

静脈への動脈組織片のパッチ移植による新規血管新生誘導法*

伊藤 行信, 後藤 明輝

秋田大学大学院医学系研究科 器官病態学講座

(平成 31 年 4 月 27 日掲載決定)

**Neovasculature can be induced by patching arterial graft into vein :
A novel *in vivo* model of spontaneous arteriovenous fistula formation**

Yukinobu Ito and Akiteru Goto

Department of Cellular and Organ Pathology, Graduate School of Medicine, Akita University

Key words : angiogenesis, arteriovenous malformation, arteriovenous fistula, animal model, arterial patch graft

はじめに

一般的に動静脈奇形 (arteriovenous malformation ; AVM) は異常血管 Nidus を介して動脈と静脈が直接吻合するものと定義される。AVM は脳や肺、肝臓など様々な臓器で発生し、時に出血や虚血、脳膿瘍などの致死的な症状を呈する¹⁻⁶⁾。AVM は一般的に、流入動脈、流出静脈および 1 つ以上の動静脈瘻を有する新生血管から構成される。

しかし、その病因やメカニズムについては未だ明らかになっていない。特に動静脈瘻の形成プロセスについては全く分かっていない。さらに、AVM の形成過程において、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor A : VEGFA) をはじめとする血管新生因子がどのように関与しているのかについても不明な点が多い⁷⁾。その理由として、臨床において AVM の発生初期を捉えることが難しいことや AVM を経時的に観察することが困難であることが挙げられる。また、*in vivo* で経時的に観察できる疾患モデルが存在していないことも大きな要因である⁸⁾。

今回我々はウサギ動脈組織片を静脈に貼り付けることによって異常血管を *in vivo* で誘導することに成功した。本現象は動脈と静脈の違いについて研究する中で偶然発生した。本誘導法で誘導された新生血管は自発的に動静脈瘻を形成する。組織学的に壁が薄く、弾性線維が存在せず、AVM や“もやもや病”などでみられる異常新生血管と酷似していた。我々は、本現象を経時的に観察し、新生血管の経時変化や形成プロセス、分子生物学的特徴などについて詳細な実験を重ねて報告した⁹⁾。本稿では、この新規血管新生モデルを用いた本研究について概説する。

**1. 動脈移植片を静脈に移植すると
血管新生が生じる**

体重 3~4 kg のウサギ日本白色種のオスを使用する。麻酔後に頸部正中を切開し、左総頸動脈および左総頸静脈を剖出する。左総頸動脈を約 1 cm にわたり結紮・切離する (図 1A, B)。動脈組織片を展開し、紡錘形にトリミングする。左総頸静脈に 7~8 mm の切開を置き、採取した動脈組織片をパッチワークの様に移植する (図 1C)。このとき、動脈組織片が静脈血と接触するように移植する (図 1D)。

28 日経過後に頸部を開くと鮮紅色で複雑に分岐と蛇行を繰り返した奇怪な血管が生じていた (図 2)。

一般的に、血管新生を誘導する方法として肉芽組織の形成や組織の虚血が挙げられる。本症例でも手術侵

Correspondence : Yukinobu Ito
Department of Cellular and Organ Pathology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6064
Fax : 81-18-884-6441
E-mail : xing-xin@rhythm.ocn.ne.jp

*平成 31 年 2 月 20 日秋田医学会学術奨励賞記念講演

(30)

静脈への動脈組織片移植による血管新生誘導

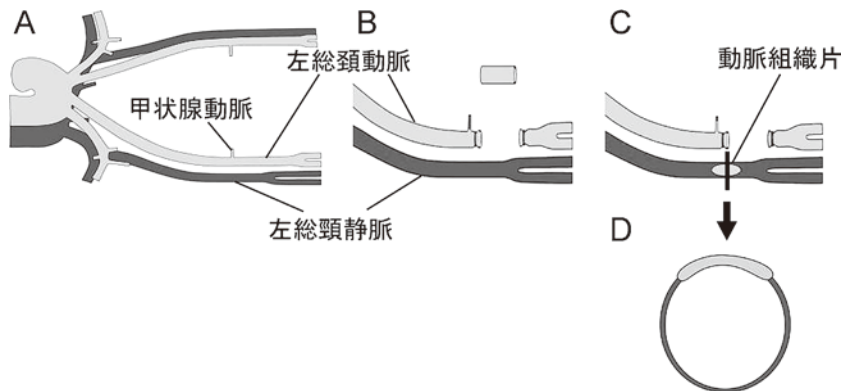


図1. 動脈パッチ移植による新生血管 (文献9より改変)

