

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713059

研究課題名(和文)血管新生の「質」を向上させる創傷治療戦略の開発

研究課題名(英文)Strategy to improve the quality of wound angiogenesis

研究代表者

久保田 義顕(Kubota, Yoshiaki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50348687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚・軟部組織が損傷・欠損すると、これを復元すべく内因性の創傷治療機構が発動する。その過程において中心的な役割を果たすのが周囲の血管からのいわゆる「血管新生」であると考えられている。本研究では、この創傷治療における血管の変動を、従来の「血管新生」の枠組みにとどまらず、より包括的に「創傷血管網リモデリング」と称し、その全容の解明を目的として遂行された。その結果、創傷血管網リモデリングの主体は、血管の増殖や分枝増加よりむしろ、血管径の増大や血流増加、創収縮に伴う血管の方向性の変化であり、特に前者については、各種変異マウスの解析により、VEGF/VEGFR2シグナルに依存していることを突きとめた。

研究成果の概要(英文)：Once skin tissues are injured, the endogenous healing program takes place and damaged tissues are repaired or regenerated. Angiogenesis, formation of new blood vessels from nascent vessels, are believed to play a central role in this repairing process. However, the entity of the kinetics of blood vessels associated with wound healing is only ambiguously clarified. Here we established a new wound healing model using neonatal mice, suitable for visualizing the 3-D structure of blood vessels in wound tissues. Utilizing this technique, we found vascular changes during wound repair are mainly the vascular enlargement accompanied by increased blood flow, and the vessel curving caused by wound contraction, rather than typical angiogenesis. We also found the increase in diameter and blood flow depends on the VEGF-VEGFR2 signaling. These results suggest the vascular remodeling during wound healing is not a typical angiogenesis, but uniquely characterized as enlargement and curving.

研究分野：血管生物学、形成外科学

キーワード：血管 創傷治療 VEGF VEGFR2

1. 研究開始当初の背景

生体内のあらゆる組織がその恒常性を維持するためには、血管網から過不足なく酸素・栄養が供給されることが必須である。組織酸素受容に比し血管からの酸素供給が不足すると、心筋梗塞・脳梗塞などの虚血性疾患に陥る。その一方、血管網の過剰な増生は、加齢性黄斑変性症・慢性関節リウマチ・がん・乾癬などの血管新生病を引き起こす。外傷、手術、感染などにより皮膚・軟部組織が欠損すると、それを修復すべく内因性の創傷治癒プログラムが発動する。創傷修復過程は肉芽形成、上皮化、創収縮の3つのステップに大別されるが、そのすべてにおいて、血管新生はキーとなる生理現象と考えられている。実際、糖尿病・動脈硬化など何らかの原因でこの新生血管の機能が不十分であると、創傷治癒に障害をきたし、慢性創傷（褥瘡・難治性潰瘍など）として長期にわたって治癒が遷延する。ところが、慢性創傷の治療の現場において、局所が見るからに赤々としていて、明らかに血管が豊富であり、また組織切片においても血管の旺盛な増生が認められるにも関わらず、治療に難渋する症例が数多く存在する。さらには、表皮特異的に血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor: VEGF）を過剰発現させたトランスジェニックマウス（Keratin5-VEGF）では血管密度は増加するものの、意外にも上皮化期間の有意な短縮は得られない（Lloyd et al 2012）。これらの知見は、組織の血管量そのものは、必ずしも創傷治癒の良し悪しの指標とはならないこと、そして血管量のみを増やす局所治療は、慢性創傷の治療促進に直結しない可能性を示唆している。

2. 研究の目的

上記の事情を背景に、本研究は血管量そのものではなく、創傷血管の「質」、つまり組織への酸素・栄養の供給という血管の機能的な側面にフォーカスし、それを制御するメカニズムの解明を目指して行われた。

