

原 著

皮下，粘膜下における海綿状血管腫および 静脈性血管腫の免疫組織学的検討

—特に肉芽組織型血管腫との比較において—

獨協医科大学 整形外科学

田中 浩史

要 旨 血管腔の著明な拡張を呈する形態学的特徴をもつ海綿状血管腫 (CH) および静脈性血管腫 (VH) の増殖様式と形態形成機序を解明するため肉芽組織型血管腫 (GTTH) を対照群に、細胞増殖因子、血管新生調節因子、細胞外マトリックスについて免疫組織学的に比較検討を行った。海綿状血管腫、静脈性血管腫の Ki-67 は、肉芽組織型血管腫よりも低く、緩徐に増殖する腫瘍とみなされた。血管新生調節因子のうち TGF- β は海綿状血管腫および静脈性血管腫の間質層において有意に低値であり、PDGF は海綿状血管腫の間質層において有意に高値であった。TGF- β は、これら二つの腫瘍における異常な血管拡張に対し中心的な役割を果たしていることが示唆された。PDGF のスコア値の差は海綿状血管腫と静脈性血管腫の壁細胞分布の違いに関連していることが示唆された。Type III collagen は間質層において、fibronectin は内皮層において両腫瘍とも高値だった。血管新生の過程において、従来検討の少なかった線維芽細胞をはじめとする間質層の細胞の役割が重要である。

Key Words : 海綿状血管腫, 静脈性血管腫, 細胞外マトリックス, platelet-derived endothelial growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGF- β)

緒 言

海綿状血管腫と静脈性血管腫は、ともに著明な血管腔の拡張を呈する組織形態学的特徴を持つ良性血管性腫瘍である^{1,2)}。海綿状血管腫は主に小児に発生し、静脈性血管腫は成人に発生する。両者の鑑別は、平滑筋層の有無によりなされる。しかし静脈性血管腫の中で海綿状血管腫と区別のつかない像を呈するものを hemangioma of mixed (cavernous and venous) type としている文献もあり、両者についての類似性も指摘されている。

近年、血管新生についての *in vitro* および *in vivo* の研究が進み、信頼度の高い仮説がたてられている^{3~6)}。最近血管腫の原因についても、これらの見地から血管新生調節因子および細胞外マトリックスの異常を指摘する報告がみられ、その異常が種々の血管腫の発生に大きく関わっていることが推定されている^{7~10)}。しかし、海綿状

血管腫や静脈性血管腫における異常な血管拡張を伴う腫瘍性血管の増殖と血管新生調節因子および細胞外マトリックスとの関連について免疫組織学的に検討した報告は、少ない。また血管壁の重要な構成成分と考えられる線維芽細胞をはじめとする間質細胞の役割についての報告は、著者の知る限りほとんどない。そこで今回、対照群として反応性の病変とも考えられ^{11,12)}、毛細血管の増殖を特徴とする肉芽組織型血管腫 (pyogenic granuloma) を用いて、細胞増殖因子、血管新生関連因子、細胞外マトリックスの分布について免疫組織学的に比較検討し、共通の形態特徴を示す海綿状血管腫および静脈性血管腫の血管新生上ないし形態形成上の特徴を解明しようと試みた。

方 法

1. 対 象

1995年から2000年に獨協医科大学および足利赤十字病院で採取された皮下、粘膜下に生じた海綿状血管腫17例、静脈性血管腫14例、肉芽組織型血管腫15例を対象とした(表1)。臨床所見は、病理組織依頼票および

平成14年10月28日受付, 平成14年12月10日受理

別刷請求先: 田中浩史

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880

獨協医科大学 整形外科学

表1 対象症例

	海綿状血管腫	静脈性血管腫	肉芽組織型血管腫
総数	17	14	15
年齢 (歳)			
	範囲	12 - 68	11 - 65
	平均	45.5	42.5
性別数			
	男性	10	8
	女性	7	6
部位別数			
	口腔及び鼻腔内	0	5
	頭頸部	9	4
	体幹	1	1
	上肢	6	2
	下肢	1	2

表2 使用抗体及び前処置一覧

抗体	一次抗体	希釈倍率	前処置	メーカー
SMA	Mouse mAb	1 : 50	-	Dako, A/S, Glostrup, Denmark
VEGF	Mouse mAb	1 : 100	-	IBL Co., Gunma, Japan
PDGF	Rabbit pAb	1 : 25	Microwave	Oncogene research products, Darmstadt, Germany
bFGF	Rabbit pAb	1 : 30	Microwave	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
TGF β	Mouse mAb	1 : 20	Microwave	Novocastra
Ki-67	Mouse mAb	1 : 50	Microwave	Immunotech, Marseille, France
Ang-1	Goat pAb	1 : 500	-	Santa Cruz
Ang-2	Goat pAb	1 : 500	-	Santa Cruz
Tie-2	Rabbit pAb	1 : 500	-	Santa Cruz
Col III	Mouse mAb	1 : 50	-	Daiichi Fine Chemical Co., Toyama, Japan
Col IV	Mouse mAb	1 : 50	Trypsin	Dako
Fibronectin	Rabbit pAb	1 : 400	Protanase K	Dako

SMA, smooth muscle actin ; VEGF, vascular endothelial growth factor ; PDGF, platelet derived endothelial growth factor ; bFGF, basic fibroblast growth factor ; TGF- β , Tissue growth factor beta ; Ang, angiopoietin ; Col III, Type III collagen ; Col IV, Type IV collagen ; mAb, monoclonal antibody ; pAb, polyclonal antibody.

