

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670751

研究課題名(和文)血管奇形における神経性の分子機構解明と血行動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular system of vascular malformations in relation to nerve and hemodynamics

研究代表者

秋田 定伯 (Akita, Sadanori)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：90315250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：より副作用の少ない血管奇形治療法の開発が"神経"系の血管奇形への関与メカニズム解明が重要である。1. 虚血モデルへの組織への血流付加について、細胞群との比較検討し、"神経"系の関与について細胞膜受容体アダプター(接合)分子(Shc) KO mouseを用いると血流は2週でvon Willebrand因子による総血管密度を有意に上昇させた。2. Shc欠損マウスモデルでは1×1 cm<sup>2</sup>の肉様膜を含めた全層欠損への人工真皮による被覆では6日までに対象群は創の完全閉鎖を認めたがShc欠損群では全く閉鎖しなかった。

研究成果の概要(英文)：Vascular malformation is a limit of quality of life, such as limited range of motion and headache admit. Because studies have examined systematically the correlation of peripheral nerves and blood vessels, blood vessels of the circulatory system peripheral tissues and hemodynamics. 1. For blood flow added to the tissue to the ischemic model, the involvement of the system "nerve", and compared with the fat stem cell population adapter of cell membrane receptor tyrosine kinase domain (junction) molecules (Shc-adapter protein) knockout mouse model using. 2. As a result of considering the relationship between the wound and angiogenesis and nerve regeneration, one in the lower extremities 20Gy irradiation after iliac artery ligation rat model. It is necessary to investigate further as vascular malformation approximate model by nerve-binding protein genetically engineered mouse models and ischemic rat vascular system operation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：血管奇形 動静脈奇形 神経系 細胞 虚血 組織弁

## 1. 研究開始当初の背景

血管奇形は、血管の異形性などに伴い局所に血流の過剰流入・貯留があり、一部に創傷治癒遅延や、うっ滞する血流のため、疼痛と可動域制限など生活の質の制限を認める。また、疼痛など知覚神経異常が長期間残存することがあり、より副効果の少ない治療方法の開発が“神経”系の血管奇形への関与とメカニズム解明と共に重要である。血管奇形治療における局所循環動態の調節と臨床分類での塞栓療法が高流量(high flow)動脈奇形の第一選択であり、局所血流制御に高い治療効果を示している。比較的流量の遅い静脈優位血管奇形であっても、血流制御(flow control)は重要であり、硬化療法の治療結果に大きく影響を及ぼす。臨床治験では血管奇形(主に静脈奇形)への硬化療法で病変の制御が得られ、低侵襲で大きな臨床的効果を得ている(Akita S, et al. J Craniofac Surg, 17: 729-735, 2006)。血流異常で局所創傷治癒に影響を及ぼす病態として動脈硬化症、血栓症、静脈うっ滞性疾患などの血管内皮病変、血管壁病変(平滑筋異常)病変及び循環動態に関わる細胞や疾患モデルの検討や循環系と関連した糖尿病・脂質異常などの代謝異常に関する研究が盛んに行われているものの、末梢組織の血管、血流調節および血流動態(ヘモダイナミクス)、更に発展させて血管・循環系と末梢神経の相関について体系的に検討した研究は少ないため、神経系と組織血流の相関について、分子基盤を明らかにする。

## 2. 研究の目的

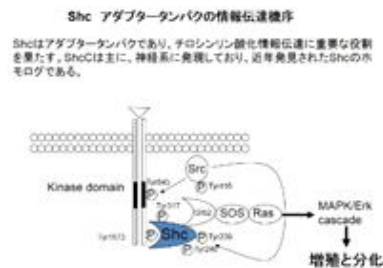
これまでに、血管内皮細胞に対する硬化剤(無水エタノール、ポリドカノール、モノエタノールアミン)をin vitro で用いて硬化プロセス・効果・安全性を中心に学会、論文報告されているものの、血管奇形治療の臨床を反映する生体内での作用と神経と関連は未だに確立されていない。特に全身的な血管奇形と末梢神経の関与について、詳細な検討はなされていない。血管奇形の発生機序、治療方法確立と局所未梢神経の関与について、神経特異遺伝子発現の詳細な検討しつつ既に、神経系遺伝子改変マウス(ShcC “ノックアウト”マウス)由来線維芽細胞を用いた古典的MAPキナーゼのリン酸化の発現低下(Erkカスケード発現)を認めており、血流負荷(変化)に伴う生体内での神経系を介した調整と病態解析、効果的な治療方法の提案を検討する。これまでに研究代表者は古典的MAPキナーゼリン酸化発現(Erkリン酸化発現)は1分~30分で、サイトカイン遺伝子導入線維芽細胞において、血管新生因子の刺激により変化することを認めており、同様の検討が可能と思われる(Akita S, et al. J Dermatol Sci,

