

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861687

研究課題名(和文)血管奇形増殖因子を探る ～CAMアッセイを通じて～

研究課題名(英文)Research for vascular anomaly growth factor by chorioallantoic membrane assay

研究代表者

江尻 浩隆(Ejiri, Hirotaka)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70529552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：過去の血管奇形に対する研究の多くは、組織免疫化学的手法によるものであった。この原因として、血管奇形の動物モデルが存在しないことが挙げられる。そこで、血管奇形の動物モデルとして鶏卵絨毛尿膜(CAM)アッセイに注目し、血管奇形における血管新生をCAMアッセイにより評価し、血管奇形治療法の確立へ結びつけることを目的とした。

動静脈奇形および塩基性線維芽細胞増殖因子をサンプルとしてCAMアッセイを行ったところ、コントロールに比べ血管新生の程度が大きい傾向を認めた。実験を通してCAMアッセイの不安定さが問題であり、手技の変更、湿度管理、鶏卵納入タイミングの変更などを行ったが、十分な安定化に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Most of researches for vascular anomaly have been performed by immunohistochemical study because there were be no suitable experimental animal model for vascular anomaly. Therefore we tried to use chorioallantoic membrane assay as experimental animal model for vascular anomaly.

We performed chorioallantoic membrane assay with arteriovenous malformation or basic fibroblast growth factor as experiment sample. When we applied arteriovenous malformation or basic fibroblast growth factor, there might be more angiogenesis. In our experiment, instability of chorioallantoic membrane assay was a big problem. So we have tried to change some experimental techniques, management of humidity, delivery timing of eggs, but our chorioallantoic membrane assay did not improve so much.

研究分野：血管腫・血管奇形

キーワード：血管奇形 動静脈奇形 鶏卵絨毛尿膜アッセイ 塩基性線維芽細胞増殖因子

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、動静脈奇形、リンパ管奇形は胎生 4~10 週の末梢血管系形成期の異常によって生じる先天的な脈管系の異常であり、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。血管奇形原因の詳細は未だ不明であり、先天性病変であるにも関わらず、家族性、遺伝性に発生した数少ない病変を除いては責任遺伝子は検出されていない。また、一般に血管奇形は経年的に増大し、一部の病変では、組織破壊的に振る舞うこともある。その原因として、血管新生が関与していることが示されている。近年、血管奇形の増殖因子として血管内皮細胞増殖因子の関与が示されている。しかし、血管内皮細胞増殖因子は血管奇形に特異的なサイトカインではない。また、これまで血管奇形は、組織学上は正常の血管と相違ないとされてきたが、血管奇形患者において血管奇形部位のみが経時的に増大して健康部位には変化がないことや、妊婦において動静脈奇形が急速に悪化することなどからも、血管奇形自身に増殖に関わる因子の存在が示唆される(図 1)。しかし、VEGF 以外で明確に血管奇形増殖に関する因子は示されていない。

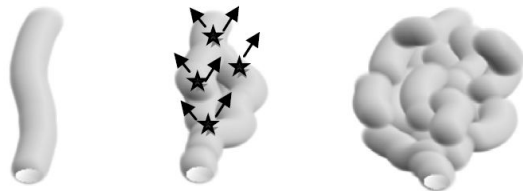


図 1 : 血管奇形自身に病変の増殖を促進させる因子が存在する可能性が考えられる。

これまでの血管奇形研究は、主に免疫組織化学的手法を用いた報告がほとんどであり、その大きな要因として、再現性のある動物モデルが無いことが挙げられる。一方、血管新生を観察できる信頼性の高い *in vivo* 実験法の一つとして、鶏卵の絨毛尿膜を用いた chorioallantoic membrane assay (以下 CAM アッセイ)(図 2)の有用性が報告されている。CAM アッセイは血管新生に関わる因子を、“生きた状態”の鶏卵絨毛尿膜に適用する方法である。非常に簡便で、新生した血管を視覚的に捉える明瞭な実験方法であり、さらに免疫寛容であることから生体のタンパクを添加することが可能で、添加後の血管新生動向の観察にも適している。血管奇形自身に存在すると考えられる増殖の原因を検討するのに、CAM アッセイは非常に適していると考えられる。また、CAM アッセイを血管奇形研究に用いた報告は皆無である。

