

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18435

研究課題名(和文)血管異常と血栓の共通基盤分子を通じた形成外科上の血管病理の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecules regulating angiogenesis and thrombus formation

研究代表者

細見 謙登 (Hosomi, Kento)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：90793787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：形成外科臨床では『血管』に起因する重要な諸問題があり、これは新生血管と血栓形成に集約される。そこで本研究では、血管新生と血栓形成の両方の基盤となるメカニズムの解明を目的とし、以下の研究を進めた。

虚血皮弁モデルマウスを用いて、遺伝子ノックアウトマウスを用いて皮弁生存面積と血流変化を解析し、術後3日目と5日目における遺伝子改変マウスでの皮弁生存率と血流の有意な低下を認めた。

血管腫血管奇形患者の血液検体を解析したところ、静脈奇形患者(n=10)において、既報の通りD-dimerの上昇(平均5.64 µg/mL)を認めたが、候補分子血中濃度は健康人(n=13)と比較して有意な差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷、腫瘍切除、先天性疾患等により欠損した組織を補填するために行われる組織移植では、血流確保、すなわち血管新生確保と血栓形成防止が不可欠である。これらは別々の視点で捉えられてきたが、我々はその両方を同時に制御し、基盤となるメカニズム解明を目指した。それにより組織移植時のバイオマーカーの確立、特定の受容体を標的とした薬剤開発等につながると期待されるためである。本研究の虚血皮弁モデルでは、想定した分子が血管新生促進的に機能する可能性が示唆され、血管奇形患者血液では血栓形成への関与は不明だった。今後、同マウスモデルやヒトの相当する病態で新生血管と血栓形成および疼痛との関係について解析を行いたい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the solution of clinical problems in plastic surgery caused by blood vessels, which means to uncover how to regulate both angiogenesis and thrombus formation to survive transplanted flaps. Our focus point is a certain molecule that may provide a common basis for angiogenesis and thrombus formation. We utilized a mice model with an ischemic flap and compared the survival rate and the vascularization of the flap between wild type mice and transgenic mice. On postoperative days three and five, the survival rate and the vascularization of the flap were significantly lower in a transgenic mouse group. We analyzed blood samples from patients with vascular malformations. Patients with venous malformations had higher levels of D-dimer (mean 5.64 µg/mL), and blood levels of a candidate molecule was not significantly different compared to healthy subjects (n=13).

研究分野：再建外科

キーワード：血管新生 血栓形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

形成外科の臨床の現場で、血管に起因する課題や問題点に遭遇してきた。すなわち、皮弁に代表される組織移植片の生着において十分な血流を得るための血管新生の確保、血管腫・血管奇形のような血管異常の制御、組織移植後の血栓形成による移植片生着不全の克服、血管腫・血管奇形内での血栓形成とそれによる疼痛障害の克服である。血管腫・血管奇形は血管そのものの問題であり、血栓形成の問題であるが、いままでそれぞれが独立して論じられ、個別に研究されることがほとんどであった。しかし、同じ組織内で起きる現象は相互に密接に関連していることが多い。そこで我々は、血管新生と血栓形成の両方を同時に制御し、その基盤となるメカニズムの解明を目指して研究を開始した。

### 2. 研究の目的

形成外科臨床では『血管』に起因する重要な諸問題があり、これは新生血管と血栓形成に集約される。例えば、移植組織片の血管新生確保と血栓防止、血管腫・血管奇形の血管構造異常とそれによる血栓形成に伴う疼痛などが臨床問題である。そこで本研究では、基礎研究と臨床研究の両面からのアプローチにより、血管新生と血栓形成の両者の共通基盤となる可能性がある分子の解析を行い、これらの病態解明、解決手段の発見を目指した。

### 3. 研究の方法

虚血性皮弁モデルマウス：

野生型 C57BL/6J マウスと共通基盤候補分子の遺伝子改変マウスを用いた。イソフルラン吸入麻酔下に、マウス背部に対し、頭側を茎とした 1×3cm の皮弁(Random pattern flap)を挙上し、速やかに同部位へ戻して縫合閉鎖した。その皮弁作製後から時間経過に伴って遠位部から進行していく壊死を経時的に測定し、皮弁生存領域の面積を算出した。血流測定器を用いて、皮弁の基部 1/3 の血流変化を測定した。

