

平成30年6月7日現在

機関番号：33303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07307

研究課題名(和文) 耳介形態異常の親子の苦痛を軽減する組織学的根拠に基づく耳介矯正装具の開発

研究課題名(英文) Development of an auricle correction harness based on histologic grounds for children with auricular malformations

研究代表者

宮永 葵子(MIYANAGA, Aiko)

金沢医科大学・看護学部・助教

研究者番号：80782367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、効果的で安全性が高い耳介矯正装具を開発することである。耳介軟骨の矯正は、器具により軟骨を変形させることである。その過程は軟骨再生や形成と同様の過程をたどると考えられるため、ウサギの耳介部を用い、軟骨形成モデルを作製した。耳介軟骨の形成に影響する因子として血管新生が大きく関わっていると考えられたため、血管新生に関わる因子であるMMPとVEGFを阻害し軟骨の形成への影響を調べた。その結果、MMP阻害群とVEGF阻害群ともに軟骨膜周辺での新生血管数減少し、軟骨膜細胞の増殖と軟骨細胞分化の有意な抑制を認めた。このことから、耳介軟骨増生に血管新生が強く関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to contribute to the development of a safe and effective correction harness for an abnormal auricle. Because the correction of the auricular cartilage seems to follow a process similar to cartilage reproduction and formation, a cartilage formation model was made with a rabbit's auricle. To examine if vascularization was a factor influencing the formation of auricular cartilage, we evaluated the effects of matrix metalloproteinase (MMP) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which are associated with vascularization, on cartilaginous formation by inhibiting these two materials. The inhibition of MMP and VEGF decreased the number of vessels around the perichondrium, and an increase in perichondrium cells and the differentiation of the chondrocytes were observed. In conclusion, vascularization seems to be strongly related to auricular cartilage formation.

研究分野：創傷看護学、看護理工学

キーワード：耳介形態異常 bFGF MMP VEGF 組織学 血管新生

1. 研究開始当初の背景

(1) 耳介形態異常に対する治療と問題点

先天性の耳介形態異常には主として折れ耳や埋没耳などがあり、160人に1人の割合で発生する。このことから現在日本には80万人の患者がいると推定される。現在行われている治療方法は大きく分けて、手術療法と矯正器具を用いる保存的治療がある。一般的な治療の流れとしては、乳幼児期や幼児期に児の身体的発達過程で形成する軟骨を、矯正器具を用いて好ましい形状に誘導し、その後矯正が得られなかった場合に手術療法を行う。この矯正器具には、針金等の金属をテープで固定する方法、点滴用のチューブに針金を通して耳介に固定する方法などがある。これらの器具を用いて耳介の形態を改善させるのに要する期間は、半年から数年であり、この期間は常に器具を装着する必要がある。しかし、現行の器具は、耳への固定が難しく外れやすいため、効果的に矯正ができない欠点がある。また、外れないように固定を強くすると耳介を圧迫し軟骨の形成を阻害するなどの問題点がある。そこで、効果的かつ安全性が高い矯正器具が開発できないかと考えた。

(2) ウサギ耳介軟骨増生モデルの作製

研究代表者が在籍していた医学研究科研究室では、長年に渡り耳介軟骨の増生に関する研究を行っている。ウサギ耳介軟骨膜近傍に塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を投与することにより、1週間後から耳介軟骨膜細胞の増殖が始まり、3か月後まで増殖が持続した。1か月以降では、増殖軟骨膜組織の弾性軟骨への分化が観察された。そして、bFGFの濃度依存的に増殖・分化誘導が起こった。このことから、bFGFの投与は耳介軟骨膜細胞へ作用し、増殖と分化を誘導した結果、軟骨形成を促すことが明らかとなった。この軟骨膜細胞の増殖過程は軟骨再生や形成と同様の過程をたどると考えられるため、この動物

モデルを使用して、矯正器具の安全性を検証することとした。矯正器具の強固な固定により血流が遮断された場合、軟骨形成にどのような影響があるのかを調べる前段階として、今回は耳介軟骨の形成に血管新生が関わっているのかを調べた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、矯正器具の開発の前段階として、ウサギ耳介軟骨増生モデルを用い、耳介軟骨細胞の増殖と軟骨分化への軟骨膜周辺の血管新生の関与を、血管新生に関わる因子であるMMPとVEGFを阻害し、その影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

