

## 論文審査の結果の要旨

### Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish

ゼブラフィッシュ成魚を用いた創傷治癒過程における血管新生のライブイメージング

日本医科大学大学院医学研究科 形成再建再生医学分野

大学院生 野一色 千景

Angiogenesis 2019 年掲載予定

血管では周皮細胞（ペリサイト）が内皮細胞を被覆し安定な血管構造を維持している。周皮細胞は、血管の維持、血流調節、血管形成、血液脳関門の形成・維持に関与すると考えられているが、その詳細は不明である。

創傷により組織が虚血に陥ると、血管新生促進因子が産生され血管新生が誘導される。しかし生理的・病的な血管新生において内皮細胞・周皮細胞が新生血管を構築する機構については不明な点が多い。本研究では、蛍光イメージングにより創傷治癒における血管新生をライブで観察し、その制御機構の解明を試みた。

ゼブラフィッシュを脊椎動物モデルとして用いた。血管内皮細胞及び周皮細胞で蛍光蛋白質を発現する成魚の皮膚に損傷を加え、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、創傷治癒における血管新生のライブイメージング解析を行った。

その結果、正常皮膚の毛細血管では、内皮細胞・周皮細胞は共に休止状態にあったが、真皮・表皮に損傷を加えたところ 2 日目から損傷血管の伸長と非損傷血管からの出芽が誘導された。6 日目には無秩序な高密度の血管網が形成され、全出芽の約 76%は、静脈血管から起こり、主に動脈血管に吻合していた。その後、一部の血管が退縮し、損傷 1~2 ヶ月後には損傷前と同様な血管網が構築された。また、創傷治癒における血管新生は血管内皮増殖因子によって誘導されることが示され、内皮細胞に対する周皮細胞の存在比率は、創傷治癒過程で変化した。

さらに、内皮細胞と周皮細胞が新生血管を形成する機構を理解するため、真皮層毛細血管を 1 本切断し、その修復過程を経時的に観察した。2~3 日目で血管が吻合し、損傷前とほぼ同数の内皮細胞が修復血管を構築していたが、その後も内皮細胞は増殖を続け、7 日目には損傷前の約 1.8 倍まで数を増加させ、血管を蛇行させた。その後、数ヶ月に渡って内皮細胞が徐々に消失し、血管が正常化した。周皮細胞の増加は、周皮細胞の増殖と遊走に起因していた。

血管新生による周皮細胞の増加と蛇行血管の被覆は、「血管新生において、血管壁からの周皮細胞の剥離が、内皮細胞の出芽を促す」というこれまでの概念と矛盾する。そこで、内皮細胞の出芽部位と近傍の周皮細胞の位置関係を解析したところ、内皮細胞は周皮細胞の位置に無関係に出芽しており、内皮細胞の出芽に周皮細胞の剥離が必ずしも必要ないこと

が示された。

以上の結果から、正常皮膚血管の内皮細胞、周皮細胞は休止状態にあるが、創傷によってこれら細胞は迅速に活性化し血管新生を誘導すること、また損傷後 1 週間程度で密度が高く無秩序な血管網が構築され、数ヶ月かけて血管が正常化することが示された。さらに周皮細胞は血管新生の誘導によって増殖し、蛇行血管を被覆することが示された。

第二次審査においては、血管新生における周皮細胞の新たな機能が明らかになったことが確認され、結果が明瞭でオリジナリティーが高く、癌・血管腫・創傷治癒の領域の治療法開発に寄与できる重要な論文であるという評価を得た。魚類とヒトの創傷治癒の違いに関する質問では、ゼブラフィッシュは時間経過は短いが哺乳動物における創傷治癒の主なプロセスが共通であると報告された。周皮細胞の起源に関する質問では、いまだ完全には解明されていないが、中胚葉だけでなく外胚葉を起源とするものもある旨回答された。毛細血管のレベルでどのように動脈と静脈を区別しているかという質問に対しては、創傷を作成する前に血管の流れの方向を確認している旨報告された。その他、VEGF 阻害剤や PDGF 阻害剤を用いて血管新生のどの過程に VEGF を含めた成長因子が関与しているか検討を重ねたことが報告された。

よって本研究は創傷治癒の機序解明に留まらず臨床的にも発展性のある重要な研究であることが確認された。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。