A: ウサギ頸部の解剖図

B: 甲状腺動脈より頭側から動脈組織片を採取する

C: 左総頸静脈へパッチ移植する

D: 動脈移植片部分の断面図

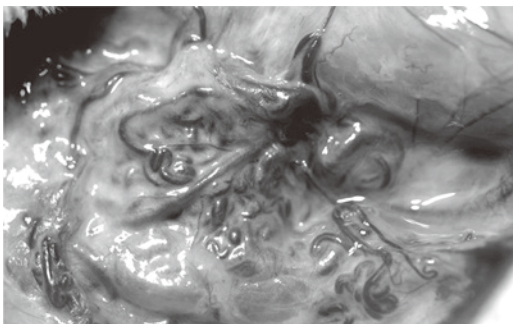


図2. 移植後1年経過した新生血管 (文献9より改変)

襲を加えていることと、動脈組織片の採取による虚血の影響が考慮された。そこで、コントロール実験として、① 頸部を切開しただけのもの、② 動静脈に切開を加えたもの (図3A)、③ 動脈を結紮したもの (図3B)、④ 動脈を結紮・切離して、静脈に切開を加えたもの (図3C) を作成したが、そのいずれも本モデルと同様の新生血管は生じなかった。手術侵襲や肉芽組織の影響は否定された。

また、動脈と静脈の組み合わせを変更した場合も検討したが、⑤ 静脈を静脈に移植したもの (図3D)、⑥ 静脈を動脈に移植したもの (図3E)、⑦ 動脈を動脈に移植したもの (図3F) のいずれも新生血管は生じなかった。以上の①～⑦のコントロール実験から、動脈組織片を静脈に移植することが本血管新生を誘導

するということが分かった。

2. 新生血管は経時的に成長する

動脈組織片を左総頸静脈にパッチ移植後7日目ではモヤモヤとした細い毛細血管の様な構造物が周囲の脂肪組織内に見られ (図4 A1)、10～14日目になると肉眼的に新生血管が確認できるようになり (図4 B1)、血管内には鮮紅色の動脈血が流入していた。また、左総頸静脈内に動脈血による鮮紅色の乱流も確認できるようになった。その後、日数の経過とともに新生血管は明瞭になる (図4 C1, D1)。

内腔側から動脈移植片を観察すると、7日目にはまだ新生血管は開口していないが (図4 A2)、10～14日目には約1 mmの開口部が確認できるようになる (図4 B2)。開口部の数は徐々に増加し、28日目では2～5 mmの穴が複数見られるようになり (図4 C2)、84日目になると隣接する開口部と癒合して大きな開口部を形成していた。新生血管の開口部は動脈移植片の中心部よりも辺縁に集中していた。

組織学的には7日目で弾性線維の少ない薄い壁を有する血管が見られ、その血管径は経過とともに徐々に増大していった (図5)。血流の増大に伴って新生血管の壁もわずかに肥厚し、厚い膠原線維が確認できるようになっていく。動脈組織片の縫い目の近くに新生血管の開口部が認められた。

