

機関番号：14501  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20592098  
 研究課題名 (和文) 脈管奇形病変における血管とリンパ管の客観的識別及びその3次元構造の解明と臨床応用  
 研究課題名 (英文) Clarification of the three-dimensional structure of vascular malformations by objective differentiation between blood vessels and lymphatic vessels, and its clinical application  
 研究代表者 一瀬 晃洋 (ICHINOSE AKIHIRO)  
 神戸大学・医学部附属病院・准教授  
 研究者番号：90362780

研究成果の概要 (和文) : 我々が新規に開発した LYVE-1 抗体を含む免疫組織化学を用いて、脈管奇形の病的脈管の詳細な病理学的解析を行った。本研究では、リンパ管奇形や静脈奇形等、同じ脈管奇形に分類されている病的脈管であっても、その内皮細胞識別マーカーの発現性の相違が証明された。すなわち、それらの脈管奇形は病理発生的に同一起源ではない可能性が示唆されるものである。また、本技術を応用することで各種微小脈管の正確な病理診断が容易になり、消化器の早期癌の微小リンパ管浸潤の正確な診断や、冠動脈疾患においても治療方針決定に有用であることが証明された。

研究成果の概要 (英文) : Immunohistochemical examinations were performed on the morbid vessels of vascular malformations using bountiful immunohistochemical markers of vascular endothelial cells including LYVE-1 antibodies, which we had recently developed. This study demonstrated that various patterns of immunohistochemical markers were expressed in vascular malformations which could be classified in the same category of vascular malformations such as either lymphatic vessel malformations or venous malformations. This suggests that they follow a different pathogenesis. In addition, the immunohistochemical method has made it easier to properly diagnosis the pathology of various microvessels. It has been demonstrated that this method is useful for accurate diagnosis of microinvasion into the small lymph vessels during the early stages of gastroenterological carcinoma and in determining the proper management of coronary disorders.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：形成外科学

科研費の分科・細目：再建外科学

キーワード：脈管奇形、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脈管奇形は難治性の疾患である。外科的手術が困難な症例は少なくなく、硬化療法やレーザーなどによってもその治療効果にはなお限界がある。新規治療法の開発および既存の治療の最適化のためには、脈管奇形の本態を明らかにすることが鍵と言えるが、その礎となる病理学的構造は十分に解明されていない。その理由は、従来はリンパ管や血管の完全な識別方法が欠如していた中で、病理学的検索がなされていたためである。研究者らは、リンパ管内皮細胞表面に存在するヒアルロン酸レセプターの一つである LYVE-1 蛋白に対するウサギポリクロナール抗体を作製し、パラフィン包埋組織片において、リンパ管認識に対し他を凌駕する能力を発揮することを確認した。本技術により脈管の客観的識別が容易になるため、血管奇形の病理学的構造の解明に有用である。

## 2. 研究の目的

本研究は、皮下軟部組織に発生する各種脈管奇形（動静脈奇形、静脈奇形、リンパ管奇形など）について、LYVE-1 抗体を主体とした脈管識別マーカーによる免疫組織化学を施行し、これらの病変を構成する病的な動脈・静脈・リンパ管の組織構築の解析を通じて、病変の起源と発生機構を検証し、さらに脈管奇形に対する治療成績向上のための、基礎的背景を得ることを企図するものである。

## 3. 研究の方法

実験計画に基づいて、脈管奇形と考えられてきた脈管構造を、動脈、静脈およびリンパ管の内皮細胞を鑑別するマーカーを用いて、病理組織学的検索を行った。2001-2008年に神戸大学附属病院医学部形成外科で治療を行った脈管性病変症例のうち、生検または切除を施行した症例について、パラフィンブロック標本を蒐集した。解析の結果、病的脈管構築の病理組織学的検索に成功した症例は29例であった。病理組織学的検索の主体は、LYVE-1 抗体などの脈管内皮細胞識別マーカーを用いた免疫組織化学であるが、病変として構成している動脈・静脈・毛細血管・リンパ管の組織構築の解析も行った。そのために、蒐集したパラフィンブロックから連続薄切

切片を作製し、次の3種の染色をそれぞれ等間隔で施行した。①静脈組織構築を客観的に把握するために HE 染色、②リンパ管内皮細胞の同定のために、LYVE-1 抗体を用いた免疫組織化学、③リンパ管と他の脈管組織との識別のために、von Willebrand factor 抗体 (DakoCytomation) を用いた免疫組織化学。これら免疫組織化学に必要な LYVE-1 抗体は、実験計画に基づいて野兔を免疫して作製した。さらに、上記の検討に加えて、各脈管奇形の臨床像について、その発症時からの臨床経過、診断画像、治療経過、硬化療法の効果などを詳細に検討した。

本研究の初期の計画では、脈管奇形発生の本態の解明には、その立体構築の相違点を明らかにすることが重要と考えていた。しかしながら、病的脈管の内皮細胞は、正常な動脈・静脈・リンパ管の内皮細胞に認められる特徴的な発現様態を示さないことが明らかになった。したがって、病変を構成する脈管内皮細胞の起源を明らかにすることこそが、疾患の本態解明のために重要と考えて、実験計画の変更を行った。すなわち、脈管のマーカーである、④GLUT 1 および⑤D2-40 の免疫染色をさらに追加して実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 脈管奇形の解析結果