2004)。

## 3. 研究の方法

### 1) 神経系創傷モデル

神経系の創傷への関与を考察する上で、Shc アダプター分子に着目し、その遺伝子欠損モデルにおける創傷治癒について検討を加える。Shc 分子は結合して神経系細胞の増殖、成熟、分裂、を神経幹細胞からニューロンへの分化を促進するとされており、チロシンリン酸化末端を有している。



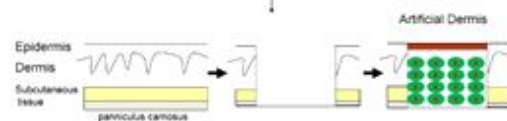
### ShcC 実験モデル

ShcC の働きについて ShcC 遺伝子欠損マウス(ShcC KO)とその野生型マウス(C57/BL6, WT)マウスの人工真皮のみを用いた創傷治癒モデルで検討する。

### ShcC欠損マウスモデルにおけるADSCを用いた人工真皮創傷治癒モデル

これまでに、ヒト間葉系幹細胞(骨髄由来)が皮膚欠損モデルで皮膚・軟部組織再生を促進することを報告しており(Nakagawa H, et al. British Journal of Dermatology 153: 1) 29-36, 2005)

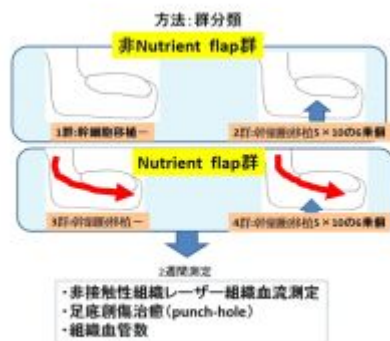
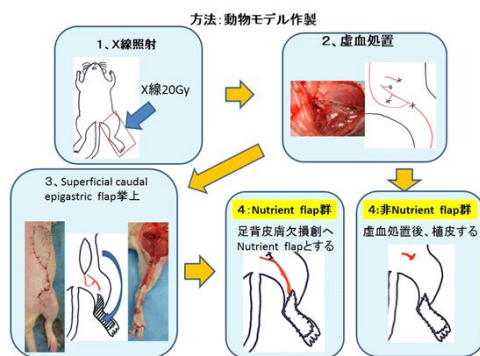
ShcCの皮膚再生における役割を検討した。



### 2) 下肢血流遮断モデルにおける血行改善のための皮弁付加と幹細胞治療効果

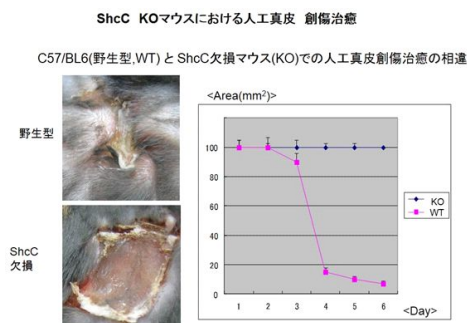
虚血肢治療においてはバイパス術などの血行再建を行うことが必要となりますが、主要血管のバイパス・血管拡張術など血行再建のみでは末梢組織に充分量の血流が供給されない。これは血管奇形モデルにも応用可能であり、臨床的観点から検討した。皮弁付加による方法と ShcC 欠損モデルでも用いた幹細胞による方法を比較検討し、血管奇形の制御と再生機序解明の基盤モデルとした。