診療録から得た。病理組織診断には、ホルマリン固定パラフィン切片を用いてhematoxylin-eosin (HE) 染色およびMasson-trichromeによる弾性線維染色、平滑筋アクチンによる免疫組織化学染色を施行し、その結果により診断した。

2. 免疫組織学的解析

1) 免疫組織化学染色方法

免疫染色は以下のようにして行った。平滑筋アクチン (SMA)、細胞増殖マーカーのKi-67 antigen (Ki-67)、血管新生調節因子のvascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet-derived endothelial growth factor (PDGF)、transforming growth factor beta (TGF- β)、細胞外マトリックスのanti-human type III collagen

(Col III), anti-human type IV collagen (Col IV), anti-human fibronectin (fibronectin) のそれぞれに対してはstreptavidin-biotin-peroxidase (SAB) 法 (Immunotech, Marseille, France) を用いて免疫染色を行った。また、血管新生調節因子および受容体であるangiopoietin-1 (Ang-1), angiopoietin-2 (Ang-2), tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2 (Tie-2) に対してはavidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法 (Elite ABC kit ; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて免疫染色を行った。それぞれ用いた抗体および希釈倍率、前処置を表2に示す。細胞外マトリックスの陽性コントロールとしてCol IIIは正常皮膚組織を、Col IV, fibronectinは正常腎組織を使用した。陰性コントロールは、それぞ

れ一次抗体を正常マウス免疫グロブリン, 正常ウサギ免疫グロブリン, 正常ウシ免疫グロブリンに置換したものを使用した。

2) 免疫組織染色の評価

各標本に対する免疫染色の評価は, 組織学的な血管層別に行った。すなわち海綿状血管腫と肉芽組織型血管腫は, それぞれの血管を内皮および内皮下層(以下内皮層), 血管周囲間質層に層別し, 各々評価を行なった。静脈性血管腫は内皮層, 平滑筋層, 血管周囲間質層の3層に層別化し評価を行った。

増殖因子Ki-67に対しては, 各層ごとの200細胞に対する陽性細胞の百分率をlabeling index (以下L.I) として評価した。

血管新生調節因子および受容体に対しては, 各層ごとの200細胞に対する陽性細胞の百分率を求め, 以下の4つの段階にスコア化した。0:陽性率0~4%, 1:陽性率5~24%, 2:陽性率25~44%, 3:陽性率45%以上。

細胞外マトリックスに対しては, その分布と発現強度により以下の4つの段階に半定量的にスコア化した。0:陰性, 1:弱陽性, 2:局所的だが中等度~強陽性, 3:びまん性に中等度~強陽性。

尚, 発現強度については陽性コントロールと同程度の発現を中等度とし, 評価を行った。

3) 統計学的解析

免疫染色の結果に対し, おのおの組織学的な血管層別に静脈性血管腫, 海綿状血管腫, 肉芽組織型血管腫の3腫瘍間のKi-67-L.I, 血管新生調節因子および受容体のスコア値, さらに細胞外マトリックスのスコア値について統計学的比較を行った。統計学的手法はノンパラメトリック多重比較検定であるSteel法を用いて行い, 危険率5%以下を有意差ありとした。統計処理には統計用ソフトウェアを使用した(Stat Light, Yukms Corp., Tokyo, Japan)。

結 果

1. 平滑筋アクチンについて(図1)

平滑筋アクチンは, 海綿状血管腫において内皮層に一致して陽性を示した。これらの陽性細胞は単層の配列を示し, 周細胞と考えられた。静脈性血管腫においては多層の平滑筋層に一致して陽性を示したが, その平滑筋層は一様ではなく, 一部では菲薄化し途絶している部位も認められた。肉芽組織型血管腫では, 内皮層に単層に配列する陽性細胞を認めた。この陽性細胞も海綿状血管腫と同様に周細胞と考えられた。

2. 細胞増殖関連抗原について(図1, 4)

Ki-67-L.Iについて静脈性血管腫, 海綿状血管腫共に同等の値であった。また, 内皮層と間質層とも差はなかった。肉芽組織型血管腫との比較では, 静脈性血管腫および海綿状血管腫は, 共に内皮層, 血管周囲間質層いずれも統計学的に有意に低値であった。

3. 血管新生調節因子について(図2, 5)

TGF- β では, 海綿状血管腫および静脈性血管腫の間質層が肉芽組織型血管腫のそれよりスコア値が有意に低かった。またPDGFについては, 海綿状血管腫の間質層が肉芽組織型血管腫のそれより有意に高いスコア値を示した。そのほかの因子については統計学的に有意差を認めなかった。

4. 細胞外マトリックスについて(図3, 6)

Col IIIは, いずれの腫瘍も間質層のスコア値が高かった。静脈性血管腫および海綿状血管腫の間質層におけるCol IIIは肉芽組織型血管腫のそれよりスコア値が高く, とくに静脈性血管腫は有意に高かった。基底膜及び結合組織の構成成分であるfibronectinは, 両腫瘍, 対照群とも内皮層のスコア値が高かった。なかでも静脈性血管腫, 海綿状血管腫は共に内皮層のスコア値が肉芽組織型血管腫より高く, 特に静脈性血管腫では有意に高かった。しかし, もう一つの基底膜の構成成分であるCol IVはスコア値の分布に差を認めなかった。

