

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462790

研究課題名(和文)血管奇形悪化機序の解明 ～成長ホルモン受容体を巡って～

研究課題名(英文)The etiology of expanding in vascular malformations -focusing on growth hormone receptor-

研究代表者

野村 正(NOMURA, TADASHI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30529566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：動静脈奇形の増殖機序に関して、成長ホルモン受容体(GHR)が高率に発現していることが報告されているが、免疫組織学的、生化学的手法を用いた本研究の検討からは、GHRの関与は否定的であった。一方、動静脈奇形由来の血管内皮細胞(AVMVEC)の増殖能はヒト臍帯由来血管内皮細胞と同程度と極めて高く、AVMVECの増殖には何らかの内因性もしくは外因性因子の関与が示唆される結果となった。

研究成果の概要(英文)：It was reported growth hormone receptor was overexpressed in the vessels of vascular malformations, especially in arteriovenous malformations. Tissue specimens(arteriovenous malformation(AVM), normal artery) were collected from patients undergoing resection or free flap transfer. AVM-derived vascular endothelial cell(AVMVEC) were primarily cultured by explant method. Immunohistochemistry was used in paraffin embedded tissue and AVMVEC. Growth hormone receptor expression was observed in half the paraffin embedded AVM tissue, but in no AVMVEC. Proliferative ability of AVMVEC was as the same degree as human umbilical vein endothelial cells. In our study, growth hormone might not contribute to the expansion of arteriovenous malformation. However the proliferative ability of AVMVEC was very high, so some internal or external factor might effect the AVMVEC. Further investigation is needed.

研究分野：形成外科学

キーワード：血管奇形 動静脈奇形 成長ホルモン受容体 増殖能

1. 研究開始当初の背景

血液貯留型の血管奇形である静脈奇形、動脈奇形、リンパ管奇形は先天的な脈系の異常¹⁾であり、現在においても非常に難治の疾患と認識されている。特に体表の場合、醜状変形、病変部からの出血など、著しい Quality of Life の低下にさらされている²⁾。治療法として、手術療法を選択した際は、完全に病変を切除することが推奨されているが、一方で病変の境界が不明瞭であり術後の出血、再増大(再発)があること、また術後の醜状癒痕の問題も指摘されている。これらを背景に、われわれは、過去10年以上にわたり、貯留型血管奇形に対してインターベンショナルラジオロジー(IVR)の技術を用いた硬化療法を中心とした治療を行い、一定の治療効果を報告してきた。しかし、手術や硬化療法に対しても治療抵抗性の病変が存在し、特に動脈奇形では出血や心不全を生じ、組織破壊のかつ生命を脅かす病態を呈し、臨床的に重篤な経過を辿る場合がある。現状では、病変の切除およびIVR治療が不可能な病変では、症状の進行を止める治療法は存在しない。元来、血管奇形は組織学上良性であり、病変が残存しても症状が改善すれば良く、内科的治療に寄せられる期待は大きい。

血管奇形の原因は不明である。先天性病変であるにも関わらず、多くが単発性であり、家族性、遺伝性に発生した数少ない病変を除いては特定の責任遺伝子は究明されていない。一方、増殖・悪化に関する原因として、血管新生因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)などを介した血管新生の関与が以前から指摘されている。また動脈奇形においては妊娠中に病変が急激に悪化することが知られており、何らかのホルモンの関与も指摘されていた。2012年 Kulungowaskiらは、血管奇形において成長ホルモン受容体(Growth hormone receptor; GHR)の発現を組織免疫学的手法で確認し、血管奇形におけるホルモンの関係を示唆した。しかしながら、成長ホルモン(GH)が病変血管のレセプターに結合してからの動態(シグナル伝達経路、標的となる細胞、増殖・悪化のメカニズムについての詳細等)については現時点において全く証明されていない。GHは肝臓、骨、脂肪組織等をターゲットとして成長および代謝に関与している。骨や筋肉には、主にIGF-1を介して、間接的に成長を促進させる働きがある。シグナル伝達経路には、シグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)やフォスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)を介する経路が知られるが、GHカスケードの下流にあるマップキナーゼファミリーの一つである細胞外シグナル調節キナーゼ(Extracellular Signal-regulated Kinase; ERK1/2)は、GH作用後の細胞増殖に重要な働きをしている。胎盤において、ERK1/2は、一酸化窒素(NO)を介して血管新生に関与することがすでに指摘されている。血管