ラット左後肢全体に X 線を 20 間 delay させ、総腸骨動静脈に至るまで分枝を剥離結紮後、大腿動静脈を浅腹壁動静脈分岐部や Gy 照射し放射線障害化しその後足背まで到達する浅腹壁動静脈を茎とする結合織弁を挙上し 1 週や末梢で結紮することで解剖学上、後肢は総腸骨動静脈結紮と同等とした。虚血処置後、浅腹壁動静脈を茎とする結合織弁をいわゆる Nutrient flap として足背皮膚欠損創へ移動させる群、Flap を栄養血管基部で切除し、足底皮膚を切除しその皮膚をそのまま植皮とする、非 Nutrient Flap 群に区別し検討した。

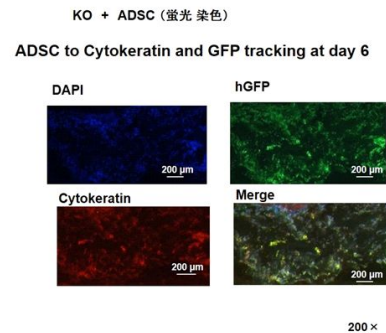


#### 4. 研究成果

1) 1 × 1 cm<sup>2</sup> の肉様膜を含む欠損部では、KO マウスは術後 6 日でも全創治癒しないが、WT では術後 3 日から 6 日までに 10%、85%、90%、93% の創治癒を認めている。

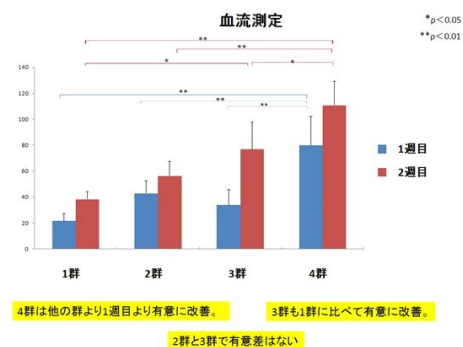


本モデルに、WT 脂肪由来幹細胞を培養し、第 2、第 3 継代目のみの細胞を GFP (Green Fluorescent Protein) ラベルし、1 × 10<sup>6</sup> 個細胞を人工真皮ともに用いて、細胞の動向と分化程度を検討したところ、移植した細胞成分と GFP で追跡できる細胞が共発現しており、



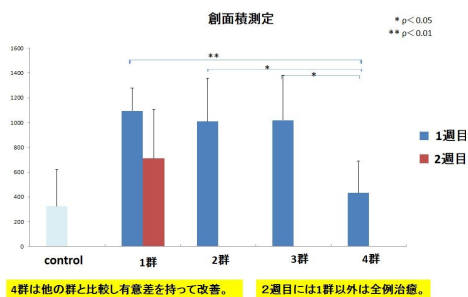
創治癒も術後 3 日から 6 日までに 20%、70%、80%、85% の創治癒を認めている。

2) 下肢虚血モデルにおける皮弁 (flap) 付加、幹細胞治療の血流、創面積、血管新生で示す 1 週目の血流データでは 4 群、2 群、3 群、1 群に血流は良好であり、2 群と 3 群に有意差はなかった。4 群は他の群と比較し 1 週目より血流が有意に改善した。赤で示す 2 週目ではは全体的に 1 週目に比べて改善しており、4 群が一番良くて 1 群が一番悪く、2 群と 3 群に有意差はない。3 群は 2 週目で 1 群に比べて有意に血流が改善しており、1、2 週とも 2 群と 3 群で有意差は認めない。



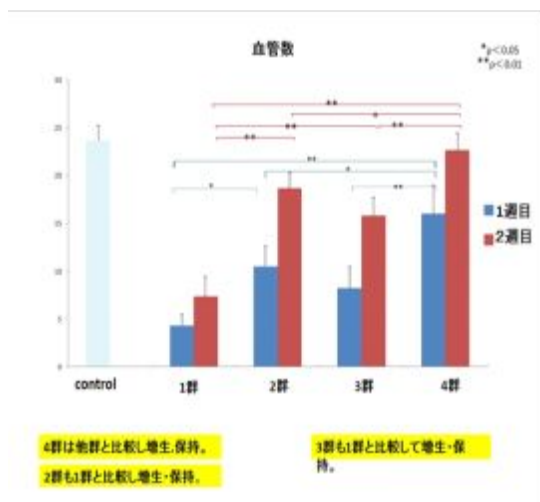
創面積は青で 1 週目を示し、第 4 群は他の群と比較して有意差を持ち、創閉鎖しており、他の群間に有意差は認めない。赤の 2 週目で

