

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16968

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎におけるVEGFR1-TKシグナルの潰瘍修復メカニズムの解析

研究課題名（英文）Role of VEGFR1 signaling in mucosal repair after ulcerative colitis

研究代表者

別當 朋広（BETTO, TOMOHIRO）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：40623202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：潰瘍性大腸炎モデルにおける大腸粘膜修復過程においてVEGFR1シグナルの役割を調べた。DSS誘導腸炎における粘膜修復はVEGFR1シグナルに依存していた。そのメカニズムは、修復粘膜組織にVEGFR1陽性CXCR4陽性Treg細胞がSDF-1/CXCR4経路を介して集積し、血管新生促進因子TGF- $\beta$ を産生することで血管新生を誘導して粘膜修復を促進することが示された。VEGFR1シグナルは潰瘍性大腸炎を軽減し粘膜修復を促進する治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
潰瘍性大腸炎の粘膜修復制御機構はこれまで十分理解されていなかった。本研究ではVEGFR1シグナルがSDF-1/CXCR4経路を介してTreg集積を誘導し、血管新生を促進することで粘膜修復を増強するという新規のメカニズムを明らかにすることができた。TregにおけるVEGFR1シグナル活性化を標的とした新しい潰瘍性大腸炎寛解療法に結びつく可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The present study was to examine the role of VEGFR1 signaling in the colonic mucosal repair in a mouse model of ulcerative colitis. The mucosal repair in DSS-induced colitis was dependent on VEGFR1 signaling. The repair was induced by accumulation of VEGFR1+/CXCR4+ Tregs in the injured regions, promoting angiogenesis by producing TGF  $\beta$ . The accumulation of Tregs was mediated by SDF-1/CXCR4 pathway. These results suggest that VEGFR1 signaling may be a potential therapeutic target to alleviate ulcerative colitis and promote mucosal repair.

研究分野：消化器

キーワード：潰瘍性大腸炎 VEGF Treg

## 1. 研究開始当初の背景

日本では衛生環境が改善され、食生活が欧米化となって以降、潰瘍性大腸炎の患者数の増加傾向を認める。腹痛、下痢、下血、発熱などの炎症症状が持続することや、重症化すると長期にわたる入院治療が必要になる場合があるなど患者の QOL に直接的に影響を与えている。このため慢性炎症性腸疾患に対する有効性のある治療の開発が望まれている。胃粘膜および腸管粘膜の傷害から修復する際に血管新生は不可欠である。血管新生は既存の血管から新生血管が形成される一連の生体反応である。血管新生促進因子の一つである VEGF は VEGF 受容体(VEGFR)に結合し作用を惹起する。VEGF には 1 型から 3 型までの受容体サブタイプ(VEGFR1~3)があり、VEGF が受容体チロシンキナーゼ(Tyrosine Kinase:TK)に結合し活性化される。VEGFR1, 2 シグナルは主に血管新生に、VEGFR3 シグナルは、リンパ管新生に寄与する。

これまで我々は、胃潰瘍モデルや創傷治癒モデルを用いて胃潰瘍や皮膚潰瘍の修復過程には血管新生が不可欠であり、その際 VEGF/VEGFR1 シグナル経路が重要な役割を担っていることを見いだしている。このときの修復部位には新生血管周囲にマクロファージをはじめとする様々な免疫細胞が集積することと、これら集積免疫細胞のなかでもマクロファージが VEGFR1 シグナルを介して血管新生に関与することが分かってきた。最近、進行癌組織の新生血管周囲に自己組織の攻撃を行わないいわゆる免疫寛容に関与する制御性 T 細胞(Regulatory T cell: Treg)が浸潤し、Treg 集積と血管新生が患者予後と関連性があると報告された(Terme et al, CancerRes 2013)。さらに我々も先行研究として創傷治癒モデルにて新生血管周囲に Treg の集積を認め、血管新生と Treg との関連性を見いだした(Inoue et al, Kitasato Med 2018)。これらの研究背景から、潰瘍性大腸炎モデルを用いて潰瘍性大腸炎の改善に VEGFR1 と Treg が関与しているのかどうかを明らかにすることを目的として本研究をおこなうこととした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は 2% Dextran Sodium Sulfate (DSS)誘導による潰瘍性大腸炎モデルを用いて腸管粘膜再生における VEGF 及びその受容体である VEGFR1 の役割を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

