

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21689047

研究課題名（和文） 創傷治癒血管新生の「質」を規定するメカニズムの解析

研究課題名（英文） Regulatory Mechanisms for the quality of wound angiogenesis

研究代表者

久保田 義頭 (KUBOTA YOSHIKI)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：50348687

研究成果の概要（和文）：

血管の密度、つまり血管の「量」そのものは組織への酸素運搬能という血管本来の機能、即ち血管の「質」と関連しないことがわかりつつある。本研究は皮膚創傷組織において、この血管の「質」を規定する分子メカニズムを明らかにするために行われた。申請者は創傷組織のホールマウント血管染色技術を新たに確立し、そのダイナミクスの観察を可能にした。これにより血管増生よりむしろ血管の拡張が、その「質」を規定する主要な因子であることを見出した。また、種々の遺伝子改変マウスの解析により、貪食細胞の一つとして知られるマクロファージが血管の拡張、ひいては血流の増大に密接に関与することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Recently it was recognized that vascular density (vascular “quantity”) does not necessarily correlate with oxygen delivery (vascular “quality”) to tissues. This study was performed to uncover the mechanism which determines the vascular quality. The group of the applicant established a novel technology visualizing the vasculature in whole-mount tissues of cutaneous wounds, and succeeded in observing vascular dynamics in the process of wound healing. In analysis of several lines of genetically engineered mice by fully exploiting this technology, we noticed that vaso-dilation rather than angiogenesis mainly affect the vascular quality. Moreover, we found tissue macrophages significantly contribute to this vascular change.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	21,200,000	6,360,000	27,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、血管、マクロファージ、形態学

1. 研究開始当初の背景

血管から供給される酸素・栄養は哺乳類におけるほぼ全ての組織の恒常性維持に不可欠である。また創傷治癒において組織が修復される際、血管構築のリモデリングによる適

切な血行動態の変化が必要であり、糖尿病、動脈硬化など何らかの原因でこの血管の機能が不十分であると、創傷治癒に障害をきたすことが知られている。

2. 研究の目的

発生期の血管形成において血管密度、つまり血管の「量」そのものは、組織への酸素運搬能という血管本来の機能、即ち血管の「質」と相関しないことが明らかにされている。本研究はこの創傷血管の「質」を規定するメカニズムに関して分子生物学的解析を行うことにより、従来より血管の「量」の増生に主眼が置かれてきた創傷医療を向上させる基礎的な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

申請者の確立した組織ホルマウント血管染色技術を駆使し、マウス背部皮膚創傷血管を解剖学的に観察、その血管ネットワーク変化のダイナミクスを詳細に解析する。さらには、当研究室の開発した種々の遺伝子改変マウスの交配、および国内外の研究室との共同研究により、その分子生物学的バックグラウンドを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 申請者のグループはこれまで様々な試行錯誤を繰り返し、成獣マウスのあらゆる組織を切片にすることなく、ホルマウントでコンフォーカル顕微鏡下に可視化することに成功している (Kubota et al. *J Exp Med* 2011)。また、正常組織だけでなく、腫瘍や網膜血管新生病、創傷組織における血管網も、ホルマウントで可視化する技術を確立した (Okuno et al. *Nat Med* 2012) (図 1)。

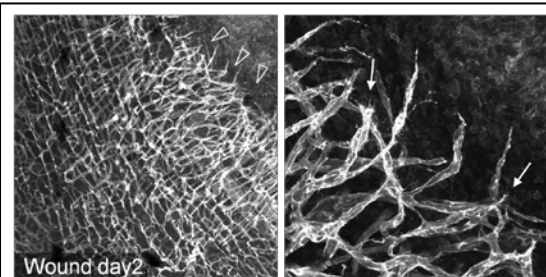


図 1. マウス背部皮膚創傷ホルマウント血管染色

背部皮膚に創傷作成 2 日後、ホルマウントで CD31 染色したコンフォーカル画像。創縁にむけて血管が伸び (左図矢頭)、その最前部では血管 Tip 細胞が糸状突起をのぼす (右図矢印)。

(2) これまで確認し得た事象として、創部に向かって創周囲の残存血管が走行自体を変化させること、創縁の血管最前部では、発生期網膜血管で観察されるような血管 Tip 細胞の存在が観察される。しかしながら、その血管 Tip 細胞の糸状突起の数は、正常の血管発生や腫瘍血管新生と比べて明らかに少なく、殆どが単なる blunt end となっており、そこか

ら新たな分枝が行われる様子は呈していなかった。全体として分枝の増加は明らかではないものの、明確な血管径の増大、さらには血流の増加が認められた。以上の知見は、創傷における血管リモデリングのダイナミクスは、血管新生ではなく、血管拡張による血流増加がメインであることを示唆している。

(3) この創部血流増加に関し、組織マクロファージの細胞外マトリックスリモデリングが密接にかかわっていることも判明している (Okuno et al. *Blood* 2011; Kubota et al. *J Exp Med* 2009)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