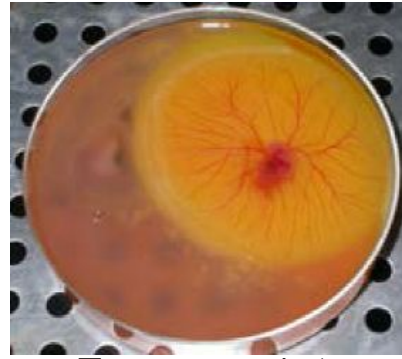


図 2 : CAM アッセイ

2. 研究の目的

CAM アッセイに血管奇形を適用することで、血管奇形の新たな実験モデルとして CAM アッセイが有用か否かを判定したい。また、実験結果から、血管奇形自身に存在すると考えられる増殖の原因を検討したい。

3. 研究の方法

< サンプルの準備 >

1. 神戸大学医学部附属病院形成外科における手術で得られたヒト血管奇形(動静脈奇形、静脈奇形)およびヒト正常血管(動脈、静脈)から、顕微鏡下に剪刀などを用いて余分な組織(皮膚や脂肪成分など)を除去する。
2. 血液成分を十分に除去するため、内腔を生理食塩水で十分に洗浄する。
3. 凍結保存する。
4. 実験開始時に解凍し、剪刀などを用いて 1~2mm 大に細切する。

< CAM アッセイ >

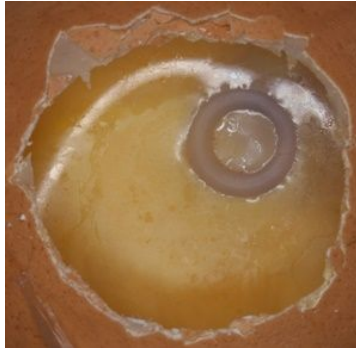
感染、死亡を多く認めたため、随時方法に工夫を加えていった。変遷が多いため、CAM アッセイの詳細については結果と合わせて述べる。

4. 研究成果

< 実験 1 >

1. 産卵 4 日目に納品された受精卵を、39 度で保温開始した。加湿なし。なお、産卵から納品まで保温なし。
2. 産卵 9 日目、受精卵の外部を消毒したのち、気室上の卵殻にドリルで穴を開け、剪刀・鑷子などで穴を拡げ、卵殻膜を慎重に剥がし、MAC 上に滅菌したシリコンリングを乗せ、その中にサンプル(動静脈奇形の nidus 片)を静置した。コントロールには何も置かず。透明フィルムで穴を密閉し、再び保温器に入れた。なお、明らかに血管増生がないものは排除した。
3. 産卵 11 日目に観察を行った。一部明らかに血管増生ないものや、出血を認める

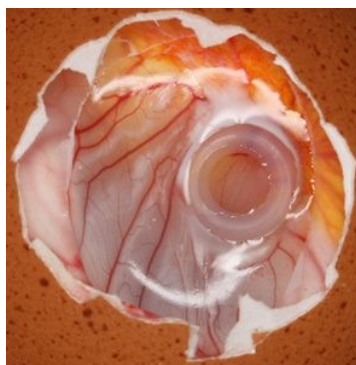
もの、明らかにCAMがなくなっているもの、感染を認めるものを認めた。観察に際してイントラリポスをCAM下に注入したが、CAMが一部欠損しているものは、CAM上にイントラリポスが漏出し、観察しづらくなった。CAMが大きく欠損しているものはイントラリポスが浮上してこなかった。明らかに失敗しているものを除くと、サンプル片の周囲に血管増生および血管の拡張を認めるものと、コントロールと変わらないものがあった。



