

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592077  
 研究課題名（和文） 新規血管新生因子AGFトランスジェニックマウスを用いた皮膚光老化の研究  
 研究課題名（英文）Angiopoietin-related growth factor promotes sensitivity to ultraviolet B-induced cutaneous photodamage  
 研究代表者  
 中岡 啓喜 (NAKAOKA HIROKI)  
 愛媛大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：30172266

## 研究成果の概要：

表皮特異的AGFトランスジェニック・マウス（AGF TG）に紫外線UVBを単回照射すると、野生型に比べて光線過敏を来した。即ち、皮膚毛細血管は拡張し、表皮は肥厚、皮膚の腫脹が持続し、炎症が遷延することが示唆された。さらに、慢性的にUVB照射を行うと、AGF TGでは皮膚に皺が生じた。このことから、AGFは光老化を来す因子であることが同定された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 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：光老化、血管新生、細胞外マトリックス、動物モデル、炎症

## 1. 研究の背景

高齢化社会が到来し、紫外線による皮膚障害・光老化のメカニズムの基礎的研究は、アンチエイジングに対する関心の高まりから今後、形成外科領域においても極めて重要な課題である。紫外線（ultraviolet B, 以下、UVB）照射は、急性期には紅斑と表皮肥厚、血管の拡張と透過性の亢進、及び浮腫を皮膚に誘導する。一方、長期にわたるUVB照射は皺の形成を促進し、真皮結合組織の変性及び発癌の危険をもたらす。UVB照射後、急性期には血管に著しい変化が観察されることから、皮膚光線障害の発症機転には皮膚脈管系が重要な役割を果たすことが示唆

される。しかし、長期にわたるUVB照射が血管に及ぼす作用、さらに血管系が光老化に及ぼす影響は、いまだ不明なままである。皮膚脈管系は、血管及びリンパ管から成る。皮膚の炎症、創傷治癒、及び腫瘍形成においては、既存の血管から新たに血管が誘導され、この極めて動的なプロセスを血管新生という。血管生物学の目覚ましい発展により、皮膚病態における血管新生の役割とそのメカニズムが明らかになる一方、今までその存在すら知られていなかった血管増殖因子が新たに報告され、強力な生理活性を有することが近年明らかとなってきた。従って、血管生物学は既存の増殖因子の理解

にとどまらず、新規血管内皮増殖因子の積極的な理解と生物学的意義付けを行い、さらに疾病治療への応用を早急に目指さなければならない。そこで、本研究課題において、我々はアンジオポエチンファミリーに着目し、光老化における新規血管新生因子angiopoietin-related growth factor (以下、AGF)の役割を明らかにしたい。

血管新生では、アンジオポエチンファミリーとともに VEGF ファミリーが重要な働きを持つ。VEGF-Aは VEGFR-1 及び R-2 に作用し、血管新生と血管透過性の亢進を強力に誘導する。この VEGF-A を表皮特異的に過剰発現したトランスジェニックマウスは、表皮下の毛細血管及びリンパ管の増生と軽度な表皮肥厚を伴い、皮膚慢性炎症モデルとして確立している。近年、ヘアレスマウスを用いた研究から、UVB 照射による著しい VEGF-A の発現が表皮細胞から誘導されることが明らかとなった。そこで、UVB 照射における VEGF-A の生物学的意義が、表皮特異的 VEGF-A トランスジェニックマウスを用いて検討された。この結果、急性及び慢性 UVB 照射により、VEGF-A はいずれも皮膚光線障害と光老化を促進する増悪因子であることが明らかとなった。すなわち、VEGF-A トランスジェニックマウスでは野生型に比べて最少紅斑量は低下しており、光線過敏を呈する。さらに光老化試験では、野生型マウスに用いられる 15% の UVB 量で、VEGF-A トランスジェニックマウスには著しい血管新生と光老化が誘導された。以上の結果より、血管新生は皮膚光線障害における増悪因子であることが強く示唆される。さらに、VEGF-A トランスジェニックマウスを用いたモデルでリンパ管に着目すると、UVB 照射後リンパ管は著しく拡張し、またこのリンパ管は輸送能が低下していることが明らかとなった。

一方、野生型マウスを用いて VEGF-A を不活化すると、UVB 照射により誘導されたリンパ管拡張は顕著に抑制された。従って、皮膚光線障害において、正常なリンパ管機能を保持するためには、抗血管新生療法が極めて有効な治療戦略であることが示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では、皮膚光線障害及び光老化における新規血管内皮増殖因子 AGF の発現と役割を同定し、血管新生が光老化の治療ターゲットであることを明確にした後、整容的な側面から光老化に対する新たな治療戦略の創出を目指す。本研究課題では、表皮特異的 AGF