全て査読有。*corresponding author

1. Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Otsu K, Suda T and *Kubota Y. Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. *Nat Med* 18(8): 1208–1216, 2012. [pubmed/22797809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22797809/)
http://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2012/kr7a4300000artgk.html
2. *Kubota Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Keio J Med*. 61(2): 47-56, 2012 (invited review). [pubmed/22760023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22760023/)
3. Nakamura-Ishizu A, Kurihara T, Okuno Y, Ozawa Y, Kishi K, Goda N, Tsubota K, Okano H, Suda T and *Kubota Y. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1-dependent manner. *Dev Biol* 363(1): 106-14, 2012. [pubmed22226979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22226979/)
4. Takase H, Matsumoto K, Yamadera R, Kubota Y, Otsu A, Suzuki R, Ishitobi H, Mochizuki H, Kojima T, Takano S, Uchida K, Takahashi S, and *Ema M. Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo *Blood* 120(4): 914-23. 2012. [pubmed/22535667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22535667/)
5. Nakamura-Ishizu A, Okuno Y, Omatsu Y, Okabe K, Morimoto J, Uede T, Nagasawa T, Suda T and *Kubota Y. Extracellular matrix protein Tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* 119(23): 5429-5437, 2012. [pubmed/22553313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22553313/)
6. *Kubota Y, Takubo K, Hirashima M, Nagoshi N, Kishi K, Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Sano K, Murakami M, Ema M, Omatsu Y, Takahashi S, Nagasawa

- T, Shibuya M, Okano H and *Suda T. Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. *J Exp Med* 208(5): 949-60, 2011. [pubmed/22797809](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797809)
http://www.keio.ac.jp/press_release/2011/kr7a43000006851b-att/110511_2.pdf
7. Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Kishi K, Suda T and ***Kubota Y**. Bone marrow-derived cells serve as pro-angiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood* 117(19): 5264-72, 2011. [pubmed21411758](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411758)
 8. Shimizu R, Okabe K, **Kubota Y**, Nakamura-Ishizu A, Nakajima H and *Kishi K. Sphere formation restores and confers hair-inducing capacity in cultured mesenchymal cells. *Exp Dermatol* 20(8): 679-81, 2011. [pubmed21521371](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21521371)
 9. ***Kubota Y** and Suda T. Vascularity of nongynecological leiomyosarcoma depends on colony-stimulating factor 1 but not on vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol* 179(4): 1591-3, 2011. [pubmed21839060](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839060)
 10. Kurihara T, **Kubota Y** (equally first author), Ozawa Y, Takubo K, Noda K, Simon MC, Johnson RS, Suematsu M, Tsubota K, Ishida S, Goda N, *Suda T and *Okano H. von Hippel-Lindau protein regulates transition from fetal to adult circulatory system in retina. *Development* 137: 1563-1571, 2010. [pubmed20388654](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388654)
 11. *Iwasaki H, Arai F, **Kubota Y**, Dahl M and *Suda T. Endothelial protein C receptor-expressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver. *Blood* 116(4): 544-53, 2010. [pubmed20442369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442369)
 12. *Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, **Kubota Y**, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, *Suda T. Regulation of the HIF-1alpha Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7(3): 391-402, 2010. [pubmed20804974](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804974)
 13. ***Kubota Y**, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H and *Suda T. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med* 206: 1089-102, 2009. [pubmed19398755](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398755)
 14. ***Kubota Y** and *Suda T. Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 19: 38-43, 2009 (invited review). [pubmed19577710](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577710)
 15. Morikawa S, Mabuchi Y, **Kubota Y**, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H and *Matsuzaki Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206: 2483-96, 2009. [pubmed19841085](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841085)
- 〔学会発表〕 (計 29 件)
1. 久保田義顕：腫瘍血管特異的分子メカニズムの解明；千葉大学 G-COE セミナー (千葉 2012 年 12 月 17 日) (招待講演)。
 2. 久保田義顕：Atm function in angiogenesis；第 35 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「ATM ファミリーキナーゼの多様な制御機構と組織・動物種特異的な役割」(福岡 2012 年 12 月 11-14 日) (招待講演)。
 3. Kubota Y. Neuroretinal regulation of vascular patterning. **Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012**. 12-13 November, 2012, 奈良県新公会堂 (招待講演)。
 4. Kubota Y. Oxidative stress in pathological angiogenesis. *Special Seminar in Biomedicum Helsinki*. 24 October, 2012, Biomedicum Helsinki, Helsinki, Finland (Invited speaker).
 5. Kubota Y. Tumor angiogenesis and oxidative stress. *Joint JSPS-Karolinska Institute (KI) Symposium*. 23 October, 2012, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden (Invited speaker).
 6. 久保田義顕：マウス毛乳頭血管発生のメカニズム；第 2 回細胞再生医療研究会(神戸 2012 年 7 月 29 日) (招待講演)。
 7. 久保田義顕：抗腫瘍血管新生療法の新規標的；Beyond VEGF blockade 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 (東京 2012 年 7 月 19-21 日) (招待講演)。
 8. 久保田義顕：血管パターンニング制御機構と腫瘍血管新生。第 39 回 NIH 金曜会 (Bethesda 2012 年 6 月 1 日) (招待講演)。
 9. Kubota Y. Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. *Mini Seminar in the Scripps Institute*. 12 March, 2012, San Diego, CA (Invited speaker).
 10. 久保田義顕：Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. 第 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ「Dynamic linkage of vascular system and organ functions - novel roles of blood vessels in health and