死亡例



血管増生・血管拡張例



コントロールとの差なし例

<実験2>

1. 産卵4日目に納品された受精卵を、39度で保温開始した。加湿なし。なお、産卵から納品まで保温なし。
2. 産卵9日目、受精卵の外部を消毒したのち、1×1cmほどの卵殻窓を横腹に開け、卵殻膜に数か所ずつ穴を開けた。この時点で卵殻膜下に気室が形成された。卵殻膜の穴から(CAMに向けて)basic

fibroblast growth factor 液(100 μg/mLに調整したもの)(以下bFGF液)を50 μgずつ滴下した。卵殻窓除去部に透明フィルムを貼付して密閉し、再び保温器に入れた。

3. 産卵11日目に観察を行った。すべてのCAMは萎縮しており、心拍を確認出来なかった。

<実験3>

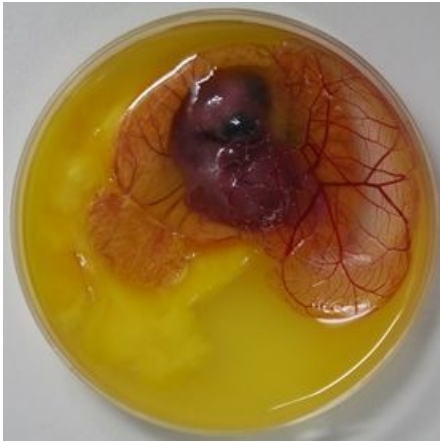
1. 産卵4日目に納品された受精卵を、39度で保温開始した。加湿なし。なお、産卵から納品まで保温なし。
2. 産卵9日目、受精卵の外部を消毒したのち、受精卵を割って内容をdishに入れた。dishに蓋をし、再び保温器に入れた。これらの作業はクリーンベンチ内で行った。
3. 産卵11日目に観察を行った。全例CAMは萎縮し、心拍を確認出来なかった。

<実験4>

1. 実験1~3の反省から、産卵から保温開始までの時間を極力短くすること、加湿を行うことの要否を確認することとした。そこで、産卵翌日に納品してもらえる業者の受精卵に変更した。
2. 産卵1日目に納品された受精卵を、39度で保温開始した。乾燥予防のため、滅菌水を入れたdishを保温器に入れた。
3. 産卵9日目、受精卵の外部を消毒したのち、1×1cmほどの卵殻窓を横腹に開け、卵殻膜に4か所ずつ穴を開けた。この時点で卵殻膜下に気室が形成された。卵殻膜の穴から(CAMに向けて)bFGF液を50 μgずつ滴下した。卵殻窓除去部に透明フィルムを貼付して密閉し、再び保温器に入れた。
4. 産卵14日目に観察を行った。生存はbFGF滴下群8個中7個、コントロール(非滴下)群8個中1個であった。

<実験5>

1. 産卵1日目に納品された受精卵の外部を消毒したのち、割って内容をdishに入れた。dishに蓋をし、保温器に入れた。これらの作業はクリーンベンチ内で行った。39度で保温開始した。乾燥予防のため、滅菌水を入れたdishを保温器に入れた。
2. 産卵9日目、黄身の上にbFGF液を50 μgずつ滴下した。
3. 産卵14日目に観察を行った。生存は6個中1個であった。bFGF滴下部位に血管増生を認めた。



bFGF 滴下部（写真右側）に血管増生を認めた。

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

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1件)

Nomura T, Osaki T, Ishinagi H, Ejiri H, Terashi H、Simple and easy surgical technique for infantile hemangiomas: intralesional excision and primary closure、Eplasty、査読有、15巻、2015、e3ページ、DOI なし

〔学会発表〕(計2件)

Ejiri H, Nomura T, Sakakibara S, Terashi H、Importance of the control of sclerosant egress on the sclerotherapy for venous malformations、ISSVA 20th International Workshop on Vascular Anomalies、2014.4.2-4.4、Melbourne (Australia)

野村正、江尻浩隆、榊原俊介、橋川和信、寺師浩人、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、2014.10.9-10.10、松本（長野）

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

江尻 浩隆 (EJIRI, Hirotaka)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70529552