雄性日本白色家兔(14~16週、体重2.5~3.5kg、三協ラボサービス、富山)21羽を用いた。金沢医科大学動物実験指針に従い、ペントバルビタール(大日本住友製薬、東京)25mg/kg静注による十分な麻酔下の実験を実施するとともに、人道的エンドポイントを設定し実験動物の苦痛軽減に配慮した。

(2) 実験方法

ウサギ耳介軟骨増生モデルの作製と阻害薬の投与

家兔耳介部を剃毛し、片耳に2カ所、小泉の方法〔1〕に従い孔面の皮下軟骨膜上に100µg/ml bFGF製剤(科研製薬、東京)0.1mlを注入し、サインペンを用い注入部位をマーキングした。同一部位にMMP阻害薬Batimastat(和光純薬工業、大阪)、抗VEGFヒト化中和モノクローナル抗体Bevacizumab(中外製薬、東京)、あるいは陰性対照として生理食塩水各0.1mlを後述の適切な時期に注入した。

阻害薬による血管新生阻害の軟骨膜増殖と軟骨形成への影響の検討

◆ MMP阻害薬を用いた検討

MMP 阻害薬である Batimastat は至適濃度と投与時期の検証を行い、bFGF 投与 24 時間後、投与濃度は 6.25 mM で注入することとした。Batimastat 投与後 1 週間および 2 週間後に組織を採取した。

◆ 抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体を用いた検討

抗 VEGF ヒト化中和モノクローナル抗体である Bevacizumab は先行研究から投与濃度は 25 mg/ml とした〔2〕。柳下の研究から、CD31 陽性血管数は bFGF 注入 1 日後から増加傾向が見られ 3 日後以降に顕著となることが知られているため〔3〕、Bevacizumab を bFGF 投与 30 分後、24 時間後と 48 時間後の 3 回投与とし、1 週間および 2 週間後に組織を採取した。

◆ 組織染色および免疫組織学的染色

組織採取方法は、致死量のペントバルビタール静注による心停止後、耳介を切断し検討組織を採取した。10%緩衝中性ホルマリンにより 24 時間の固定した後、パラフィン包埋し組織切片を作製した。組織染色には、Hematoxylin eosin (HE) 染色に加え、軟骨膜の主要成分である Ⅱ型コラーゲン、軟骨の主要成分である Ⅰ型コラーゲンと血管内皮細胞マーカーである CD31 に対する抗体を用い、ストレプトアビジン・ビオチン法 (Histofine SAB-PO kit, Nichirei, 東京) により免疫染色を行った。

(3) 評価方法

軟骨膜周辺の新生血管

軟骨膜周辺の新生血管評価は、軟骨膜外縁部を含む軟骨膜外側周辺組織 200 μm の範囲を対物レンズ 200 倍で 1 切片あたり 5 ヶ所撮影し、CD31 抗体陽性血管数を計測し総和を算出した。既存の血管との区別のため径 50 μm 以下の血管を新生血管と定義した。

軟骨膜厚の計測

軟骨膜外縁の判定を軟骨膜の主成分である Ⅱ型コラーゲンに対する免疫染色で確認し、HE 染色上で著者が判定した。さらに、耳

介軟骨膜の研究に精通しているアドバイザーが軟骨膜外縁の判定を確認後、切片中央部の長さを画像解析処理ソフト Image J, version 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて計測した。

新生軟骨厚の計測

軟骨の主成分である Ⅱ型コラーゲンに対する免疫染色標本を用い、増殖軟骨中央部の長さを画像解析処理ソフトを用いて計測した。

(4) 統計学的解析

阻害薬投与群と対照群における CD31 陽性血管数、軟骨膜厚と新生軟骨厚に関し、データ分布の正規性を確認後 t 検定で比較解析した。解析には SPSS (Ver. 20, IBM Japan, Ltd, 東京) を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) MMP 阻害薬投与における血管新生、軟骨膜細胞増殖と軟骨形成の抑制

血管新生の抑制

対照群では、軟骨膜周辺組織に、bFGF 刺激 1 週間後、視野あたり 19.8 ± 5.4 、2 週間後 20.8 ± 6.8 の新生血管を認めた。MMP 阻害薬投与群では、1 週間後 1.2 ± 0.8 ($p=0.001$)、2 週間後 1.8 ± 1.6 ($p=0.001$) と血管新生は有意な減少を認めた。