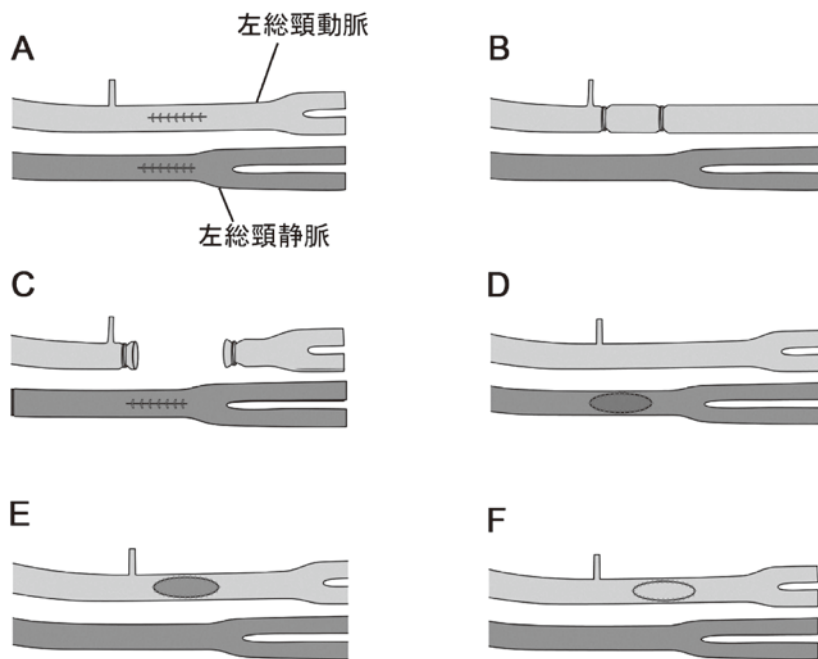


図 3. Control 実験 (文献 9 より改変)

- A: 動静脈の切開のみ
- B: 動脈の結紮のみ
- C: 動脈の結紮切断と静脈への切開
- D: 静脈に対して静脈移植片でパッチ手術
- E: 動脈に対して静脈移植片でパッチ手術
- F: 動脈に対して動脈移植片でパッチ手術

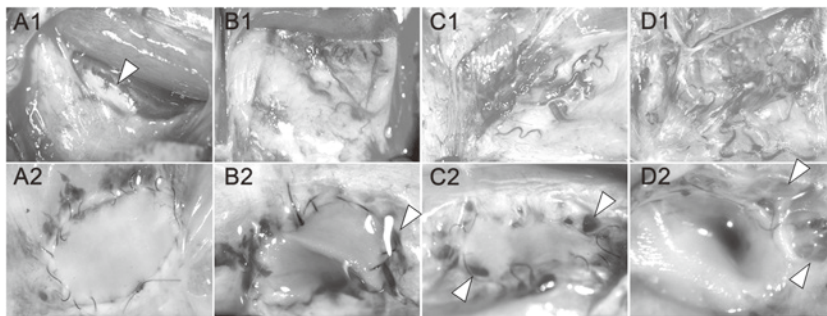


図 4. 新生血管の肉眼的変化 (上段) と血管内腔から見た動脈組織片周囲の新生血管の開口部 (下段) (文献 9 より改変)

- A1, A2: 動脈パッチ手術 7 日目
- B1, B2: 動脈パッチ手術 14 日目
- C1, C2: 動脈パッチ手術 28 日目
- D1, D2: 動脈パッチ手術 84 日目

(32)

静脈への動脈組織片移植による血管新生誘導

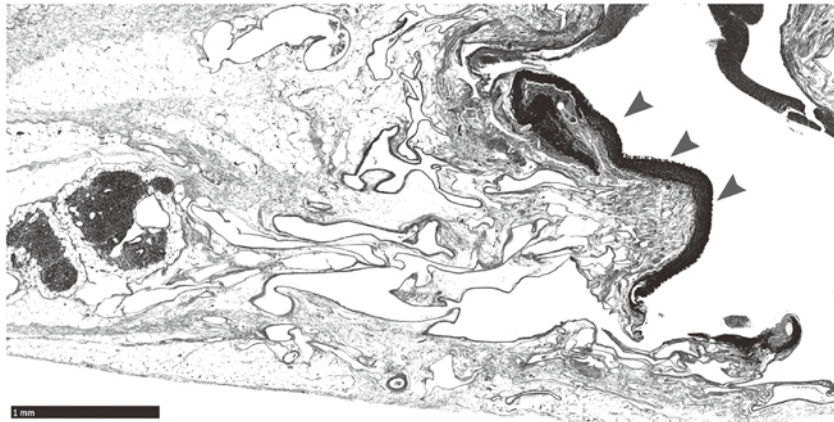


図 5. 術後 28 日目の動脈組織片（矢頭）周囲の新生血管（文献 9 より改変）
Scale bar = 1 mm.