奇形においても、ERK1/2の発現パターンを確認することは、非常に重要であり、特に、ERK1/2がリン酸化されるシグナル伝達系がangiogenesisを行っている可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

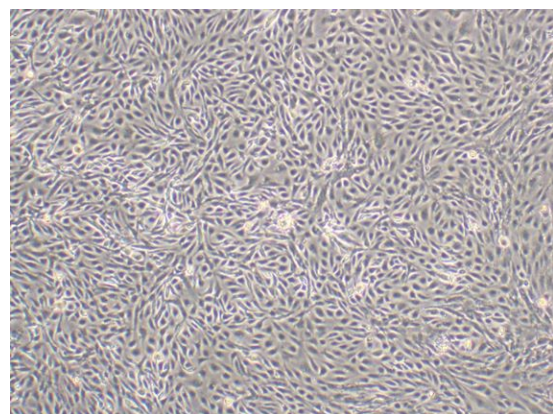
われわれは、本課本題研究で、動脈奇形由来培養血管内皮細胞(AVEC)を初代培養し、その細胞増殖能ならびに遊走能を定量的に計測する。また、免疫組織学的検討でAVECに対するGHの影響を検討し、さらに血管奇形細胞において、成長ホルモン受容体(GHR)からの、血管奇形の増殖にGHが関与することを実験的に証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)免疫組織学的検討

手術検体からの動脈奇形由来血管内皮細胞(AVMVEC)の初代培養

手術で得られたAVM検体を生理食塩水で十分に洗浄し、清潔操作で余剰の皮膚や脂肪組織を除去し、動脈奇形の本体とも言うべきnidusを採取した。顕微鏡操作下にnidus部分の血管を細片として、内皮をゼラチンコーティングの60mmシャーレに静置し、培地はLonza社のEBM[®]-2を用い、explant法でAVECを初代単離培養した。



(2) 増殖能、GHに対する走化性の検討

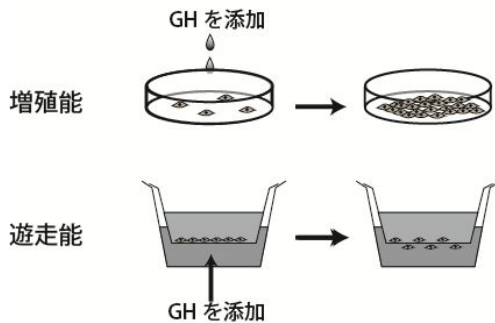
細胞増殖能の検討

初代培養したAVMVECをCell Counting Kit測定で検討した。96wellプレートに 1.0×10^5 で播種し、Cell counting kit-8(同仁化学研究所)を用いて経時的に細胞数を計測した。

対象として、ヒト臍帯由来血管内皮細胞 (HUVEC)、成人動脈由来血管内皮細胞 (AVEC) も同様の操作を行った。

遊走能検討

24well に 1.5×10^4 cell/500ml で細胞を播種し、boyden chamber 法により、GH に対する AVMVEC の遊走能検討を行った。



AVMVEC に対する GH の細胞増殖に関する検討

ヒト GH の濃度を 10^{-9} - $10^{-4}\%$ で調整し、1/10 毎の titer で変化させて培養液に添加し、24 時間および 48 時間の培養の後、内皮細胞を Cell counting kit-8 (同仁化学研究所) を用いて計測した。対照群と比較してその増殖量を検討した。

