

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590686

研究課題名（和文） ラット創傷における血管及びリンパ管新生の形態学的及び免疫組織化学的研究

研究課題名（英文） Morphological and immunohistochemical study on vascular and lymphatic angiogenesis in rat wound.

研究代表者

野上 誠 (NOGAMI MAKOTO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：20218291

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラット皮膚に作成された創の治癒過程における血管、リンパ管新生の形態学を明らかにし、血管とリンパ管では修復過程が形態学的に異なることを明らかにした。また、血管新生過程において重要な因子であるVEGF産生に、創早期から浸潤する白血球が重要であることを、シクロホスファミドによる白血球減少を用いて明らかにした。さらに、電子顕微鏡像及び免疫染色により創部の血管内皮の分裂像が新たな知見として観察された。

研究成果の概要（英文）：In this research, we clarified the morphological difference in the healing process between the vascular and lymphatic vessels. We also showed the important role of leucocytes in the early stage production of VEGF in the skin wound. As a novel observation, we identified mitotic vascular endothelial cells in the electron microscopy and in immunohistochemistry.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医病理学

1. 研究開始当初の背景

創傷の治癒過程で創傷部の障害を受けた血管が再生するときに働く因子としては血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)などが知られているが、実際に損傷部の血管が微細形態学的にどのような過程を経て正常な血管に回復するかはほとんど検討されていない。創傷部の血管新生の微細形態学的な過程を明らかにすることは、生体の修復機転を把握する上にきわめて重要であ

る。広義の血管新生には2通りの機構が知られている。1つは発生初期に内皮細胞の前駆細胞である血管芽細胞から全く新しい血管が発生する脈管形成であり、もう1つはすでに組織に存在する血管系からの内皮細胞の増殖、遊走による血管枝の形成である狭義の血管新生である。創傷においてこのいずれが主体を占めているか、また、脈管形成が存在するかについては検討されておらず、これらを明らかにすることは、創傷治癒に重要な知

見を与えるものである。また、本研究代表者は、パラフィン切片を用いた免疫組織化学及びELISAによる定量により、創部は早期からVEGFを産生していることを確認しており、これが血管をどのように誘導しているかを形態学的に明らかにすることは、創傷時の組織の再構築のプロセスを明らかにし、ひいては創傷時の治療にも資する知見をもたらすと考えられる。

また、創傷においてはリンパ管も損傷されているが、その修復、再生がどのように生じるのかについてはいまだ不明であり、リンパ管の再生過程を形態学的に明らかにすれば、まったく新しい知見である。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、創傷治癒過程における血管・リンパ管の修復機転、すなわち血管新生・リンパ管新生を法医学領域における創傷鑑定に役立てることにある。これは血管の修復機転がどの段階にあるかを調べることによって、損傷の古さを推定することに役立つものと考えられるからである。

3. 研究の方法

(1) リンパ管形成の経時的变化について検討を行った。方法として、SDラット(オス、6週)にエーテル麻酔下で背部皮膚に切創を作成し、創作成一定期間後にエーテル麻酔下で屠殺した。創傷部の皮膚を採取し、パラフィン切片作成後、Podoplanin, CD31, Podoplanin-vWF 二重染色の免疫組織化学染色標本を作製した。

(2) 創傷時の血管の修復過程における血管新生の形態変化を、電子顕微鏡を用いて検討した。すなわち、SDラット(オス、6週)にエーテル麻酔下で背部皮膚に切創を作成し、創作成一定期間後にエーテル麻酔下で屠殺した。創傷部の皮膚を採取し、パラホルムアルデヒド固定、オスミウム固定し、エポキシ樹脂包埋後、超薄切し、透過型電子顕微鏡で観察した。さらに、創部の組織のパラフィン切片作成後、PCNA免疫染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

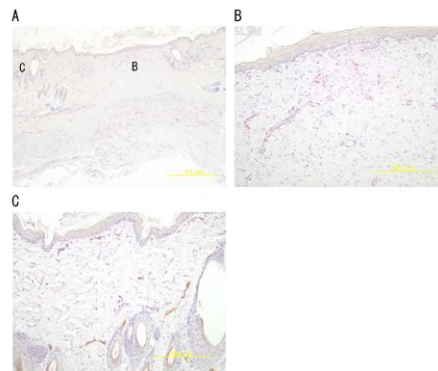
(3) 本研究では、これまでに血管新生に重要な因子であるVEGFが、創部に早期から産生されていることを明らかにしてきた。さらに、VEGFの免疫染色により、これが、創に早期から浸潤する白血球に由来する可能性を明らかにしてきた。そこで、本研究では、このVEGF産生が、白血球に由来する程度を検討するため、SDラットにシクロホスファ

ミドを投与して白血球を減少させた上で、背部皮膚に創を作成し、創部のVEGF産生とVEGFのmRNAのreal time RT-PCR法による半定量を行った。

4. 研究成果

(1) リンパ管形成の経時的検討では、ラット皮膚に作成された創における血管およびリンパ管再生の過程と特徴の相違点を明らかにした。すなわち、血管再生は創内部で生じるが、リンパ管再生は創内部では生じず、周囲のリンパ管が創部の瘢痕収縮に伴って周囲から中心に移動していくことが明らかとなり、再生過程の違いが明らかとなり、創の修復過程の法医病理学的診断に寄与する知見が得られた。

