

乾癬モデルマウスを用いた新規 VEGF に関する基礎研究

末満きらり (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中田和人 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

乾癬は皮膚の慢性的な炎症をともなう自己免疫疾患である。主要な症状としては、血管新生による皮膚の紅斑、ケラチノサイト増殖による表皮過形成、フケ状の鱗屑形成などが観察され、また、乾癬患者体内では Th-1 や Th-17 といった炎症性細胞や TNF、IL-17、IL-23 といった炎症性サイトカインの増加が見られる。このような乾癬における炎症性の変化に着目し、その治療には TNF- α などの分子を標的とした乾癬治療薬が使用され、一定の治療効果が報告されている。しかしながら、現状、効果的な治療法の確立には至っていない。

乾癬の病理に関与すると考えられる因子に VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor=血管内皮細胞増殖因子)がある。VEGF は主に血管新生を司る因子であり、様々なシグナル経路を介して血管内皮細胞の分化、生存、移動、増殖、細管形成および血管透過性を誘導する。さらに乾癬患者の体内の VEGF レベルと症度に相関があることが報告されている。そこで、本研究では、抗 VEGF 薬の乾癬治療に対する可能性に着目し、眼科領域の疾患、及び、がん治療に既に用いられている Aflibercept を乾癬マウスモデルに適用した際の治療効果を検証した (実験 1: 乾癬モデルにおける抗 VEGF 薬の治療効果)。

さらに VEGF 由来のペプチドを標的としたワクチンが VEGF を標的として作用することにより関節リウマチモデルの症状を改善したという報告を受け、抗 VEGF ワクチンの乾癬治療応用への可能性についても検証することとした (実験 2: 乾癬モデルにおける抗 VEGF ワクチンの治療効果)。

【材料と方法】

● 乾癬モデルマウスの作製

C57BL/6 マウスを用いた。Aldara 塗布開始前日に背中の中毛を剃り、1~2週間に渡り一定期間 Aldara クリームを塗布することで乾癬モデルマウスを作製した。また、同日程でコールドクリームを塗布したマウスをコントロールマウスとした。

● 治療薬/ワクチンの作製と投与

抗 VEGF 薬の Aflibercept はマウス 1 g 体重あたり 12.5 μ g または 25 g、抗 TNF- α 薬の Etanercept はマウス 1 g 体重あたり 15 mg または 30 mg を投与した。1回の注射における総投与量を 100 μ L になるようにした。治療薬の投与は全て Aldara クリームの塗布とともに開始し、2日おき、または、3日おきに行った。

VEGF を構成する一部のペプチドを KLH (Keyhole limpet hemocyanin) と結合させることで VEGF を標的としたワクチンを作製した。ワクチン投与は Aldara クリーム塗布開始日を Day 0 とし、Day 0 以前の Day - 32、Day - 25、Day - 11 に行った。

● クリニカルスコアの評価

PASI (Psoriasis Area and Severity Index)にもとに、マウスの皮膚の形成された紅斑・浸潤・鱗屑の状態を 0~4 点計 12 点満点で評価した。

● 組織学的解析

採集した皮膚サンプルのパラフィン切片を作製後、HE 染色を行い、表皮の過形成を評価した。

● 炎症性サイトカインレベルの測定と脾臓構成細胞の解析

血中ならびに皮膚における炎症性サイトカインレベル (IL-6/17/23, VEGF) を ELISA キットによって測定した。Flow cytometry を用いて脾臓における CD4+ T cell、CD19+ B cell、Ly6G+ neutrophil の割合を測定し、Aldara クリームの全身への影響とそれに対する治療の効果を検証した。

【結果と考察】

● 実験 1: 乾癬モデルにおける抗 VEGF 薬の治療効果

Aflibercept は乾癬の代表的な症状である皮膚の紅斑と表皮過形成を改善した。また、Aflibercept 12.5 mg/kg を投与した治療群において最も高い治療効果が観察された。特に、紅斑の改善は抗 VEGF により血管新生が抑制されたことによるものだと考えられた。抗 VEGF 薬である Aflibercept は、既に乾癬治療に用いられている抗 TNF- α 薬である Etanercept の治療効果と比較し、優れた乾癬改善効果を発揮していることから、主にごん治療に用いられてきた Aflibercept が乾癬に対する新たな治療薬になり得ると結論した。

● 実験 2: 乾癬モデルにおける抗 VEGF ワクチンの治療効果

抗 VEGF ワクチンは乾癬モデルの皮膚領域において乾癬に代表的なサイトカイン (IL-17, IL-23, VEGF) のレベルを減少させた。しかし、クリニカルスコアと表皮過形成評価においては改善効果を見出せなかった。乾癬モデルの脾臓において脾腫が見られたが、抗 VEGF ワクチンがそれを改善することはなかった。

【謝辞】

本実験を行うにあたり、右も左もわからない私の面倒を見てくださったフランスパリ第 13 大学研究室 Li2P の Dr. Eric ASSIER、またその研究室長の Prof. Marie-Christophe BOISSIER、帰国後ご指導して下さった中田先生を始めとする中田研究室の皆様にご心から御礼申し上げます。

【参考文献】

Semerano L, Duvallat E, Belmellat N, Marival N, Schall N, Monteil M, Grouard-Vogel G, Bernier E, Lecouvey M, Hlawaty H, Muller S, Boissier MC, and Assier E. Targeting VEGF-A with a vaccine decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *Angiogenesis*. 19(1):39-52 (2016).