実験動物には 8 週令の雄性野生型マウス(WT)C57BL/6 マウスと VEGFR1TK ノックアウトマウス(TKK0)を用いた。2%Dextran Sodium Sulfate (DSS)希釈液を 7 日間経口投与後、次の 7 日間は蒸留水に交換し、大腸炎の急性期モデルを作成した。経時的に大腸長と Disease Activity Index Score (DAI Score: 体重変化、排便の固さ、血便の有無で score 化する)を評価した。摘出した結腸組織は組織染色、定量的リアルタイム PCR などで蛋白や遺伝子解析をおこなった。すなわちヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的スコア化(炎症程度、腺窩損傷程度など)して比較検討する。血管新生は免疫組織染色で抗 CD31 抗体染色をおこない、陽性細胞数をカウントした。また CD31 発現を PCR で測定した。Treg 集積を Treg マーカーであり転写因子である FoxP3 の遺伝子発現と蛋白発現を PCR と免疫染色で解析した。Treg 集積の関与を抗 CD25 中和抗

体(250  $\mu$ g/マウス)を Day7, Day11 に腹腔内投与した。さらに抗 FR4 抗体(50  $\mu$ g/マウス)を Day7 に腹腔内投与した。また VEGFR1 陽性細胞集積に関与するケモカイン SDF-1 とその受容 CXCR4 の関与を調べるために CXCR4 抗体(10  $\mu$ g/マウス)を Day7 から隔日投与した。またコントロールとし Control IgG を同量投与した。細胞遊走能を調べるために Transwell migration assay をおこなった。集積する免疫細胞が骨髄由来かどうかを調べるために骨髄キメラマウスを作成し DSS を上述の通り投与した。血液中の VEGFR1 陽性細胞を検出するためにフローサイトメトリー解析をおこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) TKKO マウスでは DSS 腸炎の粘膜修復が遅延した

DSS 腸炎の粘膜修復期における VEGF/VEGFR1 シグナルの関与を調べるために、結腸における VEGF と VEGFR1 の発現を解析した。PCR では結腸内 VEGF 発現は Day3 から Day7 にかけて低下したが、その後回復し、

修復期での発現がみられた。血管新生に関与する VEGF 受容体 VEGFR1 と VEGFR2 も同様の变化であったが、VEGFR1 のほうが VEGFR2 よりも早期に回復レベルまで戻り、VEGFR1 の修復早期での関与が示唆された。結腸長は WT と比較して TKKO で有意に結腸長の短縮を認めた(図 1)。

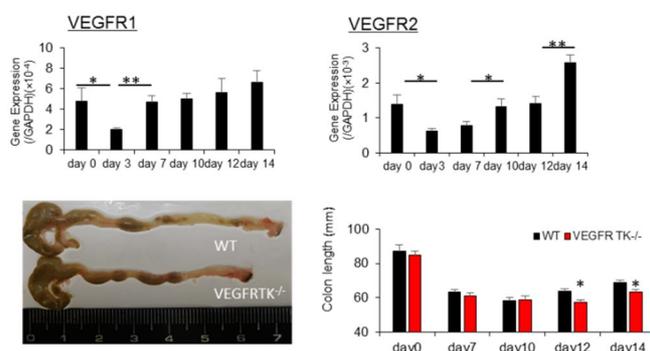


図1. VEGFR1シグナルのDSS腸炎における関与

DSS 腸炎によって形成される潰瘍は WT より早期に修復された。炎症粘膜における、血管内皮細胞のマーカーである CD31 や損傷治癒に必須である Epidermal Growth Factor (EGF) の mRNA 発現量が TKKO にて有意な減少を認めた。また、炎症大腸粘膜において CD31 抗体を用いて免疫染色を施行し新生血管数を評価すると TKKO では WT に比較して有意な減少を認めた。これらの結果から TKKO では有意な大腸短縮やまた病理学組織学的に潰瘍の残存、新生血管の減少をみとめ、大腸粘膜修復の遅延が示唆された。

