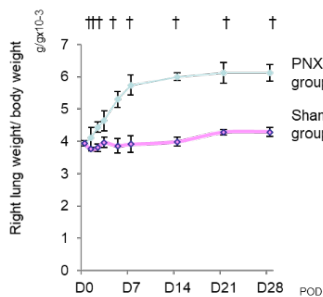


Fig.1

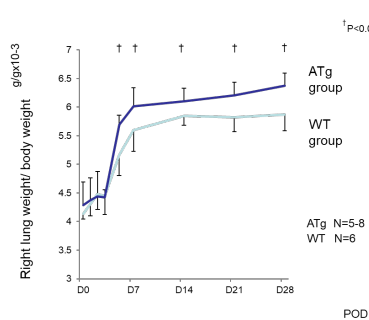


Fig.2

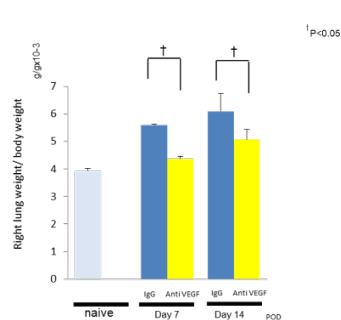


Fig.3

- (2) VEGF のどの受容体が最も代償性肺再生に関与しているか？

代償性肺再生は VEGF 受容体 1-3 のどの受容体に関与するか定量的 PCR で検討した。他の受容体と比較し VEGFR-1 発現が有意に高値であることから代償性肺再生において VEGFR1 シグナルが関与していることが推測された (Fig.4)。そこで VEGFR-1 シグナルの関与をみるため、VEGFR-1 チロシンキナーゼノックアウトマウス (=TKKO) を用い肺全摘後の残存肺重量を WT と比較したところ有意に残存肺重量の低下を認めた (Fig.5)。さらに、肺全摘後、VEGFR2 チロシンキナーゼインヒビター投与後の残存肺重量を測定したところ、対照群と差はなかった (Fig.6)。以上より、代償性肺再生には、VEGFR-1 シグナルが重要であることが示唆された。

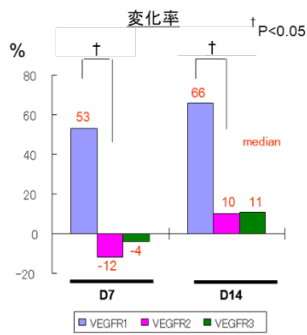


Fig.4

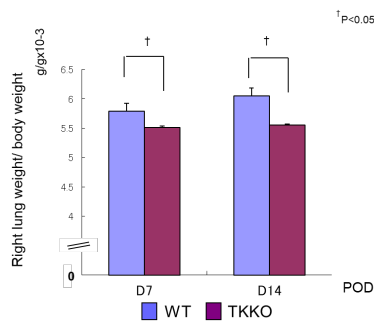


Fig5

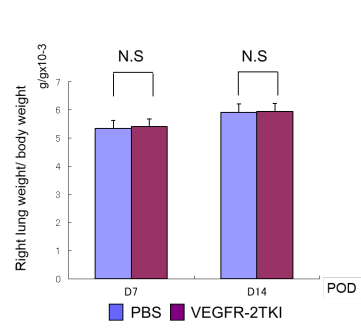


Fig.6

(3) 代償性肺再生に骨髄細胞が関与しているか否か検討を行う。

WTと比較しTKKOを移植したマウスでは有意に残存右肺重量の抑制を認めた(Fig.7)。さらに、摘出肺を蛍光顕微鏡で観察したところ、WTはTKKOと比較し肺胞へのGFP陽性細胞の組み込みの増加を認めた(Fig.8, 9)。それらGFP陽性細胞はGFP<sup>+</sup>/TTF1<sup>+</sup>、GFP<sup>+</sup>/SPA<sup>+</sup>のdouble positiveの所見を認め骨髄細胞が肺胞上皮に分化した可能性が示唆された(Fig.10)。さらに、VEGFR1で染色を行ったところ、GFP<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>細胞を認め、TKではその数が減少していた。そして、GFP、VEGFR1、SPAの三重染色を行ったところトリプルポジティブの陽性細胞を認め、骨髄由来のVEGFR1<sup>+</sup>細胞がⅡ型肺胞上皮へ分化した可能性が示唆された(Fig.11)。