軟骨膜細胞増殖と軟骨形成の抑制

対照群では 1 週間後に $127 \pm 37 \mu\text{m}$ の軟骨膜細胞の増殖を、2 週間後には $92 \pm 26 \mu\text{m}$ の軟骨膜細胞の増殖とその深部に $183 \pm 47 \mu\text{m}$ の軟骨形成を認めた。MMP 阻害薬投与群では、1 週間、2 週間後の軟骨膜増殖は各々、 $60 \pm 17 \mu\text{m}$ ($p=0.003$)、 $29 \pm 15 \mu\text{m}$ ($p=0.01$) と、2 週間後の軟骨形成も $19 \pm 9 \mu\text{m}$ ($p=0.001$) と有意な抑制を認めた。

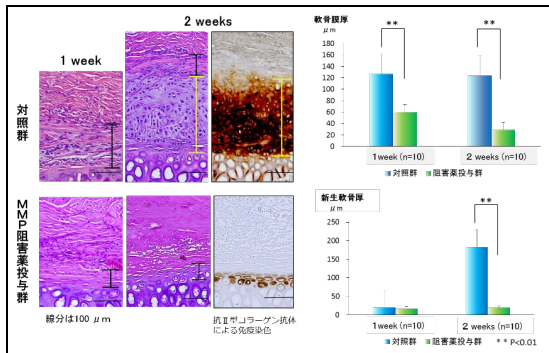


図 1 . MMP 阻害による軟骨増生の抑制

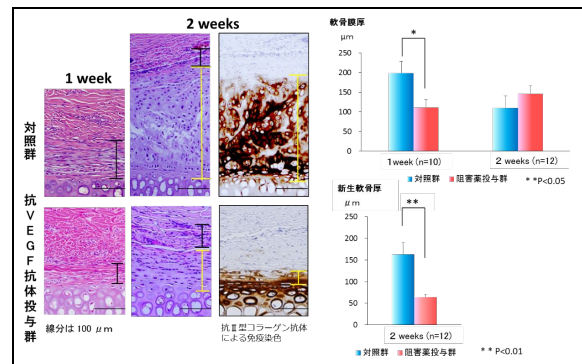


図 2 . 抗 VEGF 抗体投与における軟骨増生の抑制

(2) 抗 VEGF 中和抗体投与による血管新生 , 軟骨膜細胞増殖と軟骨形成の抑制

血管新生の抑制

bFGF 刺激 1 週間後の軟骨膜周辺組織の新生血管数は , 各々の対照群と比較し , 抗 VEGF 抗体投与群 n = 6 では 8.4 ± 5.2 vs 対照群: 14.8 ± 3.2 ($p = 0.04$) , n = 10 では 12.4 ± 4.6 vs 対照群: 20.0 ± 4.4 ($p = 0.03$) と各々有意な減少を認めた。さらに抗 VEGF 抗体投与群では対照群と比較し 2 週間後の新生血管数も , 視野あたり 13 ± 3.4 vs 対照群: 20.6 ± 4.6 ($p = 0.003$) と有意な減少を認めた。

軟骨膜細胞増殖と軟骨形成の抑制

bFGF 刺激 1 週間後の軟骨膜細胞増殖は , 抗 VEGF 抗体投与群: n = 6 では 102 ± 34 vs 対照群: $175 \pm 69 \mu\text{m}$ ($p = 0.04$) , n = 10 では 102 ± 25 vs 対照群: $152 \pm 47 \mu\text{m}$ ($p = 0.03$) と各々有意な減少を認めた (図 4A-D, G, H) 。一方 , 2 週間後の軟骨膜細胞の増殖は抗 VEGF 抗体投与群では 125 ± 39 vs 対照群: $110 \pm 29 \mu\text{m}$ ($p = 0.23$) と差異は認めなかったが , 軟骨形成は 64 ± 25 vs 対照群: $163 \pm 80 \mu\text{m}$ ($p = 0.001$) と有意な抑制を認めた。

(3) 考察

ウサギ耳介軟骨膜の bFGF 刺激により、3 ~ 7 日後に軟骨膜周辺に血管が新生し、引き続き軟骨膜細胞の増殖と軟骨形成が生じる。今回、bFGF 刺激 24 時間後の同部位への MMP 阻害薬投与あるいは抗 VEGF 中和抗体の bFGF 刺激 30 分、24 時間、48 時間後の 3 回投与により、1 週間後の血管新生が減少するとともに軟骨膜細胞の増殖と、2 週間後の軟骨形成が対照群と比較し有意に抑制された。

抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体

Bevacizumab は血管内皮増殖因子 VEGF を標的分子とし、血管新生を抑制することで抗腫瘍効果を発揮する [4] 。本研究では、bFGF 刺激後の 3 回投与した群は対照群と比べ有意な血管新生抑制が認められた。ラット虚血肢への単核球移植により、単核球からの IL-1 分泌による血管内皮と線維芽細胞における VEGF 遺伝子発現誘導が報告されている [5] 。bFGF による耳介軟骨増生モデルでは bFGF 投与 1 日後の軟骨膜周辺組織で単核球の浸潤がみられていることから、抗 VEGF 抗体投与群における血管新生抑制はこの単核球から分泌されたサイトカインに発現誘導された VEGF に起因する血管新生の抑制の可能性が推測される。また、血管新生の抑制と同様に軟骨膜細胞増殖も 1 週間後に抑制されたが、1 週間後は対照群と比較し差異を認めなかった。これは増殖した軟骨膜細胞が 2 週間後

に軟骨分化したためと考えられる。

MMP 阻害薬 Batimastat は合成 MMP 阻害薬であり、MMP-1、2、3、7、9、membrane type (MT)-1-MMP を含む Zn 依存性中性蛋白分解酵素を阻害する〔6〕。血管新生では基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを基質とする MT1-MMP、MMP-2、9 が主要な役割を演ずる。今回の検討では bFGF 刺激 24 時間後に Batimastat を投与することによって軟骨膜周辺組織における血管新生の抑制が観察された。bFGF 刺激後の経時的变化の観察では軟骨膜周辺組織で CD31 陽性新生血管数の有意な増加を 3～7 日後に認めているが、今回の bFGF 刺激後 24 時間後の阻害薬投与により血管新生が抑制された結果から、bFGF による血管新生は bFGF 投与から 1 日以内に生じるプロセスが、以後の血管新生および軟骨前駆細胞増殖・軟骨分化に重要であることが考えられる。これは bFGF 水溶液の皮下注入後、拡散や酵素による分解で 24 時間後には投与量の 3% 以下になるという諸富の報告とも一致する〔7〕。

また、MMP 阻害薬 Batimastat は軟骨膜の主な細胞外基質成分である I 型コラーゲンを分解する MMP-1 の酵素活性抑制効果を有している。柳下は、bFGF 刺激 1～3 日目に MMP-1 陽性マクロファージが軟骨膜周辺に浸潤することと、軟骨膜細胞外基質の主成分である I 型コラーゲンが部分分解し減少することを報告した。今回の MMP 阻害薬 Batimastat による bFGF 刺激 1 週間後軟骨膜細胞増殖の抑制には、この I 型コラーゲン分解の抑制効果が新生血管の軟骨膜への侵入抑制に働いた可能性も推測される。

今回の研究で、MMP 阻害薬と抗 VEGF 抗体の 2 種類の血管新生抑制において、bFGF 刺激 1 週間後の軟骨膜細胞増殖と 2 週間後の軟骨形成の抑制が認められたことから、軟骨膜細胞の増殖開始と軟骨細胞への分化には新生血管が極めて重要な役割を演ずるこ

とを示している。

<引用文献>

〔1〕 小泉尚子：塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) による家兎耳介軟骨膜細胞の増殖・分化誘導とその臨床応用に向けた基礎的研究．金医大誌 2010; 35: 122-30.

〔2〕 Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA et al: Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. Am J Ophthalmol 2006; 142: 162-4.

〔3〕 柳下幹男：ウサギ耳介軟骨再生モデルにおける増殖軟骨膜細胞の動態と影響する因子に関する研究．金医大誌 2013; 38: 43-52.

〔4〕 Zondor SD, Medina PJ: Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. Ann Pharmacother 2004; 38: 1258-64.

〔5〕 Tateno K, Minamino T, Toko H et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. Circ Res 2006; 98: 1194-202.

〔6〕 Raffetto JD, Khalil RA: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol 2008; 75: 346-59.

〔7〕 諸富公昭：塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factorb-FGF) が再生耳介軟骨におよぼす影響について：架橋ゼラチン徐放システムを用いた検討．近畿大医誌 2003; 28: 269-82.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

宮永葵子、bFGF 刺激によるウサギ耳介軟骨

膜細胞増殖と軟骨形成への血管新生の関与、
金沢医科大学雑誌、42(1)、2017、24-31。(査
読あり)

〔学会発表〕(計1件)

宮永葵子、宮永亨、川上重彦、上田善道、
耳介軟骨膜内間葉系組織幹細胞の増殖制御
解除における matrix metalloproteinase と
新生血管の役割、第46回日本創傷学会学術
集会、2016、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮永 葵子 (MIYANAGA, Aiko)

金沢医科大学・看護学部・助教

研究者番号：80782367