

(様式4)

学位論文の内容の要旨

内山明彦 印

(学位論文のタイトル)

Protective Effect of MFG-E8 After Cutaneous Ischemia-reperfusion Injury

(皮膚虚血再還流障害におけるMFG-E8による防御機構)

分泌蛋白質MFG-E8は、N末端に2つの上皮成長因子様ドメイン (E1, E2) を持ち、E2ドメインにはインテグリンとの結合に重要なRGD配列を含む。MFG-E8は、このRGD配列を介して、インテグリン $\alpha\text{v}\beta 3/5$ と結合する。一方、C末端には第5, 8凝固因子と相同性をもつドメイン (C1, C2) を有する。MFG-E8は、アポトーシス細胞貪食能、腫瘍免疫制御能やコラーゲン代謝能の制御など様々な機能の制御に関わっている。

我々は、マウス悪性黒色腫内において、血管周皮細胞 (ペリサイト) がMFG-E8の主要な産生細胞であること、そして分泌されたMFG-E8が血管周囲に局在し、腫瘍血管新生を促進させることを明らかにした。また、MFG-E8が血管新生を亢進させるメカニズムについて検討した結果、MFG-E8がペリサイト細胞表面上のインテグリンと結合し、PDGFR β シグナルを亢進させ、細胞運動、腫瘍血管新生を促進させることを見いだした。私は大学院生として、皮膚創傷治癒におけるMFG-E8の役割を解明することを開始した。その結果、皮膚創傷治癒過程においてMFG-E8は肉芽組織内においてびまん性に発現が亢進し、特に血管周囲に発現が亢進し、血管新生を促すことで創傷治癒を促進することを明らかにし報告した (American Journal of Pathology 2014; 184: 1981-90)。

次の課題として、褥瘡の機序、治療薬の開発を目的とした研究を開始した。近年、急性期褥瘡の発生機序において、虚血再還流障害が重要な要因であるとされている。虚血再還流により浮腫や毛細血管の狭小化が生じ、さらに炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β など) や炎症細胞浸潤、活性酸素などによりアポトーシスやネクローシスが拡大し、さらなる組織傷害が生じる。しかし、皮膚における虚血再還流障害に関するMFG-E8の制御機構は不明である。今回、我々はマウスを用いて皮膚虚血再還流障害の制御におけるMFG-E8の役割について検討した。

初めに皮膚虚血再還流障害によるMFG-E8の発現への影響についてリアルタイムPCR法で検討した。マウスの背部を12時間虚血にしたところ、MFG-E8の発現が亢進し、再還流後MFG-E8の発現が低下した。次にマウス背部皮膚を用いて蛍光免疫染色法を用いた検討を行った。正常状態において、MFG-E8は血管周囲に発現し、虚血後にその発現が亢進し、再還流後に発現が低下した。次に*in vitro*での検討を行った。マウスペリサイト様細胞 (10T1/2) 及びヒト血管内皮細胞(HUVEC)に対して低酸素刺激を行ったところ、時間依存性にMFG-E8の発現が亢進した。これらのことから、虚血により生じる低酸素の刺激によって、ペリサイトや血管内皮細胞から産生されるMFG-E8の発現が亢進することが示唆された。

次に虚血再還流障害により生じる潰瘍形成に対するMFG-E8の役割を解析するためにrMFG-E8投与群とcontrol群を用いて比較した。rMFG-E8を虚血再還流部位に皮下注射したところ、虚血再還流後に生じる潰瘍の形成が抑制されて、早期に上皮化した。次に炎症細胞浸潤に対するMFG-E8の影響を解析した。虚血再還流後1日目において、rMFG-E8投与群はcontrol群と比較して浸潤するマク

ロファージ数が低下し、特に炎症性マクロファージであるM1マクロファージが有意に抑制された。また、rMFG-E8投与群ではアポトーシス細胞数が低下していた。また、虚血再還流障害で重要とされる炎症性サイトカインに対するMFG-E8の影響をリアルタイムPCR法で検討した。rMFG-E8投与群では炎症性サイトカイン（TNF- α 、iNOS、IL-1 β 、MCP-1、IL-6）の発現が有意に低下していた。さらにフローサイトメトリー法を用いた検討では、炎症性サイトカイン（TNF- α 、IL-1 β 、IL-6）を産生するマクロファージの割合がrMFG-E8投与群で有意に減少していた。さらに、虚血再還流後6日目において、潰瘍周囲での血管量を比較したところ、rMFG-E8投与群ではcontrol群と比較して血管量（CD31陽性細胞数、 α SMA陽性細胞数）が増加していた。

以上の結果より、MFG-E8の皮下注射によって皮膚虚血再還流障害が抑制できることを明らかにした。その機序として、①炎症性マクロファージの浸潤抑制②炎症性サイトカインやアポトーシスの抑制③血管新生を促すことが考えられた。今回の成果より、褥瘡やレイノー現象などの虚血再還流障害に対して、MFG-E8の治療への応用も期待できる。