3. 新生血管を介した動静脈瘻が 自発的に形成される

肉眼的に新生血管内には鮮紅色の血液が流れていることは確認していたが、それがどこから流入しているのかは不明であった。それを確認するため、腹部大動脈から血管造影カテーテルを挿入し、弓部大動脈から血管造影を行った。ウサギでは左鎖骨下動脈の第 2 分枝が左頸部組織を栄養しているが（図 6A），その第 2 分枝から新生血管を介して静脈へ流入する像が確認で

きた（図 6B）。その後、時間とともに血管径は徐々に増大し、シャント血流も増大していった（図 6C）。

血管造影から新生血管が動脈移植片周囲に開口することは分かったが、その開口する時期については未だ不明であった。そこで、新生血管が開口して動脈血が流入すると左総頸静脈内の酸素飽和度が上昇することを利用し、酸素飽和度の上昇のタイミングから新生血管が開口する時期を推定することにした。動物用パルスオキシメーターを使用し、同一個体で経時的（0, 3, 7, 10, 14, 28 日目）に測定した。測定部位は左総頸静脈

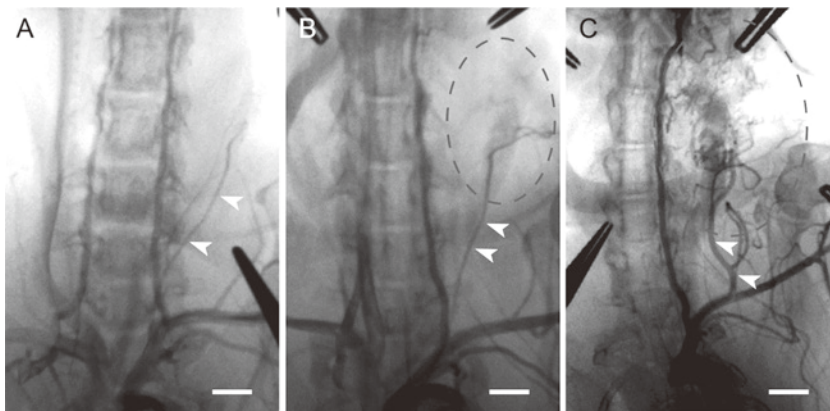


図 6. 血管造影では左鎖骨下動脈の第 2 分枝（矢頭）から新生血管を介した動静脈瘻の形成が確認できる（文献 9 より改変） Scale bar = 1 mm.

A: パッチ手術直後.

B: パッチ術後 28 日目.

C: パッチ術後 84 日目.