考 察

組織の低酸素状態や創傷治癒過程では, 新しい血管が伸張してこれらの病態を改善する。既存の血管から新しい血管が局所に形成される過程は, 血管新生(angio-genesis)と総称され, 未分化な血管内皮細胞による胎生期の血管構造の構築過程である脈管形成(vasculogenesis)とは区別して考えられている。血管新生は一般的に五つの段階, すなわち, 1)基底膜やその周囲のマトリックスの融解, 2)内皮細胞の増殖や遊走, 3)管腔形成とそれに続く細胞外マトリックスの沈着および再生, 4)平滑筋細胞, 周細胞の血管壁への引き寄せ, 5)近隣の新生血管同士の間接による血管網の形成と再構築によりおこなわれる。

こうした血管新生には血管新生調節因子が深く関わっている。血管新生の開始には, Ang-1, 2とそのレセプターであるTie-2のシステムが重要な役割を担っていると考えられている。すなわち, 血管は通常の状態においては, 血管内皮細胞とその周囲を裏打ちする壁細胞(平滑筋細胞や周細胞)が強固に接着しており血管構造が保

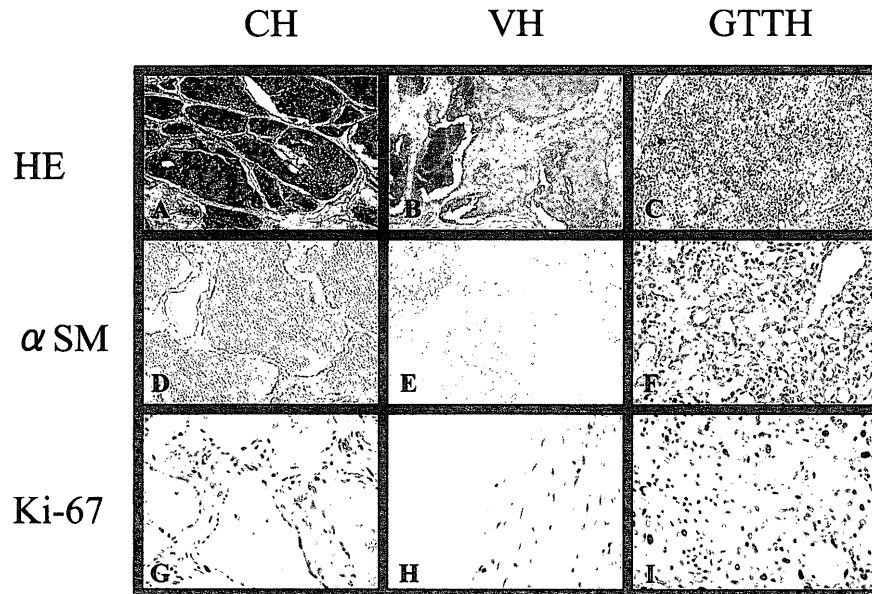


図1

上段 (A-C) : HE 染色

毛細血管の増殖を主体とする肉芽組織型血管腫 (GTTH) に対し, 海綿状血管腫 (CH), 静脈性血管腫 (VH) は著明な血管拡張を示している。

(A \times 4, B \times 4, C \times 10)

中段 (D-F) : 平滑筋アクチンの免疫組織化学的光顕像

GTTH 及び CH の内皮下層に周細胞と思われる陽性像を認める。VH は明らかな平滑筋層の存在を示す。

(D \times 10, E \times 20, F \times 40)

下段 (G-I) : Ki-67 の免疫組織化学的光顕像

GTTH に対し CH, 静脈性血管腫における Ki-67 の陽性像は非常に少ない。

(G-I \times 40)

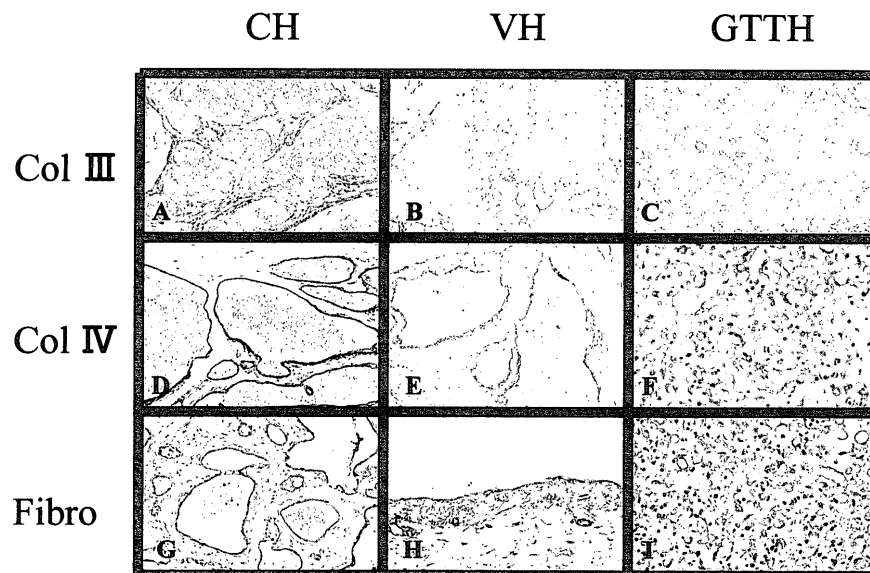


図3 細胞外マトリックスの免疫組織化学的光顕像

Type III collagen (Col III, A-C) : 全ての腫瘍において間質層中心に分布を認めるが, GTTH (間質層スコア値 = 1) に比し CH, VH の発現がより強い (共に間質層スコア値 = 3)。Type IV collagen (Col IV, D-F) : 全ての腫瘍において血管内皮層及び平滑筋層中心に分布を認める (内皮層, 平滑筋層ともスコア値 = 3)。Fibronectin (Fibro, G-I) : 血管内皮層中心に分布を認める (内皮層スコア値 = 3)。