すなわち、創作成5日後より創傷部に新生血管の増生は見られたが、リンパ管は84日後でも見られなかった。血管は創傷部の肉芽組織内に受傷後に発生するが、リンパ管は創傷部肉芽組織に発生するのではなく、創傷部が健常組織に置き換わることにより、発生することが明らかになった。



創作成 28 日後の vWF・podoplanin 二重染色

A HE 染色

B 創中心部の二重染色

C 創辺縁の二重染色

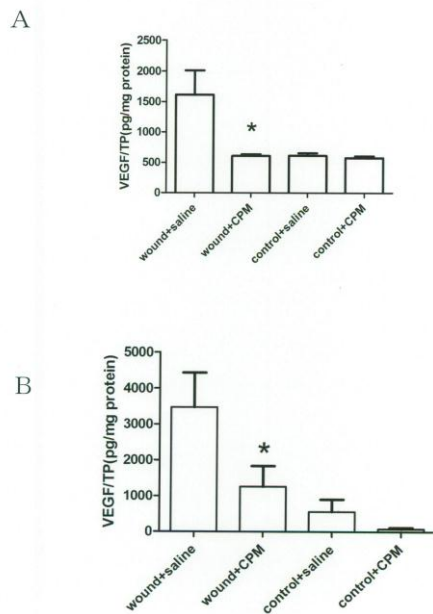
Bでは血管新生を示すvWFのみ陽性であり、リンパ管新生を示すpodoplaninは陰性である。(雑誌論文① Legal Medicine 2009;11:213-218より)

(2) 血管修復過程における透過型電子顕微鏡像では、創部の血管内皮細胞に分裂像が認められ、これは新しい知見と考えられた。光学顕微鏡にてPCNA免疫染色標本で、内皮細胞陽性像が確認され、その時間的経過を検討したところ、創作成後早期に陽性となる傾向が見られた。

(3) 創部における VEGF 産生における白血球の役割を検討した結果、VEGF の産生細胞として、局所に早期に浸潤する白血球が重要であることが、シクロホスファミドによる抑制で新たな知見として明らかにされた。

すなわち、シクロホスファミドをSDラットに投与して、白血球を継続して減少させた上で、皮膚に創を作成し、創部における VEGF 産生量の定量を行い、さらに、VEGF の mRNA を半定量した。

その結果、シクロホスファミド投与下では、VEGF 産生と、VEGF mRNA 発現量が、創作成 1 日後と 3 日後で、有意に減少していた。

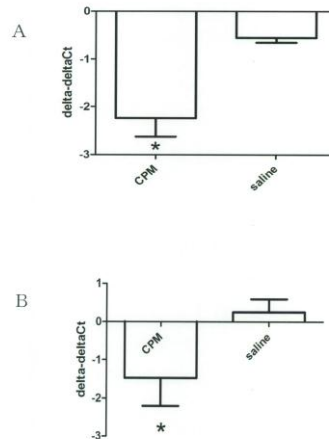


A 創作成 1 日後の VEGF 産生

左から創部コントロール、シクロホスファミド投与下の創部、健常組織コントロール、シクロホスファミド投与下の健常組織

B 創作成 3 日後の VEGF 産生

左から創部コントロール、シクロホスファミド投与下の創部、健常組織コントロール、シクロホスファミド投与下の健常組織



A 創作成 1 日後の創部における VEGF mRNA 発現量

左がシクロホスファミド投与下、右がコントロール

B 創作成 3 日後の創部における VEGF mRNA 発現量

左がシクロホスファミド投与下、右がコントロール

(雑誌論文 ① Legal Medicine 2010;12:128-131 より)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Makoto Nogami, Tomoaki Hoshi, Yoko Toukairin, Tomomi Arai.

Vascular endothelial growth factor in the early stage of skin incision wounds in cyclophosphamide-induced leukocytopenic rats.

Legal Medicine 2010;12:128-131 査読有

② Makoto Nogami, Tomoaki Hoshi, Tomomi Arai, Yoko Toukairin, Michiho Takama, Ichiro Takahashi

Morphology of lymphatic regeneration in rat incision wound healing in comparison

with vascular regeneration.

Legal Medicine 2009;11:213-218 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

① 高橋一郎、高間みちほ、星 智昭、東海林洋子、新井智美、野上 誠
創傷治癒過程における血管新生の微細形態学的検討
日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会、仙台、
2009 年 5 月 27 日

② 星智昭、新井智美、東海林洋子、野上誠
ラット皮膚創における V E G F 産生に対するシクロフォスファミドの影響
第 93 次日本法医学会学術全国集会 大阪、
2009 年 5 月 15 日
(抄録:日本法医学雑誌 64 (1)、89 頁、2009)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野上 誠 (NOGAMI MAKOTO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：20218291

(2) 研究分担者

高橋 一郎 (TAKAHASHI ICHIROH)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：40091045

(3) 連携研究者

なし