トランスジェニックマウスを用いて、光線過敏及び皮膚光線障害における AGF の作用を同定する。さらに慢性 UVB 照射における光老化の促進機序を明らかにすべく、AGF の標的細胞を個々に見極め、詳細に解析する。第一に、我々は AGF の血管内皮細胞増殖効果及び血管透過性亢進に着目し、UVB 照射における AGF の血管新生作用を、構造的及び機能的に評価する。第二に、AGF による表皮細胞増殖効果に着目し、皮膚光線障害における表皮肥厚と制御にかかわる AGF の役割について検討する。第三に、AGF が様々な細胞に生理活性を示すことから、我々はリンパ管内皮細胞に対する AGF の新たな作用を検討し、光老化におけるリンパ管新生の役割について検証する。

## 3. 研究の方法

### ① 表皮特異的AGFトランスジェニックマウスの最少紅斑量測定

AGFの機能を直接検討するために、AGFを強発現するトランスジェニックマウスを用いて本研究課題を施行する。ケラチン 14 プロモーターにより表皮特異的にマウスAGFを発現するトランスジェニックマウス(図3: background, Balb/c; 以下、K14-AGF TG)は、尾池雄一博士(慶応義塾大学)より供与される。野生型マウスとともにK14-AGF TG背部をシェーバーで除去した後、UVBを単回照射する。照射は皮膚開窓部に対して、それぞれ0, 20, 35, 50, 75, 90, 105, 120 mJ/cm<sup>2</sup>行う。48時間後、野生型及びK14-AGF TGの最少紅斑量を測定し、K14-AGF TGの光線過敏性を検討する。

### ②K14-AGF TGに誘導される皮膚光線障害の評価

K14-AGF TGでは光線過敏が予想される。そこで、K14-AGF TGの最少紅斑量を耳介に単回照射し、以下の主要項目を、野生型と比較検討する。

#### ②-1 急性光線障害による浮腫

UVB照射により誘導される急性光線障害は、紅斑と浮腫により特徴づけられる。耳介の浮腫は厚さの変化を指標とし、ダイヤルゲージを用いて経時的に測定する。UVB照射後、耳介の厚さが最も著しい時間において、以下の評価項目を詳細に検討する。組織採取に先立ち、あらかじめマウスにはBrdUを腹腔内投与する。

#### ②-2 血管・リンパ管新生

急性光線障害がK14-AGF TGに誘導され、この耳介における血管またはリンパ管の拡張を、抗CD31抗体（血管）及び抗LYVE-1抗体（リンパ管）を用いた

蛍光二重染色により検討する。血管径の実測と形態学的変化は、IP-LABコンピューター画像解析ソフトを用いて数値化かつ定量化を行う。さらに、血管及びリンパ管の増殖活性は、血管またはリンパ管内皮細胞のBrdUの取り込みにより評価するすなわち、CD31, BrdUに対する蛍光二重染色を行い、K14-AGF TGの病変部血管内皮細胞における明瞭な二重標識像を確認する。

### ②-3 真皮結合組織の評価

UVB照射によるK14-AGF TG背部真皮結合組織の変化を、組織学的に検討する。トリクローム染色により膠原線維の発現及び配列の変化を、またルナ染色により弾性線維の変化を、対照群とともに比較検討する。

### ③表皮特異的AGFトランスジェニックマウスを用いた光老化試験

K14-AGF TG及び野生型マウス（8週齢、オス、各群n=10）に対して、10週にわたる光老化試験を行う。マウス背部の体毛をシェーバーで除去した後、UVB照射を週3回行う。一回当たりの照射量はK14-AGF TGの最少紅斑量と同等、あるいはそれ以下とする。評価はUVB照射10週後、以下の項目について、対照群（非照射群及び野生型照射群）と比較検討する。

#### ③-1 皮膚光線障害の肉眼的評価

形成外科医師2名により、マウス背部に生じた皮膚光線障害及び皴形成を3段階で評価する（図1A, B参照）。

#### ③-2 レプリカによる皴形成の評価

マウス背部の体毛を化学的に脱毛後、レプリカを作製する。レプリカは・・・を用いる。レプリカを実態顕微鏡で観察し、K14-AGF TG背部においてUVB照射により誘導された皴を実測する。

#### ③-3 光老化に伴う組織学的変化の評価

ヘマトキシリンエオジン染色により、UVB照射K14-AGF TGにおける表皮肥厚及び真皮内浮腫を評価する。また、真皮結合組織の変化は、トリクローム及びルナ染色により検討する。

#### ③-4 慢性UVB照射による血管・リンパ管新生の評価

マウスを麻酔後、筋膜上で皮膚を反転し、UVB照射K14-AGF TGにおける血管新生を肉眼的に検討する。また、組織学的に血管及びリンパ管新生を評価するために凍結切片を作製し、抗CD31抗体（血管）及び抗LYVE-1抗体（リンパ管）を用いて蛍光二重染色を行う。脈管の密度、拡張、及び脈管が組織に占める割合は、IP-LABコンピューター画像解析ソフトを用いて定量する。