(A, B, D, E, G, H \times 20, C, F, I \times 40)

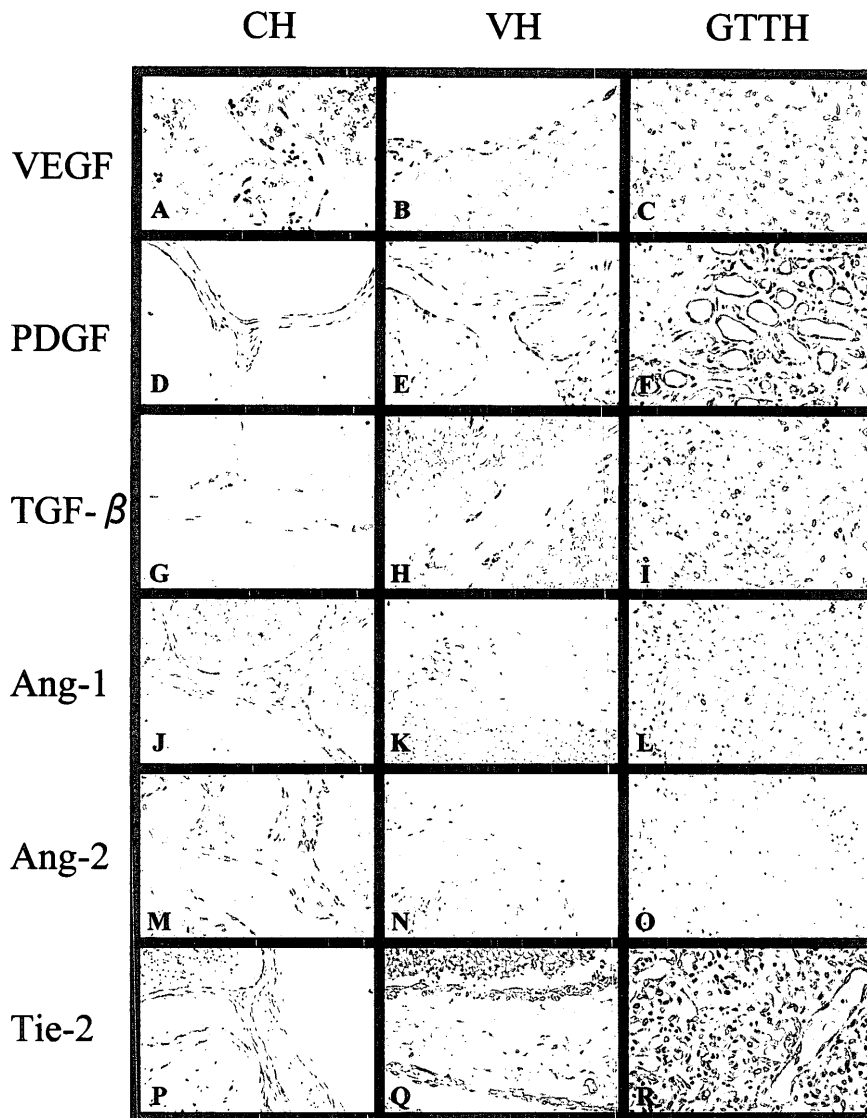


図2 血管新生調節因子および受容体の免疫組織化学的光顕像
 VEGF (A-C)：いずれも血管内皮層を中心に陽性像を認める，PDGF (D-F)：
 いずれも血管内皮層を中心に陽性像を認める．CHおよびGTTHには間質層にお
 いても陽性細胞を認める，TGF-β (G-I)：GTTHが間質層中心に陽性像が認め
 られるのに対しCH, VHの間質層には陽性像を認めない．Ang-1 (J-L)：いず
 れもほとんど陽性像を認めない．Ang-2 (M-O) いずれもほとんど陽性像を認
 めない．Tie-2 (P-R) 各腫瘍とも血管内皮層を中心に陽性像を認める．
 (A-R×40)

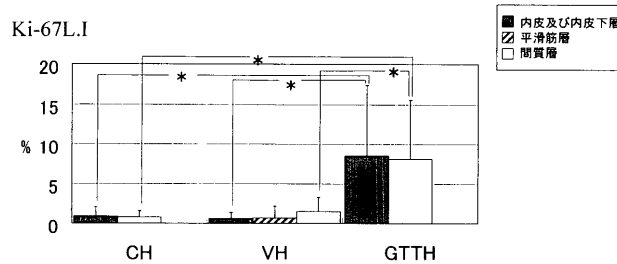


図4 血管組織層別 Ki-67 labeling index (*P < 0.05)