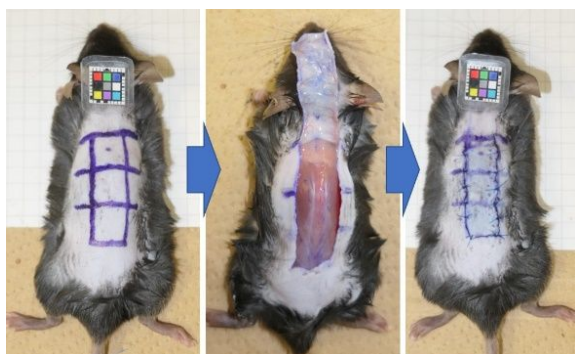


図 1：背部への虚血性皮弁の作製

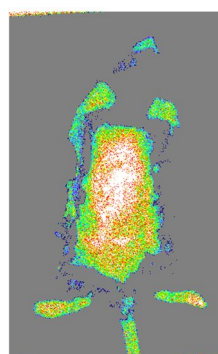


図 2：血流測定器による血流画像

血管腫・血管奇形患者の血液解析：

未成年者も含めた血管奇形の症例を対象として血液サンプルを採取した。採取時期は、通常診療の範囲内で実施する採血時(術前検査、経過観察目的の採血時に上乗せ採血)、血管造影の際の血液採取時、とした。除外基準は Hb8.0 以下の重度貧血の症例と設定した。検査項目は、血算・生化学・凝固に加え

て、血栓形成に関するマーカー、候補分子血中濃度等を設定した。以上について、当院倫理委員会承認後にサンプル回収を進めた。検査項目は健常者サンプルと比較した。

#### 4. 研究成果

虚血性皮弁モデルマウス：

皮弁生存面積は撮影画像を Image J を用いて解析した。画像補正用カラーチャート CSMATCH 10mm をとも撮影してサイズのコントロールとした。血流測定は 2 次元血流計 オメガゾーン OZ-2 を用いて足部をコントロールとして皮弁の基部 1/3 における血流変化を解析した。

術後 3 日目と 5 日目における皮弁生存面積は、遺伝子改変マウスにおいて有意な低下を認めた (n=9)。また、皮弁基部の血流も同様に、術後 3 日目と 5 日目において、遺伝子改変マウスでの有意な血流低下を認めた (n=9)。

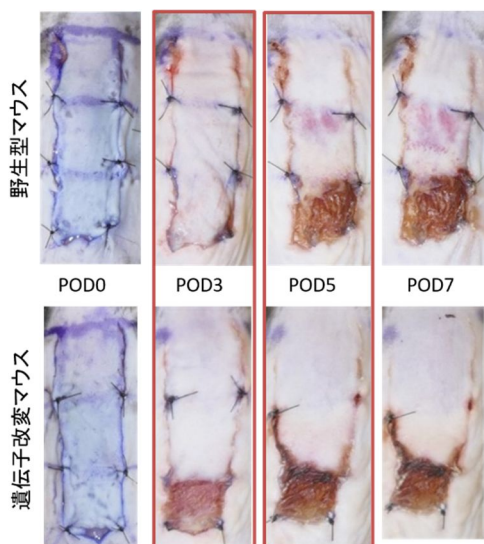


図 3：皮弁術後の生存面積の経過

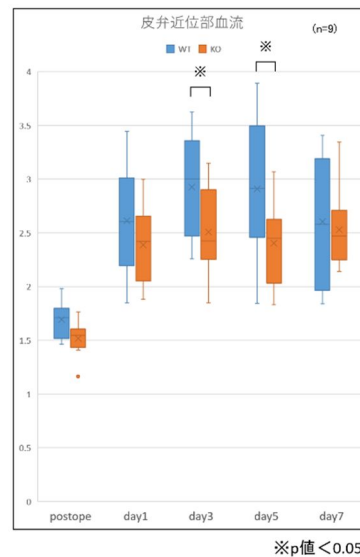


図 4：皮弁血流の変化

血管腫・血管奇形患者の血液解析：

静脈奇形患者 10 症例の術前検査時の血液サンプルを回収した。限られた症例数での解析となったため結論を出すのは難しいが、静脈奇形患者 (n=10) において、既報の通り血栓症マーカーである D-dimer の上昇 (平均 5.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を認めた。一方、候補分子血中濃度は健常人 (n=13) と比較して有意な差は認めなかった。

想定した分子は本研究の皮弁モデルでは、血管新生促進的に機能する可能性が示唆された。同モデルでの新生血管と血栓形成および疼痛との関係はさらなる解析を要する。今後、同マウスモデルやヒトの相当する病態での解析を行っていききたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosomi Kento, Yuzuriha Shunsuke, Yanagisawa Daisuke	4. 巻 2
2. 論文標題 Buried Patch Skin Grafting Under Granulation Flap for Impaired Wounds with Local and General Severe Complications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Surgical Wound Care	6. 最初と最後の頁 84 ~ 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.36748/ijswc.2.4_84	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細見謙登, 柳澤大輔, 杠 俊介
2. 発表標題 創閉鎖難渋症例に対する肉芽弁下への小皮片埋没法
3. 学会等名 第12回日本創傷外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細見謙登
2. 発表標題 Buried Patch Skin Grafting Under Granulation Flap for Impaired Wounds with Local and General Severe Complications
3. 学会等名 第14回日本創傷外科学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------