##### (2) 粘膜修復過程における VEGFR1 陽性細胞の関与

VEGFR1 シグナルの関与が示唆されたので、VEGFR1 陽性細胞の結腸組織内における集積を免疫染色でしらべた。Day7 と Day14 の VEGFR1 陽性細胞数は WT よりも TKKO で減少した。また WT, TKKO の末梢血中の VEGFR1 陽性細胞数をフローサイトメトリーにて比較したところ、TKKO で有意な減少を認めた。さらに VEGFR1 陽性細胞が EGF を産生する可能性を免疫染色で調べた。その結果、Day14 の結腸組織内における VEGFR1 陽性かつ EGF 陽性細胞数は WT で増加しており、TKKO では二重陽性細胞数は減少した。

これまで我々は VEGFR1 陽性細胞(マクロファージ)は CXCR4 を発現して、炎症部位に集積することを虚血肢モデルや肺炎モデルで報告してきた。そこで炎症結腸組織における VEGFR1 陽性細胞は CXCR4 を発現する細胞なのかどうかを蛋白発現レベルで解析

した。すると、CXCR4+/VEGFR1+細胞はWTの結腸組織内に多数みられたが、TKKKOでは減少した。また末梢血液中のCXCR4+/VEGFR1+細胞がWTよりもTKKKOで低値をしめすことをフローサイトメトリー解析で確認した。さらにVEGFR1陽性細胞が骨髄由来であるかどうか、また骨髄由来細胞はVEGFR1シグナルに依存してDSS腸炎を制御するかどうかを骨髄キメラマウスを作成して調べた。その結果TKKOの骨髄を移植したWTではWTの骨髄を移植したWTと比較して結腸長の短縮を認め、炎症粘膜における骨髄由来のVEGFR1+EGF+細胞数、VEGFR1+CXCR4+細胞数が有意に減少した。これらの結果から、VEGFR1シグナリングは骨髄由来のVEGFR1+EGF+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血管新生、及び粘膜修復に関連することが示唆された。以上をまとめるとVEGFR1シグナルはVEGFR1陽性細胞を動員して血管新生を促進してDSS腸炎における粘膜修復に寄与する可能性があることが示唆された。

### (3) DSS腸炎におけるTregの関与

次にDSS誘導腸炎による粘膜修復におけるTregの関与について検討した。炎症の遷延の有無を評価するため、まず炎症大腸粘膜における炎症抑制サイトカインTGF-とIL-10のRNA発現量をWTとTKKOで比較したところ、TKKOにおいてこれら炎症抑制サイトカインの発現低下を認めた。特にTGF-については大腸炎発症早期から7日目まで経過全体を通じてTKKOで抑制された。

TGF-はTregから産生されて血管新生に関与する可能性があるために、Treg集積を調べた。Treg転写因子であるForkhead box protein p3(Foxp3)の炎症大腸粘膜での発現量を比較したところ、WTで有意に発現した(図2)。また、Foxp3抗体を用いて炎症粘膜を免疫染色し細胞個数を比較すると、TKKOで有意なFoxp3陽性細胞の低下を認め