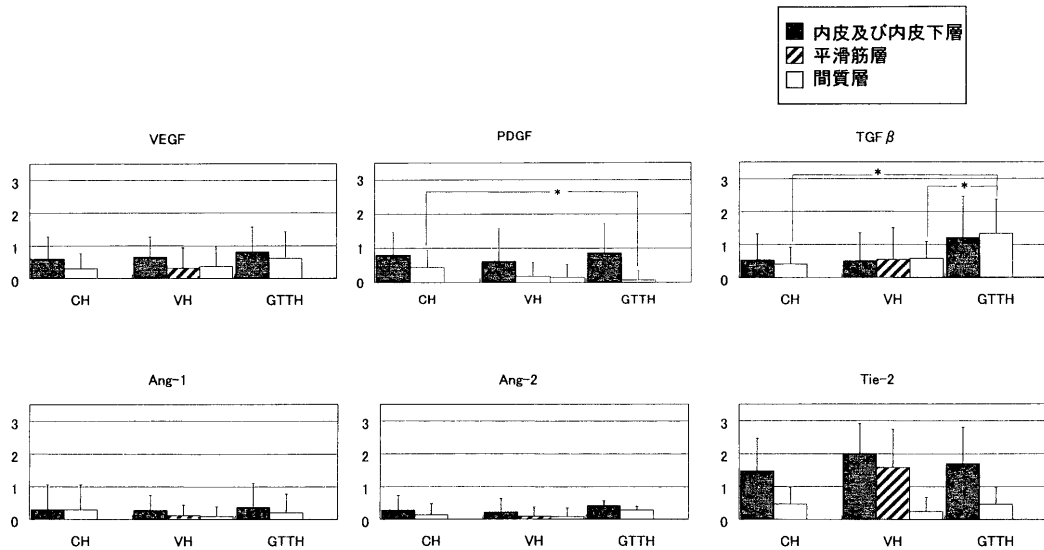


図5 血管組織層別の血管新生調節因子の分布

スコア：0, 陽性細胞0-4%; 1, 5-24%; 2, 25-44%; 3, 45%以上8 (*P < 0.05)

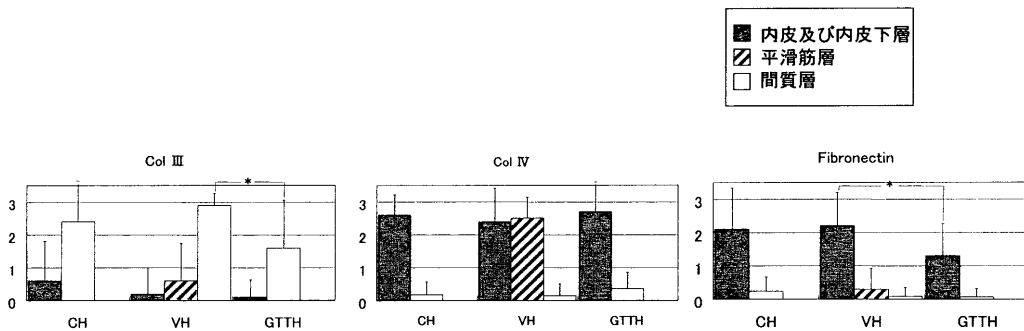


図6 血管組織層別の細胞外マトリックスの分布

スコア：0, 陰性; 1, 弱陽性; 2, 局所的だが中等度~強陽性; 3, びまん性に中等度~強陽性 (*P < 0.05)

たれている。この状況は、壁細胞が分泌する Ang-1 が血管内皮細胞上の Tie-2 を刺激し、内皮細胞と壁細胞のマトリックスを介した接着を誘導することにより維持されている^{13, 14)} (図7)。しかし、組織で低酸素状態などが生じると血管内皮細胞や周囲の間葉系細胞からの Ang-2 の産生が高まる。そして Tie-2 に対する結合が Ang-1 より優位になると、壁細胞が血管内皮細胞から離開し血管新生が始まる¹⁵⁾。また、このような初期の血管形成には VEGF の存在が必須であり、それは初期血管における内皮細胞のアポトーシス抑制因子であると示唆されている^{16, 17)} (図7)。それ以降の血管新生の各段階にも血管新生調節因子の深い関与が認められる。この成熟血管となる際の詳細な過程は、Folkman らの仮説が広く受け入れられている³⁾。その仮説は、まず間葉系細胞から Ang-1 が放出され、内皮細胞表面にある Tie-2 受容体と結合する。その刺激により内皮細胞から PDGF などのサイトカインが放出され、それにより間葉系細胞が内皮細胞周囲

に集まる。集合した間葉系細胞と内皮細胞が接触すると非活性型 TGF-β が活性化される。その活性化された TGF-β は、間葉系細胞に対し周細胞や平滑筋細胞への分化を誘導し、それ以上の内皮細胞の増殖を阻害し、細胞外マトリックスの沈着を促すことにより成熟血管形成に導くとした (図8)。さらに Folkman らは、著明な血管拡張を示す家族性の静脈奇形 (venous malformation) についてもこの angiogenesis の過程の異常により生じるとしている。今回、海綿状血管腫および静脈性血管腫においても angiogenesis の過程の異常により著明な血管拡張を生じると仮定し、各因子の免疫抗体を用いてこれらの血管新生調節因子等を免疫組織学的に検索することにより解明を試みた。

