



Doctoral Thesis

The cutaneous vasculature a new target for treating inflammation

Author(s):

Huggenberger, Reto

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006532580> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 19580

**THE CUTANEOUS VASCULATURE - A NEW TARGET FOR
TREATING INFLAMMATION**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

RETO HUGGENBERGER

MSc ETH Pharm. Sc, ETH Zurich

21.02.1982

citizen of

Seon, Aargau, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Detmar

Prof. Dr. Sabine Werner

Prof. Dr. Dario Neri

2011

1. SUMMARY

1.1 Summary

Although vascular remodeling is a hallmark of many chronic inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, and psoriasis, anti-vascular strategies to treat these conditions have received little attention to date. We investigated the anti-inflammatory activity of systemic blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A by an inhibitory monoclonal antibody, employing a therapeutic trial in a mouse model of psoriasis, where the simultaneous deletion of *JunB* and *c-Jun* in the epidermis of adult mice leads to a psoriasis-like phenotype. We show that anti-VEGF-A antibody treatment of mice already displaying disease symptoms resulted in an overall improvement of the psoriatic lesions, leading to a normalization of the cutaneous blood and lymphatic vasculature, the epidermal differentiation, and a reduction of the inflammatory infiltrate. These results demonstrate that systemic blockade of VEGF-A by an inhibitory antibody might be used to treat patients who have inflammatory skin disorders such as psoriasis.

Because blockade of VEGF-A normalized both, the blood and lymphatic vascular changes during chronic skin inflammation in the *jun* mouse model of psoriasis, we then investigated the role of lymphatic versus blood vasculature in chronic skin inflammation. Therefore, we inhibited VEGF receptor (VEGFR) signaling by function-blocking antibodies in the established K14-VEGF-A transgenic (Tg) mouse model of chronic cutaneous inflammation. Although treatment with an anti-VEGFR-2 antibody inhibited skin inflammation, epidermal hyperplasia, inflammatory infiltration, and angiogenesis, systemic inhibition of VEGFR-3, surprisingly, increased inflammatory edema formation and inflammatory cell accumulation despite inhibition of lymphangiogenesis. Importantly, chronic Tg delivery of the lymphangiogenic factors VEGF-C or mouse VEGF-D to the skin of K14-VEGF-A Tg mice completely inhibited development of chronic skin inflammation, epidermal

hyperplasia and abnormal differentiation, and accumulation of CD8 T cells. Moreover, intracutaneous injection of recombinant VEGF-C156S, which only activates VEGFR-3, significantly reduced inflammation. Although lymphatic drainage was inhibited in chronic skin inflammation, it was enhanced by Tg VEGF-C delivery. Together, these results reveal an unanticipated active role of lymphatic vessels in controlling chronic inflammation. Stimulation of functional lymphangiogenesis via VEGFR-3, in addition to anti-angiogenic therapy, might therefore serve as a novel strategy to treat chronic inflammatory disorders of the skin and possibly also other organs.

After having established a role of blood vessel remodeling and lymphatic vessels in chronic inflammation, we then investigated the biological function of the lymphatic vasculature in acute inflammation. We studied two established models of acute cutaneous inflammation, namely oxazolone-induced delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions and UVB irradiation, in K14-VEGF-C and K14-VEGF-D Tg mice. These mice have an expanded network of cutaneous lymphatic vessels. Tg delivery of the lymphangiogenic factors VEGF-C and of the VEGFR-3 specific ligand mouse VEGF-D significantly limited acute skin inflammation in both experimental models, with a strong reduction of dermal edema. Interestingly, expression of VEGFR-3 by lymphatic endothelium was strongly downregulated at the mRNA and protein level, in acutely inflamed skin, and there was no VEGFR-3 expression detectable on inflamed blood vessels and dermal macrophages. There was no major reduction of the inflammatory cell infiltrate or in the composition of the inflammatory cytokine milieu in the inflamed skin of VEGF-C or VEGF-D Tg mice. However, the increased network of lymphatic vessels in these mice significantly enhanced lymphatic drainage from the ear skin. Together, these results provide the first evidence that specific lymphatic vessel activation limits acute skin inflammation via promotion of lymph flow from the skin and reduction of edema formation.