3. 研究の方法

まず、当研究室の作成したタモキシフェン誘導性血管内皮特異的 Cre マウスである VEcad-BAC-CreERT2 マウスを VEGFR2 の flox マウス（Vegfr2-flox）と交配し、タモキシフェン誘導性血管内皮特異的 VEGFR2 ノックアウトマウスを作成、その新生仔マウスの背部に皮膚創傷を作成し、その後タモキシフェン投与を開始することで、発生時期の VEGFR2 シグナルの欠落の影響は回避した。このマウスに関し、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て、背部皮膚創傷血管ネットワークの全容を形態学的に観察した。また、NO シグナル関連のノックアウトマウス（iNOS ノックアウトマウス、eNOS ノックアウトマウス）についても同様の新生仔マウス創傷治癒モデルを負荷

し、組織学的解析を行った。またそれらマウスの創傷治癒速度を、切片解析による上皮化の程度に酔って定量化した。

4. 研究成果

タモキシフェン誘導性血管内皮特異的 VEGFR2 ノックアウトマウスの創傷モデルにおける表現型を解析した結果、VEGFR2 シグナルの寄与する現象として一般的である、血管の sprouting や増殖、血管分枝数に大きな変動はなく、むしろ、血管径や血流の減少が血管内皮特異的 VEGFR2 ノックアウトマウスの表現型として著明であることが判明した。これは、申請者がこれまで見出した、創傷部位血管リモデリングの主体が血管分枝の増加よりむしろ、血管径の増大、血流の増加であるという結果と矛盾しない観察である。さらには、このノックアウトマウスの創傷治癒の速度を定量した結果、野生型マウスに比して有意に遅延していることを見出した。その一方、一般的に血管の収縮・拡張を司るシグナルとして知られる NO シグナル関連のノックアウトマウス（iNOS ノックアウトマウス、eNOS ノックアウトマウス）では、意外なことに野生型同様の血管の口径増大、血流増加が観察された。これらの結果は、創傷血管リモデリングの主たる変動因子である血管径、血流量が、一般的に考えられているように NO シグナルではなく、血管新生、増殖シグナルとして知られる VEGF/VEGFR2 シグナルによって制御されることを示している。

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 6 件)

全て査読有。*corresponding author

1. Yamazaki T, Nalbandian A, Uchida Y, Li W, Arnold TD, Kubota Y, Yamamoto S, Ema M, Mukoyama YS. Tissue Myeloid Progenitors Differentiate into Pericytes through TGF- β Signaling in Developing Skin Vasculature. *Cell Rep*; 18(12): 2991-3004, 2017. pubmed/28329690
2. Jang JY, Choi SY, Park I, Park DY, Choe K, Kim P, Kim YK, Lee BJ, Hirashima M, Kubota Y, Park JW, Cheng SY, Nagy A, Park YJ, Alitalo K, Shong M, *Koh GY. VEGFR2 but not VEGFR3 governs integrity and remodeling of thyroid angiofollicular unit in normal state and during goitrogenesis. *EMBO Mol Med*; 2017 pii: e201607341. pubmed/28438786
3. *Matsuo K, Kuroda Y, Nango N, Shimoda K, Kubota Y, Ema M, Bakiri L, Wagner EF, Takeda Y, Yashiro W and Momose A. Osteogenic capillaries orchestrate growth plate-independent ossification of the malleus. *Development* 142(22): 3912-20,

2015. pubmed/26428006
4. Hong KY, Bae H, Park I, Park DY, Kim KH, **Kubota Y**, Cho ES, Kim H, Adams RH, Yoo OJ, Koh GY. Perilipin+ embryonic preadipocytes actively proliferate along growing vasculatures for adipose expansion. *Development* 142(15): 2623-32, 2015. pubmed/26243869
 5. ***Kubota Y**. Unveiling Angptl2, a rising HSC expander. *Blood* 124(6): 833-834 2014 (invited commentary). pubmed/25104862
 6. Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukouyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M and ***Kubota Y**. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* 159: 584-596, 2014. pubmed/25417109

〔学会発表〕(計 22 件)