1. 腫瘍の各層の構成細胞について

海綿状血管腫を構成する血管は毛細血管あるいは細静脈が拡張したものと考えられている。その血管壁は、内

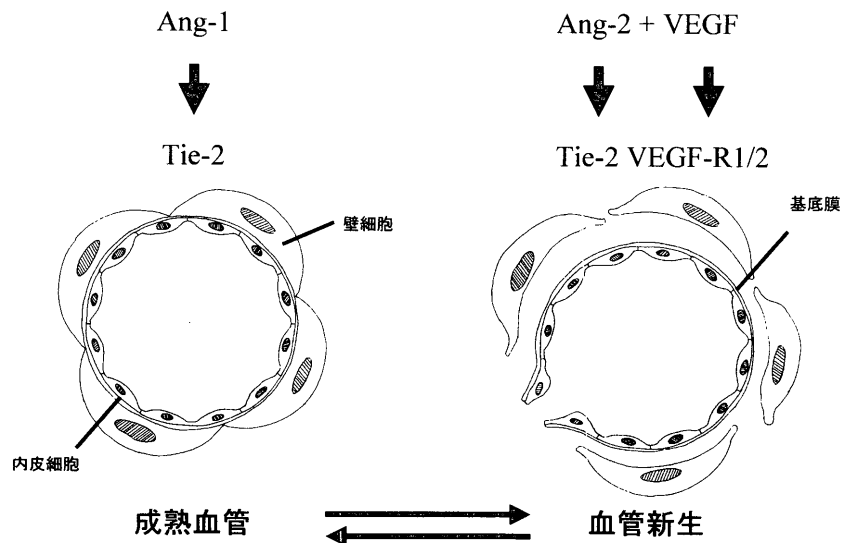


図7 血管新生におけるAng/Tieシステムの役割 (文献16より改変)
* VEGF - R1/2 : それぞれ VEGF に対する受容体.

皮細胞と周細胞からなり内皮下層には基底膜を認める。周囲間質層は、線維芽細胞や肥満細胞および豊富な膠原線維からなる^{1, 2, 18, 19)}。静脈性血管腫を構成する血管は、拡張した壁の薄い静脈様血管からなる。その壁は一層の内皮細胞と多層の平滑筋層、その周囲間質層における線維芽細胞、肥満細胞、そして膠原線維束からなる^{1, 2, 20)}。一方、肉芽組織型血管腫は主に毛細血管の増殖からなり、その血管壁には内皮細胞と周細胞、基底膜、その周囲間質層に線維芽細胞、血液由来細胞そして少量の膠原線維を認める^{1, 2, 12, 20)}。

2. 細胞増殖因子について

細胞増殖因子であるKi-67は、細胞分裂期の細胞核に検出される核蛋白である。Ki-67-labeling indexは、海綿状血管腫および静脈性血管腫共に非常に低かった(図4)。そのため、組織学的な層間における増殖能の差を明らかにすることはできなかった。また、海綿状血管腫および静脈性血管腫のKi-67-labeling indexは、肉芽組織型血管腫と比較して有意に低値であった。肉芽組織型血管腫は、発症から数週間で急速に発達する。そのため、海綿状血管腫と静脈性血管腫は、肉芽組織型血管腫と比べ緩徐な増殖を示す腫瘍であると推定された。

3. 血管新生調節因子について

血管新生調節因子において対照群と比較して有意差を認めたのは、海綿状血管腫および静脈性血管腫の間質層におけるTGF-βと海綿状血管腫の間質層におけるPDGFであった(図5)。これらの結果は、非常に示唆に富んでいる。

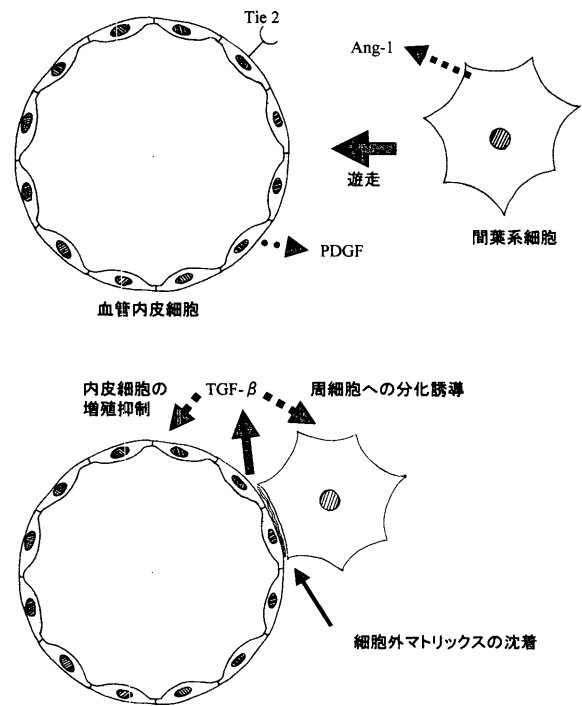


図8 血管の成熟過程 (文献3より改変)

まずTGF-βについては、海綿状血管腫および静脈性血管腫の間質層は、ともに肉芽組織型血管腫のそれより有意に低値であった。TGF-βは内皮細胞の増殖を阻害し、細胞外マトリックスの沈着を促すことにより、血管をより安定化したものに導く因子とされている^{3, 17)}。Folkmannらは、TGF-βの発現の低下は内皮細胞と周囲の間質細胞との増殖のバランスの崩壊をもたらすとしている³⁾。すなわちTGF-βの発現の低下は間質細胞と比

較して内皮細胞の増殖を優位にする。その結果間質細胞の少ない薄い血管壁が形成され、血管拡張をきたすとしている。同様の機序が海綿状血管腫、静脈性血管腫の形態形成に関与している可能性が示唆された。すなわち、両者はTGF- β の低下により内皮細胞の増殖が優位になり内腔拡張性変化が著しくなったものと推察できる。また、TGF- β の発現低下は、細胞外マトリックスの沈着低下をきたすことが考えられる。血管壁の厚さは細胞要素に加え細胞外マトリックスの量が関係する。そのため、この細胞外マトリックスの産生低下は薄い血管壁の形成の一因となるかもしれない。