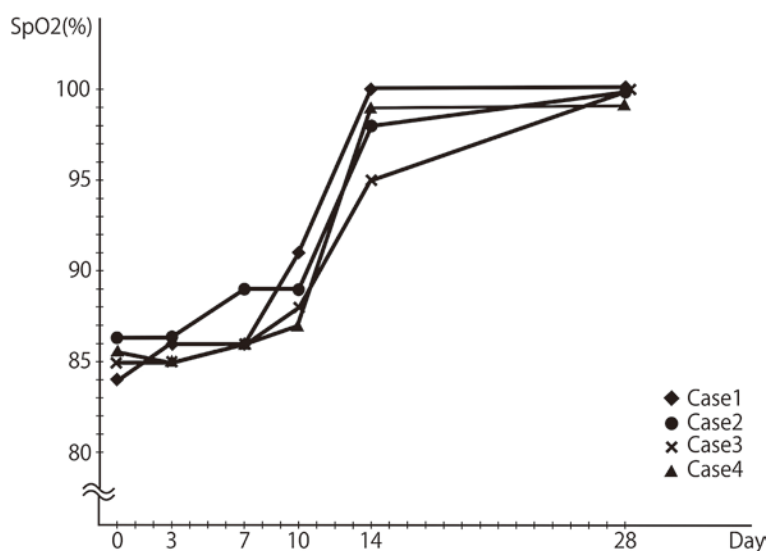


図 7. 左総頸静脈の酸素飽和度の経時的変化（文献 9 より改変）

の動脈移植部位よりも心臓側にパルスオキシメーターのプローブを直接接触させて計測した。酸素飽和度の測定結果では、0～10日目までは静脈血の酸素飽和度とはほぼ同様の 80 台後半であった。しかし、10～14日目の間に急激に上昇し、14日目以降はほぼ 100% のプラトーに達した（図 7）。ゆえに、我々はこの 10～14 日の期間に新生血管が左総頸静脈に開口すると推測した。

4. 新生血管は左鎖骨下動脈の分枝から伸長する

本モデルで誘導される新生血管がどこから伸長してくるのかを調べるために、我々は蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（Fluorescence *in situ* hybridization: FISH）解析を行った。本モデルでは、ある個体から採取した動脈組織片を別の個体に移植しても血管新生が生じることは分かっていた。そこで、オスの左総頸動脈を採取し、それをメスの左総頸静脈へパッチ移植した。その後、パラフィン包埋標本でウサギ Y 染色体プローブを用いて FISH を行った。

ウサギ Y 染色体プローブを用いた FISH 解析では、Y 染色体陽性の新生血管は動脈移植片周囲に局限していた（図 8）。大部分は FISH 陰性のメス由来の新生血管であった。つまり、本血管新生で生じる新生血管の

大部分は鎖骨下動脈の第 2 分枝から伸長し、動脈移植片から伸びる成分はわずかであった。

5. 動脈移植直後に血管新生因子（VEGFA, HIF-1 α ）が上昇する

血管新生では多くの血管新生因子が重層的、階層的に様々に関与していることが報告されている^{7, 10, 11)}。本血管新生における血管新生因子の関与について、ウサギ血清を用いて ELISA で確認した。本モデルを作成した後、同一個体から経時的に血清を採取し、その血清中に含まれる血中 VEGFA, TGF- β 1, HIF-1 α の濃度を測定した。

その結果、HIF-1 α は手術直後に急上昇し、3 日目にピークを迎え（図 9A）、その後徐々に漸減していた。VEGFA も手術直後から急上昇し、7 日目まで上昇を続けた（図 9B）。その後は徐々に漸減し、14 日目以降はプラトーになった。TGF- β 1 はほとんど変化しなかった（図 9C）。

動脈組織片での遺伝子発現に何らかの変化があるものと考え、網羅的遺伝子発現解析（cDNA マイクロアレイ解析）を行った。手術後 0（5 分後）、1, 3, 7 日目に動脈移植片を回収し、Total RNA を抽出して、cDNA マイクロアレイ解析を行った。

