

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

A New Model for Specific Visualization of Skin Graft Neoangiogenesis using Flt1-tdsRed BAC Transgenic Mice

Flt1-tdsRed BAC トランスジェニックマウスを用いた 血管新生可視化植皮モデルの構築

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 モハメド アフメド アブデルハキム アフメド
Plastic and Reconstructive Surgery 2020-21 年掲載予定

熱傷・創傷や悪性腫瘍切除後に生じる皮膚・皮下組織の欠損に対する再建では、植皮術が重要な再建方法の一つである。自家植皮片が生着するためには、移植床と植皮片との間で血管新生が起こり、植皮片に血流が再開することが最も重要な要素である。しかし、この植皮生着時の血管新生のメカニズムについては未だ不明なところが多く残されている。その原因として、血管新生を可視化・追跡できる適切なモデルマウスがないことと、血管内皮細胞で発現している遺伝子についての個体レベルでの機能についての理解が不十分であることが考えられる。そこでわれわれは Flt1-tdsRed BAC トランスジェニックマウスを用いた血管新生可視化植皮モデルの構築を行った。Flt1 は血管新生を調整する血管内皮細胞が発現している VEGF-A の受容体 (VEGFR1) であり、われわれは植皮生着時の血管新生動態をこの遺伝子改変マウスを用いて、経時的に評価・解析を行い、信頼できるモデルであるかどうかを検証した。

Flt1-tdsRed BAC トランスジェニックマウスを自家繁殖し、Flt1 マウスと KSN/Slc ノードマウスを用いて、相互に全層皮膚移植を行った (n=5)。植皮後 1-3 日目、5 日目、9 日目、14 日目における植皮の中心部・辺縁部、植皮隣接のドナー皮膚部分の血管新生を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて tdsRed 蛍光を追跡し、評価・解析した。

まず Flt1 マウスの移植床にノードマウスからの全層皮膚移植を行ったものを評価した。いつの時点で植皮内に血管新生が起こってくるかを検証するために、植皮後 1 日、2 日、3 日のサンプルを用いて調査したが (n=5)、1 日、2 日は植皮部への新生血管の侵入は中心部および辺縁部ともに認めず、3 日目に主に中心部優位に起こってくることを確認することができた。そして、植皮部の中心部および辺縁部ともに血管新生のピークは、9 日目に起こることが判明した。次にリバーモデル (ノードマウスの移植床に Flt1 マウスからの全層皮膚移植を行ったもの) を評価した。同じく植皮後 1 日、2 日、3 日で血管新生の評価を行ったが、すべての時点で移植床への血管新生は認めなかったが、3 日目では植皮

片内部において、移植した植皮片から、わずかだが血管新生が起こっていることが判明した。また、植皮片から移植床への血管新生は植皮後観察し得たすべての期間で認められなかった。

われわれは血管新生可視化植皮モデルを適切に作成するために新生血管を正確に追跡するためにFlt1マウスを使用し、拒絶反応を抑えるためにそのペアとしてヌードマウスを用いることで、適切な本植皮マウスモデルの構築を行うことができた。既存の論文・報告では2日～3日で植皮部に血管新生が起こると言われていたが、今回のわれわれのFlt1マウスを用いたモデルでは、3日目ではじめて血管新生が始まっていることが判明した。また、先行研究では色素を用いた血管内灌流を行って血管新生のピークを推定していたが、本研究により、初めて正確に血管新生のピークが9日目であることを同定し得た。またリバーモデルの検証の結果、植皮片の血管新生において、植皮片そのものからはわずかであり、主に移植床からの血管新生が主であることが初めて正確に確認することができた。

Flt1-tdsRed BAC トランスジェニックマウスは植皮と移植床における血管新生メカニズムの可視化に最適であることが判明し、今後血管新生を促進する薬剤や材料などの開発・検討にあたって、同植皮モデルが有用である可能性が示唆された。

二次審査においては、結果が明瞭で、発展性のある研究であることが確認された。動脈が形成されているのか静脈が形成されているのかという質問に対しては、Flt1はVEGF-Aシグナル伝達経路を制御するため、このモデルでは動脈と静脈は区別することができないが、リンパ管形成とは区別することができる旨回答された。活性化した血管内皮細胞を観察している研究であるため、活性化していない血管内皮細胞の挙動も研究する必要があるのでは、という意見に対しては、抗VEGF抗体などを用いて免疫染色を行い、今後すべての血管を観察することの必要性があると回答された。

時間経過に伴う炎症の程度に関する質問に対しては、植皮をしているため通常的肉芽組織が形成される二次治癒とは異なる経過をたどるが、植皮が生着する過程で炎症が強くなり、マウスの場合1ヶ月後にはほぼ収束することが報告された。

VEGFがどの細胞から分泌されるのかという質問に対し多くは創部に遊走してきた血小板であるが、今後移植された植皮片の中でのVEGFの発現をリアルタイムRT-PCRや免疫染色などで観察する必要があると回答された。

よって本研究は植皮の生着機序解明に留まらず、創傷治癒すべてにおける血管新生研究につながる、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。