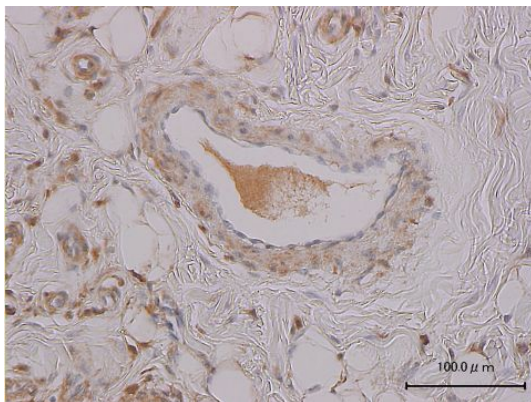
(3) Realtime-PCR による GHR の発現量の比較

AVMVEC, HUVEC, AVEC から mRNA を分離抽出し、GHR に対して 100% match の PCR プライマーをもちいて real time-PCR による定量的発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 動静脈奇形検体における GHR の発現確認

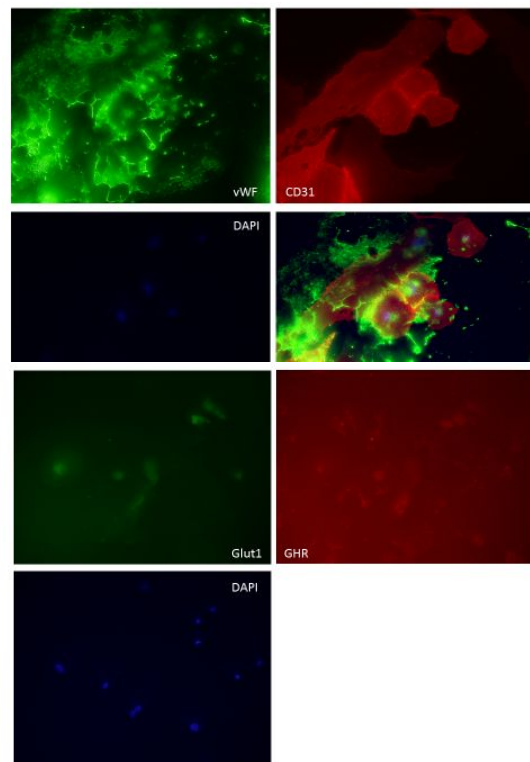
手術サンプルの一部は固定標本 (N=9) として薄切し、抗 GHR 抗体による免疫染色を行い、GHR の発現およびその局在を確認したところ、初代培養可能であった半数で血管内皮周囲に発現を認めた (下図)。



c. AVMVEC における GHR の発現確認

上記検体で AVMVEC を GRH, vWF, CD34, Glut1 等脈管関連の receptor を抗体として蛍光抗体法で免疫染色にて発現を検討したところ、対照とした vWF ならびに CD31 は発現を認めたも (下図上段) のの、GHR ではいずれの検体も発現を認めなかった (下図下段)。

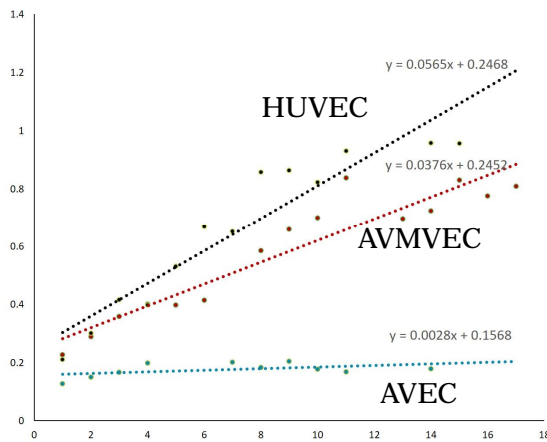
	Age, Sex	部位	初代培養	GHR	CD31	vWF	Glut1
1	26, F	耳介	-				
2	19, F	腰部	-				
3	54, M	鼠径部	+	-	+	+	±
4	35, M	手	-				
5	69, M	手	+	-	+	+	±
6	49, F	腰部	+	-	+	+	±
7	24, F	大腿	+	-	+	+	±
8	60, F	前腕	+	-	+	+	±
9	41, M	上肢	+	-	+	+	-