は、第 1 群以外は全例治癒しています。尚、第 1 群の壊死症例はこの統計に含んでいない。



血管数は von Willebrand 因子発現で検討し、青の 1 週目では、血管数においても 4 群が 1 番多く、多い順位に 2 群 3 群 1 群であることは血流の結果と同じです。4 群は他の群と比較して 1 週目より有意差を持って増生・保持している。2 群も 1 週目より 1 群と比較して有意差を持って血管数が増生・保持できている。

赤の 2 週目では、全群 1 週と比較して増加し順位変わりませんが 3 群が 2 週目になると 1 群と比較して有意差をもって血管数が増生・保持できている。2 群 3 群に有意差は 1.2 週とも認めない。



以上、ShcC 欠損モデルによる創傷治癒、下肢虚血モデルにより、血管奇形モデルとしても幹細胞を用いた治療解析は有用であり、組織血流、血管新生、再生程度を改善しようと推察された。

## 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 9 件 )

. Houbara S, Akita S, Yoshimoto H, Hirano A. Vascular malformations than were diagnosed as or accompanied by malignant tumors.

Dermatol Surg, 2014, in press. 査読有

. Tanaka K, Akita S, Yoshioto H, Houbara S, Hirano A. Lipid-colloid dressing shows improved re-epithelialization, pain relief and corneal barrier function in split-thickness skin-graft donor site wound healing.

Int J Low Extrem Wounds, 2014, in press. 査読有

. Akita S, Akino K, Hirano A.

Basic fibroblast growth factor in scarless wound healing.

Adv Wound Care, 2(2): 44-49, 2013 査読有

. Akita S. Houbara S, Hirano A.

Management of vascular malformations.

Plast Reconstr Surg Glob Open 2014;2:e128;doi:10.1097/GOX.0000000000000079 査読有

. Akita S, Yoshimoto H, Yamanobe Y, Murakami R. Post-operative management by telemetry/tele-medicine system.

The Journal of Wound Technology, 16: 16-18, 2013. 査読有

. Hamuy R, Kinoshita N, Yoshimoto H, Hayashida K, Houbara S, Nakashima M, Suzuki K, Mitsukawa N, Mussazhanova Z, Kashiya K, Hirano A, Akita S.

One-stage, simultaneous skin grafting with artificial dermis and basic fibroblast growth factor successfully improves elasticity with maturation of scar formation.

Wound Repair Regen, 21: 141-154, 2013. 査読有

. Akita S, Houbara S, Akatsuka M, Hirano  
A. Vascular anomalies and wounds.  
J Tissue Viability, 22: 103-11, 2013 査  
読有

. 秋田定伯  
創傷治癒・創傷治療における“幹細胞”の意  
義と役割  
創傷 4: 135-139, 2013 査読有

. 秋田定伯、平野明喜  
創傷の定義  
形成外科、2013, 56: 901-905 査読有

[学会発表](計14件)

. 吉田周平、浜田裕一、Rodrigo Hamuy、  
吉本 浩、中島正博、平野明喜、秋田定伯  
下肢リンパ浮腫モデルにおける脂肪由来幹  
細胞を用いたリンパ管再生療法  
第43回日本創傷治癒学会、研究奨励賞講演、  
2013年11月14日、別府

. 秋田定伯  
“間葉系”幹細胞を用いた創傷治癒と組織  
再生  
第43回日本創傷治癒学会、特別講演、  
2013年11月14日、別府

. 秋田定伯、吉本 浩、吉田周平、林田健  
志、平野明喜  
培養脂肪幹細胞の細胞分化制御と小胞体ス  
トレス増強とアポトーシス誘導  
第22回日本形成外科学会基礎学術集会、  
シンポジウム、2013年11月7日、新潟