1.2 Zusammenfassung

Obwohl das vaskuläre Remodeling ein Merkmal vieler chronischer, entzündlicher Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, entzündlicher Darmerkrankungen und Psoriasis darstellt, blieben anti-vaskuläre Strategien, um diese Krankheiten zu behandeln, weitgehend unerforscht. Wir untersuchten die anti-inflammatorische Aktivität der systemischen Hemmung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF)-A mit einem inhibitorischen monoklonalen Antikörper, indem wir einen therapeutischen Ansatz in einem Mausmodell der Psoriasis verfolgten, in dem die simultane Deletion von *JunB* und *c-Jun* in der Epidermis adulter Mäuse zu einem Psoriasis-ähnlichen Phänotyp führt. Wir zeigen, dass die anti-VEGF-A Antikörper Behandlung in Mäusen, welche bereits Krankheitssymptome aufweisen, in einer allgemeinen Verbesserung der Psoriasis-Läsionen resultiert, was zur Normalisierung der kutanen Blut- und Lymphgefäße, der epidermalen Differenzierung und einer Reduktion des Entzündungsinfiltrats führt. Diese Resultate zeigen, dass die systemische Hemmung von VEGF-A durch einen inhibitorischen Antikörper zur Behandlung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen wie der Psoriasis verwendet werden könnte.

Weil die Hemmung von VEGF-A im *jun* Mausmodell der Psoriasis beides, die Blut- und Lymphgefäßveränderungen normalisierte, untersuchten wir die Rolle der Lymph- versus Blutgefäßvaskulatur in der chronischen Hautentzündung. Dazu hemmten wir das VEGF Rezeptor (VEGFR) Signaling durch Funktions-hemmende Antikörper im etablierten K14-VEGF-A transgenen Mausmodell der chronischen Hautentzündung. Obwohl die Behandlung mit anti-VEGFR-2 Antikörper die Hautentzündung, die epidermale Hyperplasie, Entzündungsinfiltration und Angiogenese hemmte, verstärkte die systemische Hemmung mit anti-VEGFR-3 Antikörper überraschenderweise die inflammatorische Ödembildung und inflammatorische Zellakkumulation trotz Hemmung der Lymphangiogenese. Wichtig ist, dass die transgene, kutane Überexpression der lymphangiogenen Faktoren VEGF-C oder Maus-

VEGF-D die Entwicklung der chronischen Hautentzündung, die epidermale Hyperplasie und abnormale Differenzierung und Akkumulation von CD8 T-Zellen verhinderte. Desweiteren reduzierte die intrakutane Injektion von rekombinantem VEGF-C156S, das nur den VEGFR-3 aktiviert, die Entzündung signifikant. Obwohl die lymphatische Drainage in der chronischen Hautentzündung gehemmt war, wurde sie durch die Überexpression von VEGF-C verbessert. Diese Resultate enthüllen eine unerwartete, aktive Rolle der Lymphgefäße in der Kontrolle chronischer Entzündungen. Stimulierung der funktionellen Lymphangiogenese via VEGFR-3, zusätzlich zur anti-angiogenen Therapie, könnte deshalb eine neue Strategie zur Behandlung chronischer Entzündungskrankheiten der Haut und eventuell anderer Organe darstellen.

Nachdem wir die Rolle der Blut- und Lymphgefäße in chronischen Entzündungen etabliert hatten, untersuchten wir die biologische Funktion der Lymphgefäße in der akuten Entzündung. Wir untersuchten zwei etablierte Modelle der akuten Hautentzündung, nämlich die Oxazolone-induzierte Hypersensitivitäts-Reaktion vom verzögerten Typ und UVB Bestrahlung in K14-VEGF-C und K14-VEGF-D transgenen Mäusen. Diese Mäuse haben ein dichtes Netzwerk von kutanen Lymphgefäßen. Die transgene Überexpression des lymphangiogenen Faktors VEGF-C und des VEGFR-3 spezifischen Liganden Maus-VEGF-D limitierte die akute Hautentzündung in beiden Modellen signifikant, mit einer starken Reduktion des dermalen Ödems. Die Expression des VEGFR-3 war auf dem Lymphendothel in der akuten Entzündung auf dem mRNA und Protein Level runterreguliert. Und es war keine VEGFR-3 Expression auf entzündeten Blutgefäßen oder dermalen Makrophagen detektierbar. Es gab keine Reduktion des inflammatorischen Zellinfiltrats oder in der Zusammensetzung des Zytokinmilieus in der entzündeten Haut der VEGF-C oder VEGF-D transgenen Mäuse. Jedoch erhöhte das dichte Lymphgefäßnetzwerk in diesen Mäusen den Lymphfluss vom Ohr signifikant. Diese Resultate sind erste Evidenz, dass die spezifische Aktivierung der Lymphgefäße die akute Hautentzündung durch Verstärkung des Lymphflusses von der Haut und Reduktion des Ödems, limitiert.