(2) 増殖能, GH に対する走化性の検討

細胞増殖能の検討

初代培養した AVMVEC を Cell Counting Kit 測定で検討した。96well プレートに 1.0×10^5 で播種し、Cell counting kit-8 (同仁化学研究所) を用いて経時的に細胞数を計測し、グラフ上にプロットした。結果は、AVEC に比べ、明らかに高い増殖能を有していることが判明した。また、HUVEC の増殖能を有していた (次頁左上図散布図, 回帰直線は上から順に HUVEC, AVMVEC, AVEC)。

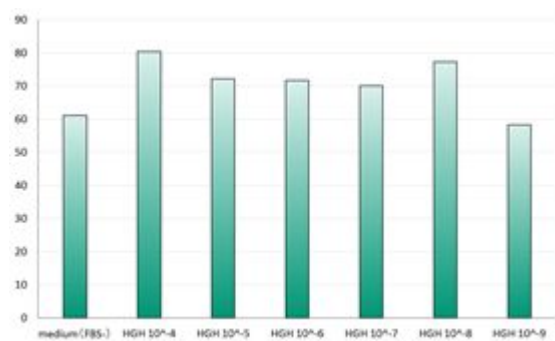


遊走能検討

boyden chamber 法により, GH に対する AVMVEC の遊走能検討では, GH に対して有意な走化性を認めなかった。

AVMVEC に対する GH の細胞増殖に関する検討

ヒト GH の濃度を 10^{-9} - $10^{-4}\%$ で調整し, 1/10 毎の titer で変化させて培養液に添加し, 24 時間および 48 時間の培養の後, 内皮細胞を Cell counting kit-8 (同仁化学研究所) を用いて計測した。対照群と比較してその増殖量を検討したところ, GH 各濃度において細胞増殖の程度に有意差を認めなかった。(下図棒グラフ左端対照, 左から順に 10^{-4} - $10^{-9}\%$)



(3) Realtime-PCR による GHR の発現量の比較

AVMVEC, HUVEC, AVEC から mRNA を分離抽出し, GHR に対して 100% match の PCR プライマーを用いて realtime-PCR による定量的発現解析を行ったところ, 発現は明らかでなかった。

以上の結果より, AVMVEC の増殖能は正常動脈に比べて明らかに高く, 何らかの外因性もしくは内因性因子が関与している可能性が示唆された。われわれの多方面の検討から動静脈奇形における GH の直接的な関与は否定的であり, 動静脈奇形の GH の関与は否定的であることが示される結果となった。AVMVEC の高い増殖能を有することから, 他の正常血管内皮細胞とは異なる receptor や伝達経路を有している可能性があり, 今後更なる検討が必要である。

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)

野村正, 江尻浩隆. 毛細血管奇形(単純性血管腫)の標準的レーザー治療. PEPARS. 2016; 111: 1-10.

Nomura T, Osaki T, et al., Simple and easy surgical technique for infantile hemangiomas: intralesional excision and primary closure. ePlasty. 2015; 15: e3.

〔学会発表〕(計 3 件)

野村正 他. 動静脈奇形の増殖機序に関する検討【第 2 報】 成長ホルモン受容体を巡って. 第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2015.10.8 (岩手県)

野村正 他. 動静脈奇形の増殖機序に関する検討 成長ホルモン受容体を巡って. 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2014.10.9-10 (長野県)

Ejiri H, Nomura T, et al., Importance of the control sclerosant egress on sclerotherapy for venous malformations. ISSVA 20th International Workshop on Vascular Anomalies. 2014.4.2-4 (メルボルン, オーストラリア)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 正 (TADASHI NOMURA)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号: 30529566

(2) 研究分担者

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)

神戸大学・医学研究科・特定助教

研究者番号: 50444592

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 80217421

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 90403237