- disease」(横浜 2011 年 12 月 13-15 日)
(招待講演)。
11. 久保田義顕：抗腫瘍血管新生療法の新規標的の探索; Beyond VEGF blockade 第 42 回 ニューロ・オンコロジーの会 (東京 2011 年 12 月 3 日) (招待講演)。
 12. Kubota Y. Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. *The Second Pacific Symposium on Vascular Biology*. 30 October-2 November, 2011, Jeju, Korea (Invited speaker).
 13. 久保田義顕、貴志和生：形成外科と免疫組織学的解析 第 20 回日本形成外科基礎学術集会 (東京 2011 年 10 月 6 日) (招待講演)。
 14. Kubota Y. ATM drives pathological angiogenesis by suppressing oxidative stress. *9th Japan-Korea vascular biology symposium*. 25-26 August, 2011, Busan, Korea (Invited speaker).
 15. 久保田義顕：Postnatal tissue-resident vascular precursor cells marked by myelin protein zero. 新学術領域「血管—神経ワイヤリングにおける相互依存性の成立機構」班会議 (熊本 2011 年 8 月 18-20 日) (招待講演)。
 16. 久保田義顕：Role of Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in angiogenesis. 第 7 回 Aso International Meeting (熊本 2011 年 7 月 29-31 日) (招待講演)。
 17. Kubota Y. ATM-mediated suppression of oxidative stress is required for pathological neovascular expansion. *8th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells*. 15-18 June, 2011, Zurich, Switzerland (Oral presentation).
 18. 久保田義顕：抗腫瘍血管新生療法の新規標的の探索 第 80 回北里記念式 北里賞受賞講演 (東京 2011 年 6 月 10 日) (招待講演)。
 19. 久保田義顕：マクロファージのリンパ管新生における役割 第 35 回日本リンパ学会総会 (東京 2011 年 6 月 3-5 日) (招待講演)。
 20. 久保田義顕、貴志和生：マクロファージを標的としたリンパ浮腫治療戦略 第 54 回日本形成外科学会総会・学術集会 (徳島 2011 年 4 月 13-15 日) (一般講演)。
 21. 久保田義顕：ATM-mediated suppression of oxidative stress is required for pathological neovascular expansion 新学術領域「血管—神経ワイヤリングにおける相互依存性の成立機構」班会議 (神戸 2011 年 1 月 18 日) (招待講演)。
 22. 久保田義顕：Role of macrophages in angiogenesis and lymphangiogenesis. 第 18 回 日本血管生物医学学会学術集会 (大阪 2010 年 12 月 1-3 日) (招待講演)。
 23. 久保田義顕：組織血管前駆細胞 (tissue-resident vascular precursors) の同定と機能解析 第 11 回 Organ Microcirculation Forum (東京 2010 年 11 月 4 日) (招待講演)。
 24. 久保田義顕：網膜幹細胞の血管ネットワーク形成における役割 新学術領域「血管—神経ワイヤリングにおける相互依存性の成立機構」キックオフミーティング (大阪 2010 年 9 月 13 日) (招待講演)。
 25. Kubota Y. M-CSF as a therapeutic target for tumor lymph/angiogenesis. *5th Gordon Research Conference (Endothelial Cell Phenotypes In health & Disease)*. 8-13 August, 2010, Biddeford, ME (Invited speaker).
 26. 久保田義顕：血管・リンパ管新生におけるマクロファージの役割 第 15 回血液科学セミナー (東京 2009 年 11 月 21-22 日) (招待講演)。
 27. Kubota Y. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *5th International Conference on Tumor Microenvironment*. 20-24 October, 2009, Versailles, France (oral presentation).
 28. 久保田義顕：発生期・腫瘍リンパ管新生におけるマクロファージの役割 第 1 回リンパ学に関する松本カンファレンス (松本 2009 年 8 月 21-22 日) (招待講演)。
 29. 久保田義顕：血管・リンパ管新生におけるマクロファージの役割 第 11 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム (東京 2010 年 6 月 19 日) (招待講演)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等
<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/kubota/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 久保田 義顕 (KUBOTA YOSHIAKI)
 慶應義塾大学・医学部・特任講師
 研究者番号：50348687