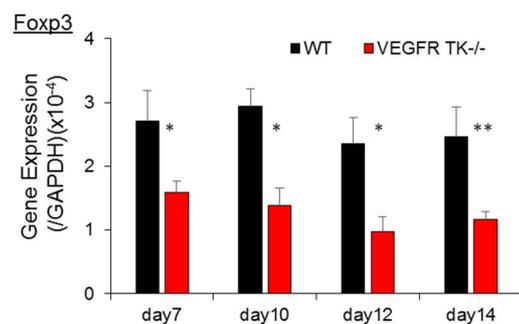


図2. Foxp3の結腸組織内発現

た。さらにVEGFR1抗体を用いてFoxp3抗体と2重染色を行い、共発現(VEGFR1+/Foxp3+)する細胞数を比較したところ、TKKOで有意な低下をみとめた。以上からFoxp3陽性細胞(Treg)はVEGFR1シグナルにより炎症局所へ動員される可能性が示唆された。

さらにTregの腸炎修復の制御機構を明らかにするために血管新生因子TGF-がTregから産生されているかどうかを調べた。免疫二重染色でTregマーカーであるFoxp3とTGF-を染色すると、TregとTGF-は共発現した。また二重陽性細胞数はWTよりもTKKOで減少した。Tregが腸炎修復に関与するかをさらに明らかにするために、Treg機能を抑制またはTreg細胞数を減少させるために抗CD25中和抗体または抗FR4中和抗体をDSS腸炎誘導後に腹腔内投与した。その結果、結腸長は短縮し、生存率も低下したことからTregはDSS腸炎の修復に関与する可能性が示唆された。

次にTreg集積のメカニズムを調べた。TregはCXCR4を発現することが知られている。またCXCR4のリガンドはSDF-1である。そこで結腸組織内のSDF-1とCXCR4発現を検討した。その結果、Day10, Day12, Day14でSDF-1, CXCR4発現はTKKOよりWTで増強し

た。さらに Treg が CXCR4 を発現することを免疫二重染色で確認するとともに、二重陽性細胞 (CXCR4+/Foxp3+) 数は WT よりも TKKO で減少した。そこで、CXCR4 中和抗体を投与して Treg 集積を阻害すると、炎症組織に集積する Foxp3 と TGF- $\beta$  発現が VEGFR1 シグナルに依存して減少した。この結果から、VEGFR1 シグナルによって Treg が結腸組織に SDF-1/CXCR4 を介して集積し、TGF- $\beta$  を産生して血管新生を促進して粘膜修復を促進する可能性が示唆された。さらに CXCR4 を発現する Treg が VEGFR1 をも発現するかどうかを免疫染色で検討すると、CXCR4+/Foxp3+/VEGFR1+ の 3 重陽性細胞が検出され、この陽性細胞数は TKKO が WT よりも定値であった。最後に Treg が SDF-1 によって遊走するかどうかを、胸腺から CD4+CD25+Treg 細胞を回収して Transwell で遊走能を解析した。その結果、SDF-1 による遊走は WT よりも TKKO で抑制された。

以上の実験結果から、VEGFR1 シグナルは VEGFR1 陽性 Foxp3 陽性 Treg を炎症組織に動員させ粘膜修復に関わることが示された。また Treg は SDF-1/CXCR4 経路を介して炎症結腸粘膜組織に集積することが分かった。さらに粘膜修復には Treg から産生される TGF- $\beta$  が血管新生を誘導することが関与していることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamane S, Amano H, Ito Y, Betto T, Matsui Y, Koizumi W, Narumiya S, Majima M	4. 巻 103
2. 論文標題 The role of thromboxane prostanoid receptor signaling in gastric ulcer healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Exp Pathol	6. 最初と最後の頁 4-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iep.12410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 別當朋広、小林清典、伊藤隆士、金澤 潤、川岸 加奈、横山 薫、佐田美和、草野央
2. 発表標題 早期大腸癌の超音波内視鏡診断における描出困難病変についての検討
3. 学会等名 第103回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 洋平、横山 薫、金澤 潤、別當 朋広、川岸 加奈、佐田 美和、小林 清典、小泉 和二郎、高橋 博之
2. 発表標題 炎症性腸疾患 (IBD) 非典型例からMEFV遺伝子関連腸炎の診断をえた3例
3. 学会等名 第63回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------