遺伝子発現解析では合計で 23,364 個の遺伝子発現

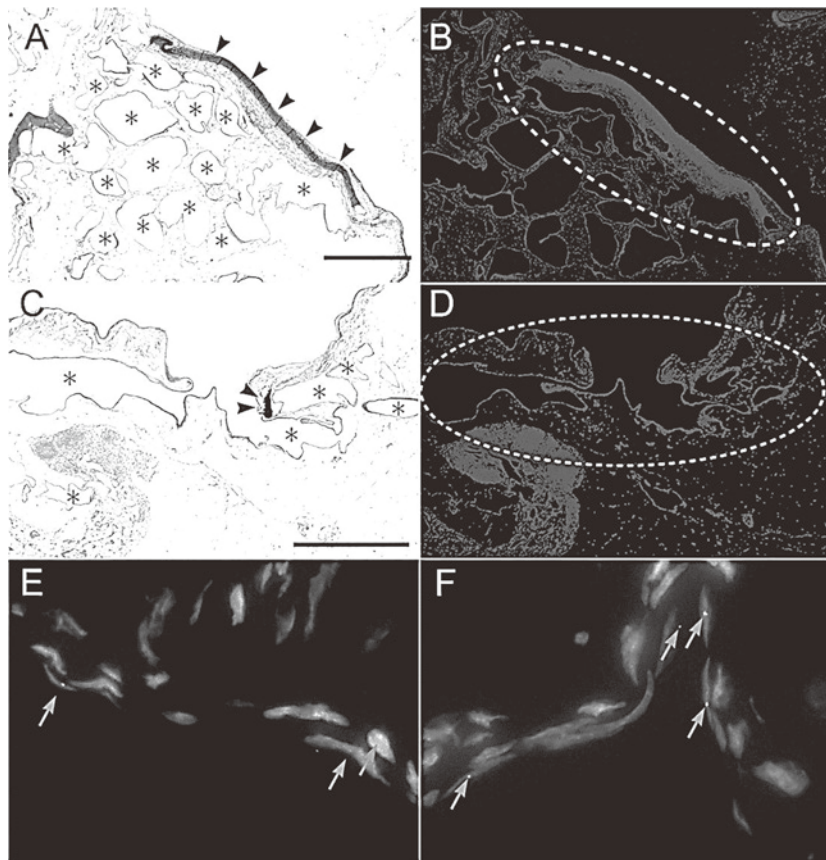


図8. 動脈組織片周囲の新生血管とY染色体FISH解析（文献9より改変）
 A, C: 動脈組織片（矢頭）周囲の新生血管（*）（40倍） Scale bar = 1 mm.
 B, D: FISH 解析（40倍）. 点線内に動脈組織片由来のY染色体を確認
 E, F: 動脈組織由来のY染色体（矢印）（400倍）

が確認された。Day1, 3, 7においてDay0と比較してFold change > 4であったものがそれぞれ165個, 131個, 137個であった（図10A）。Day1で遺伝子発現が大きく変化していることが分かった（図10B）。その中でVEGFAの発現は確認することができた一方、TGF- β 1は変化していなかった。ヒトAVMではいくつかの原因遺伝子が指摘されており¹²⁾、本モデルでもヒトと共通するMMP9, MMP12, PTX3, S100A8, S100A9, IL1R2, BCL2A1, PRG4の8つの遺伝子が発現していることを確認した。また、*In vitro*でのVEGFA刺激内皮細胞の遺伝子発現解析を行った研究では、血管新生に関与する367個の遺伝子が報告されている¹³⁾。本研究では、Day1で165個の遺伝子が有意にアップレギュレートされており、VEGFA, BMX, CCR1,

EGLN3, FGF7, IL-1A, IL-1R2, IL-1RAP, SDC3, MMP9, MMP12, TIMP1などが合致していた。故に、VEGFAが本血管新生にも深く関与していると考えているが、遺伝子発現を含めた分子生物学的解析については現在も検討中であり、今後の課題である。

結 語

本研究では動脈移植片を静脈に貼り付けることによって、既存の動脈分枝から新生血管が伸長し、動脈移植片部分へ吻合することを報告した。本パッチ血管新生誘導法には既存の*in vivo*血管新生誘導法とは異なる点がある。第一に、血管新生因子の注入なしで、局所に比較的血管径の大きな新生血管を、高い再現性

