

平成 27 年 7 月 6 日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670753

研究課題名(和文) 動静脈奇形の発症・増大にかかわる病態生理の解明

研究課題名(英文) Research on pathogenesis of soft tissue arteriovenous malformations

研究代表者

栗田 昌和 (Kurita, Masakazu)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20424111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に重篤な症状を呈することがありながら、確立した治療方法の存在しない軟部組織の動静脈奇形に対する治療方法の開発の第一段階として、病巣局所の切除組織検体から病態の主座をなすと考えられる血管内皮細胞を単離する手法を開発した。広く一般に施行可能である酵素分散法を用いて、混在する線維芽細胞、間葉系細胞を効率的に除去し、機能的解析に十分な量の細胞数を確保する方法を確立した。今後は、症例、サンプルの蓄積を重ね、免疫不全動物に対する移植実験など、従来はサンプル準備が困難で行うことのできなかつた解析を進めていく。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the new therapeutic intervention to soft tissue arteriovenous malformation, we develop the method of primary endothelial cell culture from small amount of vascular malformation resected samples. Using Rho-kinase inhibitor, Y27632, we established the method to obtain primary endothelial culture by enzymatic digestion and sorting.

研究分野：血管奇形 創傷治癒

キーワード：血管奇形 細胞培養 動静脈奇形 静脈奇形 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

血管腫・血管奇形は、部位、病変の大きさなどによっては非常に難治な病態であるにもかかわらず、その病態、本質については不明な点が多い。中でも、動静脈奇形は、毛細血管を介さない動静脈の短絡を有し、流入・出血管の拡張、蛇行などの2次的変化を伴いやすく、出血や高拍出性心不全から致命的な経過をたどることもある。根治的な切除術は出血のリスク、機能的欠損が不可避であり、塞栓療法、硬化療法などの血管内治療を軸として、生涯にわたる治療の継続を余儀なくされる症例も多く、革新的な治療が望まれるところである。

研究代表者は、特に血管奇形に対する治療開発をテーマとして主に硬化療法、手術的治療方法について、基礎的、臨床的研究を行ってきたが、特に広範かつびまん性の病変においては、現存する治療手段のみでは整容的、機能的に満足いく結果を得ることは困難なことも多く、より病態の本質に迫ったアプローチの必要性を感じていた。

一般に血管腫・血管奇形と呼ばれる病態の中でも、**Non-involutional congenital hemangioma** (以下 **NICH** と省略) と呼ばれる小児血管腫、静脈奇形 (**Venous malformation**, 以下 **VM** と省略)、毛細血管奇形 (**Capillary malformation**, 以下 **CM** と省略)、動静脈奇形 (**Arterio venous malformation**, 以下 **AVM** と省略) は、難治であることが多いにもかかわらず、一部の家族性の **VM**, **CM-AVM** を除いては、その原因となる因子は明らかにされておらず、革新的な治療研究開発の起点が望まれるところであった。

2. 研究の目的

本研究では、形成外科手術中に不要、破棄される健常組織および同組織から採取した血管内皮細胞および間葉系細胞と、治療目的で切除を行った **NICH**, **VM**, **CM**, **AVM** 組織および同組織から採取した血管内皮細胞および間葉系細胞とを比較検討し、これらの病態生理を明らかにすることにより、新たな治療的介入方法を探索することを目的とした。端緒として、限られた量の軟部組織血管奇形切除検体から、病態の主座であると考えられる血管内皮細胞を単離する方法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

形成外科手術中に不要、破棄される健常組織と、治療目的で切除を行った **VM** 組織を検体として、広く一般に行いうる血管内皮細胞単離方法である、酵素分散法による血管内皮細胞単離手法の確立を目指した。

1) 酵素分散法による初代血管内皮細胞培養方法の確立

組織検体を細砕した後、コラゲナーゼ処理する酵素分散法によって、血管内皮細胞を含む **stromal vascular fraction** を遠心採取し、これを血管内皮用培地である **EGM** 培地を用いて播種した。

接着細胞の形態観察を行いながら、継代ごとに、**CD31** 抗原を指標としながらフローサイトメトリー、もしくは磁気細胞分離装置 (**MACS**) を用いて、血管内皮細胞の単離を試みた。