1. **久保田義顕**: 網膜発生における血管 神経のクロストーク **第121回日本解剖学会総会シンポジウム**(長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)2017年3月29日)(招待講演)。
2. **久保田義顕**: 血管新生におけるミクログリアの役割 **第42回日本微小循環学会総会**(富山国際会議場(富山県富山市)2017年3月26日)(招待講演)。
3. **Kubota Y**. Organ-specific vascular morphogenesis. *Keio-NUS symposium on Life Cycle Medicine*. 10 January, 2017, National University of Singapore, Singapore (Invited speaker).
4. **久保田義顕**: Neuro-vascular crosstalk in the central nervous system. **BMB2015**(神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)2015年12月1日)(招待講演)。
5. **久保田義顕**: 網膜血管パターンニングの制御機構 **第3回 Heart Science Club**(興和株式会社東京支店(東京都千代田区)2015年11月21日)(招待講演)。
6. **久保田義顕**: Neuro-vascular crosstalk in the developing retina; 熊本大学リエゾンラボ研究会/HIGO プログラム最先端研究セミナー(熊本大学(熊本県熊本市)2015年10月27日)(招待講演)。
7. **Kubota Y**. Vascular development and diseases. **9th International Cell Therapy Conference**. 23 October, 2015, Seoul National University, Seoul, Korea (Invited speaker).
8. **Kubota Y**. Neuro-vascular crosstalk in the developing retina. *Lecture in Natinal University of Singapore*. 7 October, 2015, Cancer Science Institute, National University of Singapore, Singapore (Invited speaker).
9. **久保田義顕**: 中枢神経系における血管発生 **第8回 Symphony**(ホテルメトロポリタン飯田橋(東京都文京区)2015年9月

27日)(招待講演)。

10. **Kubota Y**. VEGF/VEGFR2 signaling in retinal vascular development. **10th World Congress for Microcirculation**. (京都国際会議場(京都府京都市)2015年9月25-26日)(Invited speaker).
11. **久保田義顕**: 網膜における血管パターンニングの制御機構 **滋賀医大セミナー**(滋賀医科大学(滋賀県大津市)2015年9月17-18日)(招待講演)。
12. **久保田義顕**: Neuro-vascular interaction in the developing retina **第58回日本神経学会大会**(大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)2015年9月11日)(招待講演)。
13. **久保田義顕**: マクロファージによる血管新生制御 **第36回炎症再生医学会**(虎の門ヒルズ(東京都港区)2015年7月21日)(招待講演)。
14. **久保田義顕**: 血管ネットワーク形成のメカニズム **第31回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会**(慶應義塾大学(東京都新宿区)2015年7月11日)(招待講演)。
15. **久保田義顕**: Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. **第11回麒麟塾**(コクヨホール(東京都千代田区)2015年7月11日)(招待講演)。
16. **久保田義顕**: 中枢神経系における血管の発生 **第33回内分泌学会サマーセミナー**(柳川藩主立花邸御花(福岡県柳川市)2015年7月9-11日)(招待講演)。
17. **久保田義顕**: 網膜血管パターンニングの制御機構 **Research PlaNet 2015**(梅田スカイビルタワーウエスト(大阪府大阪市)2015年6月20日)(招待講演)。
18. **久保田義顕**: Neuronal VEGF endocytosis triggers the programmed regression of hyaloid vessels **秋期特別日本血管生物医学学会シンポジウム**(大阪大学(大阪府吹田市)2015年5月13日)(招待講演)。
19. **Kubota Y**. Neuro-vascular interaction in retinal development. *Special seminar in KAIST*. 8-11 April, 2015, KAIST, Dejeon, Korea (Invited speaker).
20. **久保田義顕**: 血管の発生と血管新生病 **第14回日本再生医療学会ランチョンセミナー**(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)2015年3月21日)(招待講演)。
21. **久保田義顕**: 網膜血管発生における VEGF シグナルの役割 **東京大学代謝生化学教室セミナー**(東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)2015年3月12日)(招待講演)。
22. **久保田義顕**: 網膜血管発生における VEGF シグナルの役割 **血管生物若手研究会**(東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)2015年2月6-7日)(招待講演)。

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keiovascular.com/>

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・教授

研究者番号：50348687