一方、PDGFは、海綿状血管腫において有意に高値であった。PDGFは、平滑筋細胞および周細胞を血管周囲に集簇、増殖させる作用をもつと考えられる²²⁾。PDGFノックアウトマウスでは血管内皮下の周細胞の補充が不十分になり、多数の微小血管瘤ができる²²⁾。本研究の症例において平滑筋アクチンによる壁細胞の分布を見ると、PDGFが有意に高値の海綿状血管腫には内皮下層に一致して周細胞が一層分布していた²³⁾。それに対し、肉芽組織型血管腫とPDGFのスコア値に有意差のない静脈性血管腫では、平滑筋層の分布に不規則な菲薄化や途絶を認めた。すなわち、海綿状血管腫のPDGFの高値は拡張した血管腔内面に増殖した内皮細胞に対応して周細胞が集簇し裏打ちされた結果を示すものであり、逆にそれより低値の静脈性血管腫では拡張した血管腔に相応の反応が起らず、平滑筋層の不規則な分布が生じると推察した。しかし、著者の渉猟した範囲ではそのPDGFの発現の増大による影響などについて言及した文献はなく、この結果に対しさらなる検討が必要と考えられる。

4. 細胞外マトリックスについて

Type III collagenは海綿状血管腫、静脈性血管腫の間質層が肉芽組織型血管腫と比較して高値であり、静脈性血管腫では有意差を認めた。Type IV collagenはいずれの層も有意差を認めなかったが、fibronectinは内皮層において海綿状血管腫、静脈性血管腫とも肉芽組織型血管腫に比し有意に高値であった(図6)。Type III collagenは血管壁膠原線維の主要な成分である間質マトリックスの一つである。またfibronectinは、Type IV collagenとともに基底膜の主要な構成成分の一つである²⁴⁾。TGF- β はこれらの細胞外マトリックスの産生を促すが^{10, 24, 25)}、海綿状血管腫と静脈性血管腫のこれら細胞外マトリックスが高値であったこととTGF- β がこの二つの腫瘍において低値であることとは一見矛盾する。この事について、これら細胞外マトリックスは血管新生の早期より検出され、その血管成熟の進行あるいは血管腫の壁の線維化と

共に蓄積が進む^{26, 27)}。一方、Ki-67 labeling indexの結果から、海綿状血管腫および静脈性血管腫が、その拡大した血管を形成するのにより長い時間経過を要したと推察できる。したがって、この細胞外マトリックスの高値は血管新生における長時間経過の結果とみなされ、TGF- β の低値と必ずしも矛盾しないと考えられた。しかしもう一つの基底膜の重要な構成成分であるType IV collagenはすべての腫瘍においてスコア値が高く、有意差を認めなかった。

以上の結果から、海綿状血管腫、静脈性血管腫ともに比較対照群とは異なる血管増殖調節因子、細胞外マトリックスの分布を示していた。そして、その差がこの形態形成に関与していることが示唆された。また、特記すべき点は、これら有意差を示した血管調節関連因子がいずれも間質層にあることである。前述のFolkmanらによる血管成熟の過程はいずれも内皮と周囲の周細胞および平滑筋細胞の関係を中心に示したものであり、間質層に存在する線維芽細胞等の役割については考慮していない。線維芽細胞などは間質層の膠原線維等の産生に関与していることが知られており、当然血管壁の構築にも重要な役割を果たしているものと考えられる。今後、血管新生にはこうした因子の関与も考慮すべきであり、その解明がこれら腫瘍の原因を明らかにするかもしれない。

結 論

1) 海綿状血管腫及び静脈性血管腫の成り立ちには血管増殖及び血管新生調節因子が関わっており、その血管拡張にはTGF- β が重要な役割を担っていると思われる。

2) 静脈性血管腫における平滑筋層の不規則な分布にPDGFの関与が示唆された。

3) 血管新生の過程において、従来検討の少なかった線維芽細胞をはじめとする間質層の細胞の役割も重要である。

謝 辞 稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました獨協医科大学形態病理学教室、正和信英教授、小島勝助教授及び整形外科学教室、早乙女絃一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、ご指導ご助力をいただいた獨協医科大学形態病理学教室の諸兄、獨協医科大学病院病理部のみなさま、整形外科学教室の諸兄、第一形態研究室のみなさま、医用電子工学室の木村一元先生、足利日本赤十字病院病理部清水和彦先生、病理検査室のみなさま他の多大なる協力に感謝いたします。本論文の要旨は第91回日本病理学会総会(2002, 横浜)および第17回日本整形外科学会 基礎学術集会(2002, 青森)

において発表した.