2) 初代血管内皮細胞の単離における Rho-kinase inhibitor の有用性の検討

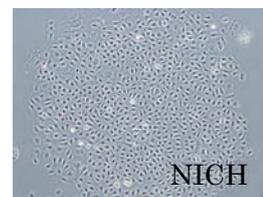
単純な酵素分散法による初代血管内皮細胞の単離では、**NICH** など、小児由来の主要性増殖能を有する病変からの採取は可能であったものの効率は低く、成人患者由来の組織からの単離は困難であることが多かったため、**Rho-kinase inhibitor** である **Y27632** を培地に添加することによって、効率の改善を図った。

同一検体から、基本培地である **EGM** 培地に **Y27632** を添加した培地 (**Y(+)**培地) と、添加していない培地 (**Y(-)**培地) で上記単離プロセスを行い、採取された細胞数の比較を行った。また、採取された細胞について、血管内皮細胞マーカー発現の確認、および **Tube formation assay** による機能的な確認を行った。

また、血管内皮細胞単離プロセスにおける **Y27632** の有用性についてより詳細を明らかにするために、**CD31** 抗原陰性細胞、線維芽細胞増殖能に対する **Y27632** の影響を調べた。

4. 研究成果

研究初期の試みとして、フローサイトメトリーを用いて、**CD31** 抗原陽性細胞数を monitorしながら初代培養血管内皮細胞の単離を行った。小児の **AVM**, **NICH** などでは良好な増殖能を有する初代培養血管内皮細胞を得ることができたが、成人症例の、特に **VM**, **LVM** などにおいては、血管内皮細胞の単離自体が困難であったり、単離に至ったとしても、その後の解析に十分な数の細胞を得ることができなかった。



NICH



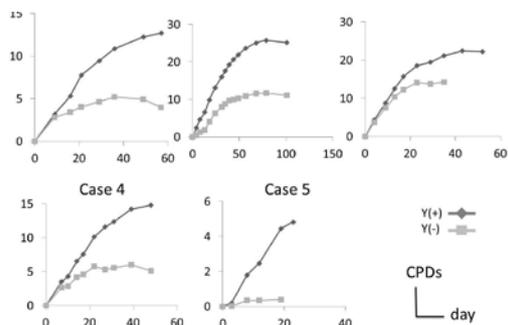
小児 AVM



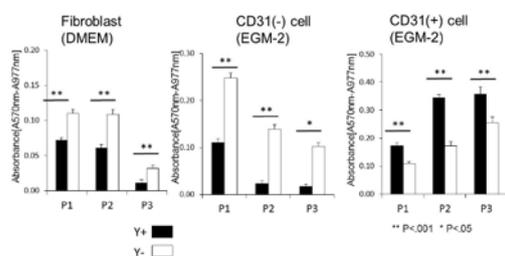
成人 LVM

プロセスの簡易化、均一化をはかるため、磁気分離細胞装置(MACS)を導入した。さらに、初代血管内皮細胞確立過程において、基本培地への Y27632 の添加の影響を調べた。

検討を行った VM の 5 検体については、いずれの場合においても Y(+)₂培地を用いた倍のほうが、Y(-)₂培地を用いた場合よりも多くの血管内皮細胞を確保することができた。



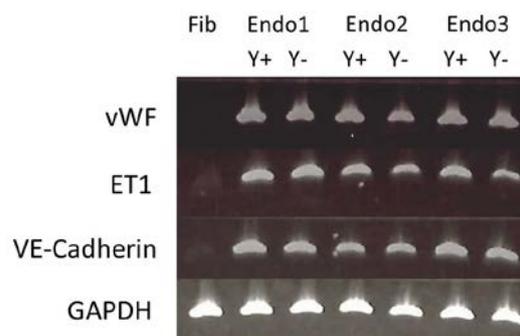
一方、血管内皮細胞培養単離過程における、Y27632 の影響の仔細を調べる目的で、単離された、線維芽細胞 (DMEM 培地)、CD31(-)細胞 (EGM 培地)、CD31(+)血管内皮細胞、それぞれの増殖能に対する Y27632 添加の影響を調べた。ところ、Y27632 添加によって、線維芽細胞や、CD31(-)細胞などの間葉系細胞は増殖能の抑制をうる一方、CD31(+)血管内皮細胞の増殖能は増加することがわかった。