静脈奇形とされた病変は、すべて LYVE-1 陰性かつ vWF 陽性であった。したがって、vWF 抗体を用いた免疫染色で陽性、LYVE-1・D2-40 免疫染色ともに陰性、さらに GLUT1 陰性であれば、静脈奇形と診断できる可能性が高いと思われた。リンパ管奇形では、vWF 陽性、GLUT-1 陰性であるが、LYVE-1 抗体および D2-40 の発現が一樣ではなく、様々な染色結果が得られた。臨床ではリンパ管奇形と診断された症例でも、LYVE-1・D2-40 の両者ともに発現のない症例が認められた。また、同一症例でも生検を行った時期により、これら蛋白発現が異なるという興味深い結果も得られた。動静脈奇形および毛細血管奇形とされていた症例でも、LYVE-1 や vWF の内皮細胞における発現が一樣ではなく、GLUT 1 および D2-40 の発現様態も様々なであった。本研究での詳細な病理学的検討により、同じ病理診断の血管性病変であっても、その構成

脈管の内皮細胞の各種血管・リンパ管識別マーカーに対する染色性が異なる病変が多く存在することが明らかとなった。現在、いくつかの血管・リンパ管内皮細胞のマーカーが知られているが、その血管・リンパ管の内皮細胞における染色態度は異なる。脈管を構成する内皮細胞は、血管・リンパ管に完全に分かれるものでなく、幹細胞からの分化の違いにより、内皮細胞膜の蛋白発現や細胞質内産生蛋白が異なるとされる。本研究では、臨床診断が同じ脈管奇形でも、内皮細胞識別マーカーの発現に相違がみられたが、この事実から考慮すると、病理発生的にはそれら脈管奇形は同一起源ではない可能性が示唆される。すなわち、これまでの血管性病変の分類は、病理学的技術が未発達な状態における分類であり、病因が異なる血管性病変を一括りに分類してきた可能性がある。その臨床像に関しても、同じ脈管奇形に分類された疾患でも著しく異なる臨床像を示すことがあり、あるいは治療の途中で臨床像が変化することもある。病理学的特性の違いが、臨床像に関連する可能性が示唆されるところもあり、症例を増やして詳細な検討を進めている。現在、脈管奇形の再分類を目指して、さらにCD34などの脈管内皮細胞マーカーを用いた免疫組織化学や電顕観察による検討も行っている。これらの研究結果に関しては、国際学会にて報告を行った。

#### (2) LYVE-1 を含めた脈管染色技術の発展

LYVE-1 抗体の特許は、研究社らの関連グループが取得したが、本研究で発展させた技術により、リンパ管を介した癌転移に関しても多くの知見を得た。特に、消化器癌のリンパ行性転移の詳細を確認できたことの意義が最も大きい。本脈管染色技術により、消化器の微細なリンパ管の構造が明らかになり、癌の微少リンパ管への浸潤状況が正確に把握できるようになった。例えば、粘膜内癌では、実際には微小リンパ管浸潤を認めるものやそうでないものが存在することがわかった。これまで画一的な切除がなされていた病変であっても、本技術により詳細なリンパ管の検索を行って、より正確な切除方針を検討可能となった。また、冠動脈疾患においても、本研究で発展させた脈管染色技術が、診断・治療方針決定に有用であることを確認した。

これらの研究成果は、複数の英文論文に上梓した。

#### 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24件)

①Akishima-Fukasawa, Y, Ishikawa, Y(2番目), Ichinose, A(10番目), Ishii, T, et al. Histopathologic Predictors of Regional Lymph Node Metastasis at the Invasive Front in Early Colorectal Cancer. Histopathology, in press, 査読有

② Matsumoto, N, Ishikawa, Y(9番目), Ishii, T et al. Prognostic value of LYVE-1-positive lymphatic vessel in tongue squamous cell carcinomas. Anticancer Res, 30: 1897-1903, 2010, 査読有

③Ishikawa, Y(筆頭), Akasaka, Y, Ishii, T, et al. Anatomic properties of myocardial bridge predisposing to myocardial infarction. Circulation, 120: 376-383, 2009, 査読有

④Ichinose, A(筆頭), Ishikawa, Y(8番目), Terashi, H, Ishii, T, et al. Objective recognition of vascular lesions in Mondor's disease by immunohistochemistry. J Eur Acad Dermatol Venereol, 22: 168-173, 2008, 査読有

⑤ Ishikawa, Y(筆頭), Akishima-Fukasawa, Y, Ishii, T, et al. Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer. Cancer, 112: 924-933, 2008, 査読有

[学会発表] (計5件)

①Nagata, I, Ichinose, A, Tahara, S. Immunohistological examination of hemangiomas and vascular malformations The 10th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 2010年6月16日, Pusan

②永田育子、一瀬晃洋、田原真也、血管性病変 (vascular malformation および hemangioma) における血管とリンパ管の客観的識別の研究、第53回日本形成外科学会総会・学術集会、2010年4月9日、金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬晃洋 (ICHINOSE AKIHIRO)  
神戸大学・医学部附属病院 准教授  
研究者番号：90362780

(2) 研究分担者

田原 真也 (TAHARA SHINYA)  
神戸大学・医学部附属病院 教授  
研究者番号：30276894

石川 由起雄 (ISHIKAWA YUKIO)  
東邦大学・医学部 准教授  
研究者番号：30276894