文 献

- 1) Weiss SW, Goldblum JR. : Enzinger and Weiss's soft tissue tumors, 4 th. ed. Mosby, St. Louis, pp. 837 - 890, 2001.
- 2) Kempson RL, Fletcher CDM, Evans HL, et al : Vascular tumors, Tumors of the soft tissue. Atlas of tumor pathology, series Fascicle 30). AFIP, Bethesda M. D., pp. 267 - 307, 2001.
- 3) Folkman J, D'Amore PA. : Blood vessel formation : What is its molecular basis ? Cell **87** : 1153 - 1155, 1996.
- 4) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. : Vascular - specific growth factors and blood vessel formation. Nature, **407** : 242 - 248, 2000.
- 5) Carmeliet P, Jain RK. : Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature, **407** : 249 - 257, 2000.
- 6) Risau W. : Mechanisms of angiogenesis. Nature, **386** : 671 - 674, 1997.
- 7) Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. : Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor reseptor 3 in 185 vascular tumors. Cancer, **86** : 2406 - 2412, 1999.
- 8) Tan ST, Hasan Q, Velickovic M : A novel *in vitro* human model of hemangioma. Modern pathol, **13** : 92 - 99, 2000.
- 9) Jang YC, Arumugam S, Ferguson M, et al : Changes in matrix composition during the growth and regression of human hemangioma. J Surg Res, **80**, 9 - 15, 1998.
- 10) Tan ST, Velickovic M, Ruger BM, et al : Cellular and extracellular markers of hemangioma. Plast Reconstr Surg, **106** : 529 - 538, 2000.
- 11) Jordan DR, Brownstein S, Lee - Wing M, et al. : Pyogenic granuloma following oculoplastic procedures : An imbalance in angiogenesis regulation ? Can J Ophthalmol, **36** : 260 - 268, 2001.
- 12) Requena L, Sanguenza OP. : Cutaneous vascular proliferations. Part II. Hyperplasias and benign neoplasms. J Am Acad Dermatol, **37** : 523 - 549, 1997.
- 13) Suri C, Jones PF, Patan S, et al. : Requisite role of angiopoietin - 1, a ligand for the TIE 2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell, **87** : 1171 - 1180, 1996.
- 14) Takakura N, Huang X - L, Naruse T, et al. : Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. Immunity, **9** : 677 - 686, 1998.
- 15) Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. : Angiopoietin - 2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis, Science, **277** : 55 - 60, 1997.
- 16) Hanahan D. : Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science, **277** : 48 - 50, 1997.
- 17) Darland DC, D'Amore PA. : Blood vessel maturation : vascular development comes of age. J Clin Invest, **103** : 157 - 158, 1999.
- 18) Kojimahara M. : Ultrastructural study of hemangiomas : 4. Cavernous hemangioma of the liver. Acta pathol Jap, **36** : 1477 - 1485, 1986.
- 19) Stefanova P, Badukov P, Dimova P. : Ultrastructural study of hemangiomas in children. Folia Medica, **37** : 61 - 68, 1996.
- 20) Ichikawa MM, Ishida - Yamamoto A, Hashimoto Y, et al. : Venous hemangioma : An immunohistochemistry and ultrastructural study, Acta Derm Venereol, **77** : 382 - 384, 1997.
- 21) Ulbright TM, Santa Cruz DJ : Intravenous pyogenic granuloma. Case report with ultrastructural findings. Cancer, **45** : 1646 - 1652, 1980.
- 22) Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, et al. : Role of PDGF - B and PDGFR - β recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development, **126** : 3047 - 3055, 1999.
- 23) Skalli O, Pelte M - F, Pecllet M - C, et al. : α - smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. J Histochem Cytochem, **37** : 315 - 321, 1989.
- 24) Cotran RS, Kumar V, Collins T. : Robbins pathologic basis of disease, 6th ed. W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 98 - 112, 1999.
- 25) Ignatz RA, Massague J. : Transforming growth factor - β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem, **261** : 4337 - 4345, 1986.
- 26) Amselgruber WM, Schafer M, Sinowatz F. : Angiogenesis in the bovine corpus luteum : An immunocytochemical and ultrastructural study. Anat Histol Embryol, **28** : 157 - 166, 1999.
- 27) Jerdan JA, Michels RG, Glaser BM. : Extracellular matrix of newly forming vessels - An immunohistochemical study. Microvasc Res, **42** : 255 - 265, 1991.

Immunohistochemical Study of Cavernous Hemangioma and Venous Hemangioma in Subcutaneous Tissue and Submucosal Tissue

Hiroshi Tanaka

Department of Orthopedic Surgery, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, 321 - 0293 Japan

Cavernous hemangioma (CH) as well as venous hemangioma (VH) are histologically characterized by remarkably dilated vessels. To clarify the morphogenesis in CH and VH, we performed immunohistochemical study on 17 cases of CH and 14 cases of VH. The results were compared with those also performed of granulation tissue type of hemangioma (GTTH), which is reactive proliferative lesion of the capillaries. The panel of antibodies included a cell cycle associated marker (Ki-67), six angiogenic-factors and receptors (VEGF, PDGF, TGF- β , Ang-1, Ang-2, Tie-2), and three extracellular matrices (type III collagen [Col III], type IV collagen [Col IV] and fibronectin). The number of Ki-67 positive cells was evaluated as Ki-67 labeling index (Ki-67 LI). Evaluation of positive cells of angiogenic-factors and receptors were scored using a four-tiered scale. The intensity of expression of extracellular matrices was also scored according

to four tiered grades. Ki-67 LI in both CH and VH was significantly lower than that in GTTH ($p < 0.05$). Among angiogenic-factors and receptors, the score of TGF- β in CH and VH was significantly lower than that in GTTH ($p < 0.05$). The score of PDGF in CH was significantly higher than that of GTTH. Among extracellular matrices, the score of ColIII and fibronectin in both CH and VH were significantly higher than that of GTTH ($p < 0.05$). The low Ki-67LI in CH and VH indicates that both CH and VH are slow-growing tumors. Moreover, overexpression of TGF- β may play a central role of abnormal dilatation in blood vessels in both CH and VH.

Key Words : cavernous hemangioma, venous hemangioma, extracellular matrix, platelet-derived endothelial growth factor, transforming growth factor beta