得られた細胞の血管内皮細胞としての機能面での検討のために行った tube formation assay でも、Y(+)₂細胞は Y(-)₂細胞と同等ないし、それ以上の血管形成能を有することが示された。

また、RT-PCR を用いて代表的な血管内皮細胞マーカーである vWF, ET1, VE cadherin mRNA の発現を調べたところ、Y(+)₂細胞は、Y(-)₂細胞同様に、各マーカー遺伝子の発現を認めることがわかった。

本手法を用いることによって、従来より機能的解析が行われると考えられる P4~P6 継代の段階で、実数にして 100 倍程度の血管内皮細胞を確保することが可能となった。今後は、症例、サンプルの蓄積を重ね、免疫不全動物に対する移植実験など、従来はサンプル準備



が困難で行うことのできなかった解析を進めていくことが可能となった。

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 2 件)

① Kurita M, Yamazaki K, Eto H, Seike S, Takushima A, Harii K. Reinnervation of segmented latissimus dorsi muscle with the distal stump of the thoracodorsal nerve: A preliminary experimental study in rats. *Microsurgery*, 2013;33(7):545-550.

② 尾崎峰、栗田昌和、加地展之 "血管腫" への MDCT の応用 *PAPERS* 73:48-55, 2013

[学会発表] (計 7 件)

① 栗田昌和、尾崎峰、井原玲、加地展之、多久嶋亮彦、波利井清紀、動静脈奇形の臨床経験から学んだこと、第 57 回日本形成外科学会総会学術集会、2014 年 4 月 9 日~11 日、長崎ブリックホール

② Kurita M, Ozaki M, Sato D, Kaji N, Takushima A, Harii K. Eradication of extensive arteriovenous malformations with stemwise treatment composed of compartmentalization, percutaneous sclerotherapy, and surgical resection. The 20th ISSVA International Workshop, Melbourne, Australia - 2nd to 4th April 2014

③ Kurita M, Ozaki M, Kaji N, Ihara A, Takushima A, Harii K. Compartmentation with Undermining Suture for Surgical Reduction of Venous Malformation on Cheek. The 20th ISSVA International Workshop, Melbourne, Australia - 2nd to 4th April 2014

④ 佐藤卓士、栗田昌和、江藤ひとみ、菅浩隆、尾崎峰、井原玲、加地展之、多久嶋亮彦、波利井清紀、効率的な血管奇形組織からの血管内皮細胞単離法の開発、第 11 回血管腫血管奇形研究会、2014 年 7 月 19 日~20 日、信

州大学医学部付属病院大会議室

⑤佐藤卓士、栗田昌和、江藤ひとみ、菅浩隆、尾崎峰、井原玲、加地展之、多久嶋亮彦、波利井清紀、効率的な血管奇形組織からの血管内皮細胞単離法の開発、第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日～10 日、キッセイ文化ホール

⑥栗田昌和、尾崎 峰、井原 玲、加地展之、多久嶋亮彦、波利井清紀 2-0 ナイロン糸によるコンパートメンテーションを用いた頰部静脈奇形部分切除術の経験 平成 25 年 7 月 19, 20 日 第 10 回血管腫・血管奇形研究会 いわて県民情報交流センター（アイーナ）、盛岡市、岩手県

⑦井原 玲、栗田昌和、尾崎 峰、加地展之、多久嶋亮彦、波利井清紀 いちご状血管腫に対するプロプラノロール内服中の体重変化の検討 平成 25 年 7 月 19, 20 日 第 10 回血管腫・血管奇形研究会 いわて県民情報交流センター（アイーナ）、盛岡市、岩手県

⑧佐藤卓士、栗田昌和、江藤ひとみ、菅浩隆、栗田恵里奈、尾崎峰、井原玲、多久嶋亮彦、波利井清紀 効率的な血管奇形組織からの血管内皮細胞単離法の開発 第 25 回東京大学医学部形成外科同門学術集会 平成 26 年 1 月 文京区、東京都

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕 ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗田 昌和 (KURITA MASAKAZU)

杏林大学・医学部・助教
研究者番号：20424111

(2)研究代表者

なし

(3)研究代表者

なし