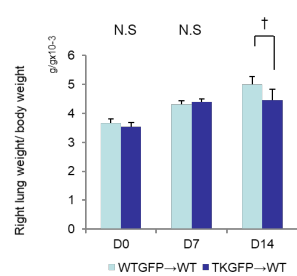


Fig.7

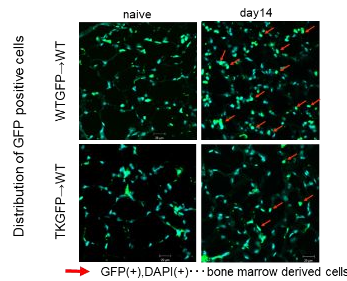


Fig.8

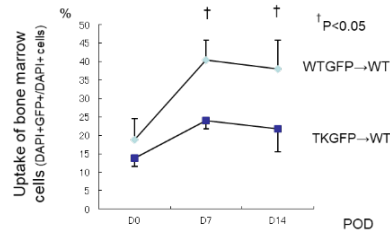


Fig.9

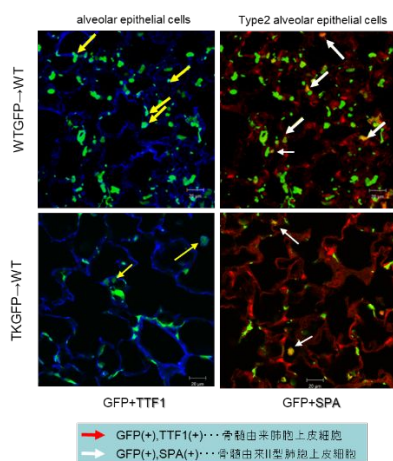


Fig.10

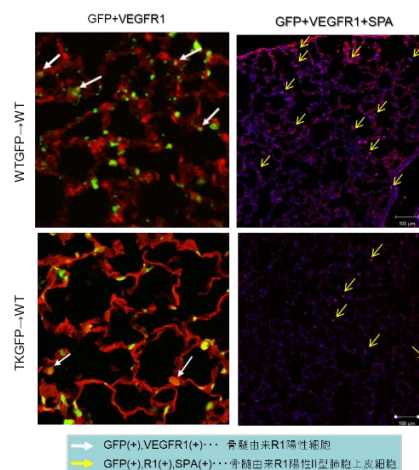


Fig.11

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Betto T, Amano H, Ito Y, Eshima K, Yoshida T, Matsui Y, Yamane S, Inoue T, Otaka F, Kobayashi K, Koizumi W, Shibuya M, Majima M. Vascular endothelial growth factor

receptor 1 tyrosine kinase signaling facilitates healing of DSS-induced colitis by accumulation of Tregs in ulcer area. Biomed Pharmacother, 2018 Dec, 19;111:131-141. 査読有 doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.021.

Park K, Amano H, Ito Y, Matsui Y, Kamata M, Yamazaki Y, Takeda A, Shibuya M, Majima M. Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) tyrosine kinase signaling facilitates granulation tissue formation with recruitment of VEGFR1+ cells from bone marrow. Anat Sci Int., 2018 Jun; 93(3): 372-383. 査読有 doi: 10.1007/s12565-017-0424-8.

〔学会発表〕(計2件)

Amano H, Matsui Y, Shibuya M, Majima M. VEGFR1-TK Signaling Induces Pulmonary Fibrosis Formation Through SDF-1/CXCR7/CXCR4 Axis. 2018年, ATS, San Diego

Amano H, Matsui Y, Takahashi R, Shibuya M, Majima M. VEGFR1 Tyrosine Kinase Signaling Activates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. 2017年, ATS, Washington DC

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：天野 英樹

ローマ字氏名：(AMANO, Hideki)

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60296481

研究分担者氏名：江島 耕二

ローマ字氏名:( ESHIMA, Koji )

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30327324

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。