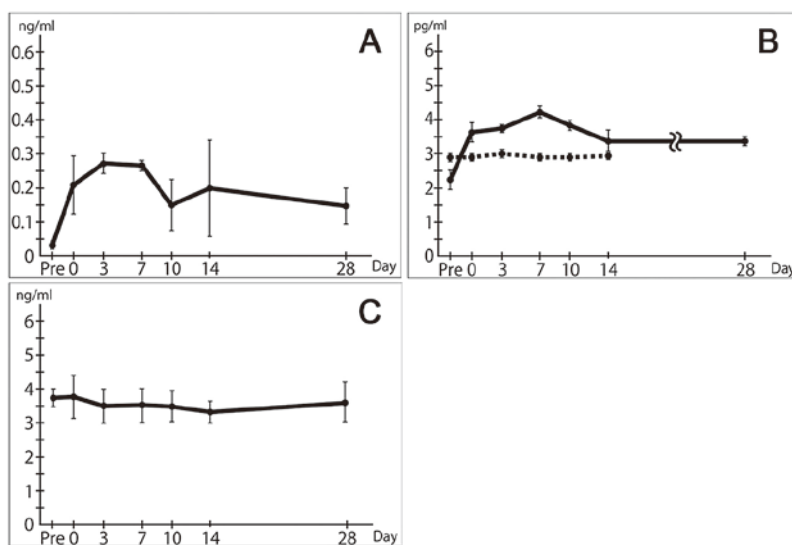


図 9. 血管新生因子 (HIF-1 α , VEGFA, TGF- β 1) の経時的変化 (文献 9 より改変)
 A: 血中 HIF-1 α 濃度 B: 血中 VEGF 濃度 C: 血中 TGF- β 1 濃度

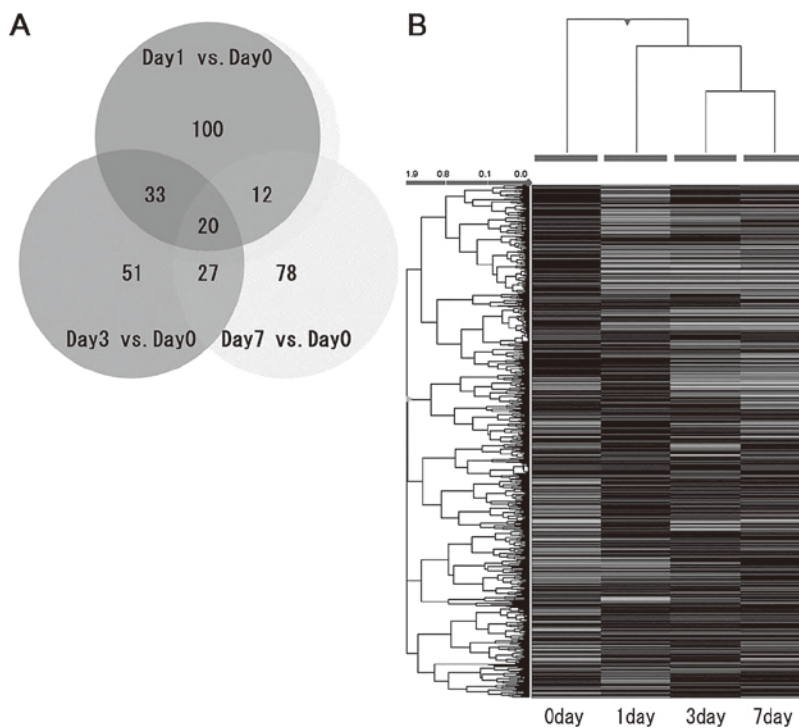


図 10. 網羅的遺伝子発現解析 (文献 9 より改変)
 A: Day1, 3, 7 と Day0 (パッチ手術直後) との比較解析
 B: Day0, 1, 3, 7 におけるクラスター解析

を持って誘導することができる。第二に、肉芽組織や局所の虚血とは無関係に新生血管が誘導できる。第三に、新生血管を介して動静脈が直接吻合し、AVMに類似した構造が形成される。第四が血管新生のプロセスが全て自発的に始まる。

今回、本実験は左頸動静脈を使用して行った。本誘導法を右頸動静脈や下大静脈で行ったが、部位を変えても新生血管を誘導することが可能である。このことから、本血管新生は場所を選ばず、どの血管でも起こる現象と考えられる。血管に内在する血管新生/脈管新生のシステムを動脈パッチ移植によって目覚めさせたのではないかと予想される。

本研究では、静脈血の低張り応力や低圧、低酸素濃度の影響については未だ評価はできていない。静脈血に特徴的なそれらの要因を独立して評価していくことは今後の課題であり、*in vivo*での研究も計画している。また、この誘導法が他の哺乳動物でも応用できるのかについても現在検討中である。