### ③-5 慢性UVB照射による真皮結合組織の変化

マウス皮膚より電子顕微鏡用の標本を作成後、透過型電子顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### ①表皮特異的AGFトランスジェニックマウスは最少紅斑量が低下していた

マウス背部にUVB単回照射を行った。野生型マウスの最少紅斑量は、75 mJ/cm<sup>2</sup>であった（n = 5）。これに対して、AGF TGの最少紅斑量は50 mJ/cm<sup>2</sup>であった（n = 5）。以上からは、AGF-TGは野生型マウスに比べて光線過敏を呈することが明らかとなった。

### ②K14-AGF TGに誘導される皮膚光線障害の評価

#### ②-1 急性光線障害による浮腫

耳介へUVB 90 mJ/cm<sup>2</sup>単回照射を行った。照射後、耳介の腫脹を24時間ごとにニードルゲージで測定した。照射48時間後、AGF-TGでは、野生型マウスに比べて耳介の腫脹度合いが、50 micro m亢進していた（各n = 5）。従って、AGF-TGマウスでは光線過敏を基盤にした炎症により、耳介の腫脹の度合いが亢進していることが明らかとなった。

#### ②-2 血管・リンパ管新生

耳介へUVB 90 mJ/cm<sup>2</sup>単回照射を行い、照射48時間後の耳介における組織学的変化を評価した。AGF-TGでは野生型に比べて、血管径が拡張していた（各n = 5）。AGF-TGにおける血管内皮細胞の明らかな増殖は、野生型マウスとの比較では同定し得なかった。リンパ管は、野生型マウスに比べAGF-TGで軽度拡張を認めたものの、有意差は同定し得なかった（各n = 5）。以上から、AGF-TGマウスはUVBにより急性光線皮膚障害を来し、血管拡張を生じることが明らかとなった。

#### ②-3 真皮結合組織の評価

トリクローム染色で評価すると、野生型マウスに比べAGF-TGでは真皮乳頭層に膠原線維

の変性を認めた。

### ③表皮特異的 AGF トランスジェニックマウスを用いた光老化試験

#### ③-1 皮膚光線障害の肉眼的評価

マウス背部体毛を除去した後、10週間にわたり、週3回 UVB 照射を行った。この結果、UVB を照射した AGF-TG には肉眼的に皺が生じた。一方、UVB 非照射の AGF-TG、野生型マウス及び UVB 照射野生型マウスでは、明らかな皺は観察し得なかった（各 n = 5）。

#### ③-2 レプリカによる皺形成の評価

上記光老化試験において、脱毛クリームで体毛を除去した後、皮膚のレプリカを作成した（各 n = 5）。UVB を照射した AGF-TG から得たレプリカでは、実体顕微鏡下に皺が観察された。一方、UVB 非照射の AGF-TG、野生型マウス及び UVB 照射野生型マウスでは、明らかな皺は観察し得なかった。以上かより、AGF-TG は UVB 照射により光老化が誘導されることが明らかとなった。

#### ③-3 光老化に伴う組織学的変化の評価

ヘマトキシリン・エオジン染色で、UVB を照射した AGF-TG マウスでは表皮肥厚と真皮乳頭層に膠原線維の変化を認めた。

#### ③-4 慢性 UVB 照射による血管・リンパ管新生の評価

UVB照射AGF-TGでは野生型に比べて、血管が増殖していた（各n = 5）。リンパ管は、野生型マウスに比べて有意な変化同定し得なかった（各n = 5）。以上から、AGF-TGマウスは慢性的なUVBにより光老化を来し、その基盤には血管新生があることが明らかとなった。

#### ③-5 慢性UVB照射による真皮結合組織の変化

電子顕微鏡観察で、UVB 照射 AGF TG の真皮乳頭層では、コラーゲン線維束を主体とする細胞外基質が減少としていた。UVB 非照射 AGF TG、野生型マウス及び UVB 照射野生型マウスでは、明らかな細胞外基質の減少は同定し得なかった。

## 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）

〔学会発表〕（計2件）

1. Hirakawa S, Sato E, Arima Y, Shirakata Y, Sayama K, Toyama M, Tokumaru S, Nagai H, Oike Y, and Hashimoto K. Targeted

overexpression of angiopoietin-related growth factor promotes lymphatic and epidermal hyperplasia in the skin. 37<sup>th</sup> Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting, Zurich, Switzerland, September 5-8, 2007. Oral presentation in plenary session.

2. Sato E, Hirakawa S, Arima Y, Shirakata Y, Sayama K, Tohyama M, Tokumaru S, Nagai Hi, Oike Y, Hashimoto K. Targeted overexpression of angiopoietin-related growth factor in the epidermis promotes lymphatic and epidermal hyperplasia. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, Yokohama, April 18-20, 2007. Oral presentation.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中岡 啓喜 (NAKAOKA HIROKI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30172266

### (2) 研究分担者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50419511