. Hayashida K, Fujioka M, Akita S  
Innovation in wound healing: human  
recombinant basic fibroblast growth  
factor (bFGF)  
International Wound Conference 2013,  
Invited Lecture, October, Kuala Lumpur,  
Malaysia, October 19, 2013

. Akita S  
Asian wound care, where are we now?  
International Wound Conference 2013,  
Invited Lecture, October, Kuala Lumpur,  
Malaysia, October 18, 2013

. Akita S  
Asian wound care, where are we now?  
International Wound Conference 2013,  
Invited Lecture, October, Kuala Lumpur,  
Malaysia, October 18, 2013

. Akita S  
Wound care delivery in the Asia Pacific  
Region (stem cells, growth factors,  
artificial dermis, etc.)  
International Wound Conference 2013,  
Invited Lecture, October, Kuala Lumpur,  
October 18, Malaysia, 2013

. Akita S, Yoshimoto H, Houbara S, Hirano  
A  
Adipose-derived regenerative cells  
increase fat tissue volume in lipotrophy  
and successfully heal intractable wounds  
3<sup>rd</sup> annual meeting of Cell Society, San  
Diego, September 19, 2013

. 秋田定伯、吉本 浩、吉田周平、林田健  
志、平野明喜  
我が教室のケロイド研究史と今後の展開  
-Where are we going?-  
第8回癬痕・ケロイド治療研究会、パネルデ  
ィスカッション、2013年8月31日、札幌

. 秋田定伯、吉本 浩、芳原聖司、林田  
健志、平野明喜  
脂肪幹細胞と放射線障害、脂肪変性疾患に対  
する小胞体ストレス及 bystander response  
第5回日本創傷外科学会、パネルディスカッ



ション、2013年7月11日、京都

. Akita S.

New strategies for wound healing and regenerative medicine in plastic surgery 3<sup>rd</sup> Research and Reconstructive Forum, Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons, Daegu, Korea, May 9, 2013

. Yoshida S, Hamada Y, Hamuy R, Yoshimoto H, Nakashima M, Hirano A, Akita S  
Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse model of lymphedema  
SAWC/WHS annual meeting, Denver, USA, May 4, 2013

. 秋田定伯、芳原聖司、赤塚美保子、平野明喜  
当科における動静脈奇形治療の検討  
第56回日本形成外科学会学術集会、2013年4月3日、東京

. 芳原聖司、赤塚美保子、吉本 浩、秋田定伯、平野明喜  
血管奇形が疑われ硬化療法を併用した悪性腫瘍の治療経験  
第56回日本形成外科学会学術集会、2013年4月3日、東京

〔図書〕(計5件)

. Murakami C, Fujioka M, Akita S.  
How to manage radiation injuries. Skin Necrosis, Eds. Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S, Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, in press. 査読有

. Akita S.  
Necrotizing fasciitis. Skin Necrosis, Eds. Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S, Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, in press 査読有

. Akita S, Akatsuka M.  
Surgical debridement. Skin Necrosis, Eds. Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S, Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, in press. 査読有

. Akita S, Houbara S, Akatsuka M.  
Imaging, vascular assessment: Extension in depth and vascular anomalies, Skin Necrosis, Eds. Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S, Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, in press. 査読有

. Hayashida K, Fujioka M, Murakami C, Akita S.  
Toxic syndromes. Skin Necrosis, Eds. Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S, Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, in press. 査読有

〔その他〕  
ホームページ等  
病院形成外科の秋田定伯講師が【Wound Care Award】(学会創傷賞)を受賞  
<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/news/news1343.html>

病院形成外科 秋田定伯病院講師が2014年度タイ熱傷・創傷学会にて学会功労賞を受賞  
<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/news/news1485.html>

病院 形成外科 秋田定伯病院講師  
Albert-Einstein大学(Montefiore病院)から客員教授授与  
<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/news/news1486.html>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
秋田 定伯 (AKITA, Sadanori)  
長崎大学・病院・助教

研究者番号：90315250

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：