動脈と静脈とは分子生物学的に異なる点があるなど、血管には未だ不明な点が多いのが現状である¹⁴⁾。本現象は正常の血管新生や腫瘍血管新生など血管が新たに発生するときの共通のメカニズムを示唆している可能性があり、AVMの解明はもちろんのこと、腫瘍血管新生の抑制や虚血性疾患への血管新生誘導、再生医療などへの応用などが期待される。血管新生の制御と新たな治療法の開発を目指して今後も研究を継続していく所存である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、共同研究者の皆様、講座スタッフの皆様、本研究にご協力頂きました全ての方々に心から感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Nakabayashi, T., Kudo, M., Hirasawa, T. and Kuwano, H. (2004) Arteriovenous malformation of the jejunum detected by arterial-phase enhanced helical CT, a case report. *Hepatogastroenterology*, **51**, 1066-1068.
- 2) Jellema, K., Tijssen, C.C., Fijnheer, R., de Groot, P.G., Koudstaal, P.J. and van Gijn, J. (2004) Spinal dural arteriovenous fistulas are not associated with prothrombotic factors. *Stroke*, **35**, 2069-2071.
- 3) Steinmetz, M.P., Chow, M.M., Krishnaney, A.A., Andrews-Hinders, D., Benzel, E.C., Masaryk, T.J., Mayberg, M.R. and Rasmussen, P.A. (2004) Outcome after the treatment of spinal dural arteriovenous fistulae: a contemporary single-institution series and meta-analysis. *Neurosurgery*, **55**, 77-87; discussion 87-78.
- 4) Lalitha, N., Seetha, P., Shanmugasundaram, R. and Rajendiran, G. (2016) Uterine Arteriovenous Malformation: Case Series and Literature Review. *J. Obstet. Gynaecol. India*, **66**, 282-286.
- 5) Caselitz, M., Wagner, S., Chavan, A., Gebel, M., Bleck, J.S., Wu, A., Schlitt, H.J., Galanski, M. and Manns, M.P. (1998) Clinical outcome of transfemoral embolisation in patients with arteriovenous malformations of the liver in hereditary haemorrhagic telangiectasia (Weber-Rendu-Osler disease). *Gut*, **42**, 123-126.
- 6) Faughnan, M.E., Lui, Y.W., Wirth, J.A., Pugash, R.A., Redelmeier, D.A., Hyland, R.H. and White, Jr. R.I. (2000) Diffuse pulmonary arteriovenous malformations: characteristics and prognosis. *Chest*, **117**, 31-38.
- 7) Adams, R.H. and Alitalo, K. (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 464-478.
- 8) Milton, I., Ouyang, D., Allen, C.J., Yanasak, N.E., Gossage, J.R., Alleyne, Jr. C.H. and Seki, T. (2012) Age-dependent lethality in novel transgenic mouse models of central nervous system arteriovenous malformations. *Stroke*, **43**, 1432-1435.
- 9) Ito, Y., Yoshida, M., Maeda, D., Takahashi, M., Nanjo, N., Masuda, H. and Goto, A. (2018) Neovasculture can be induced by patching an arterial graft into a vein: A novel in vivo model of spontaneous arteriovenous fistula formation. *Scientific Reports*, **8**, 3156.
- 10) Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, **473**, 298-307.
- 11) Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-257.
- 12) Takagi, Y., Aoki, T., Takahashi, J.C., Yoshida, K., Ishii, A., Arakawa, Y., Kikuchi, T., Funaki, T. and Miyamo-

- to, S. (2014) Differential gene expression in relation to the clinical characteristics of human brain arteriovenous malformations. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **54**, 163-175.
- 13) Chu, L.-H., Lee, E., Bader, J.S. and Popel, A.S. (2014) Angiogenesis Interactome and Time Course Microarray Data Reveal the Distinct Activation Patterns in Endothelial Cells. *PLoS ONE*, **9**, e110871.
- 14) Wang, H.U., Chen, Z.F. and Anderson, D.J. (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, **93**, 741-753.