

令和元年6月19日現在

機関番号：13701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K10023
研究課題名(和文)リンパ管腫症の発症因子および病態の解明

研究課題名(英文)The study for etiology of lymphangiomatosis

研究代表者
小関 道夫(Michio, Ozeki)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60444303
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管奇形の中に紡錘型細胞を持つ予後不良な新しい疾患がある。これらの疾患は、まだ不明な点が多く、研究が必要である。我々はこれらの疾患患者の病態を解明するため、遺伝学的解析及び、サイトカイン、細胞解析を行った。サイトカインについては、8つのバイオマーカー候補が検出され国際誌に報告した(Pediatric Blood Cancer)。またエクソーム解析を用い、NRAS遺伝子変異を同定した。さらにNRASに着目したcell free DNA解析や、細胞増殖、血管新生の研究も行い、NRAS遺伝子変異が病態に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では希少難治性疾患であるリンパ管腫症の病態解明のため、サイトカイン、および遺伝子解析を行った。こうした研究は過去にほとんど行われておらず、さらに重要な結果が出たため、国際誌に報告した。これらは病態解明から、さらに新たな治療法の開発にも繋がる可能性があり、社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Lymphatic anomalies (LAs), including generalized lymphatic anomaly and kaposiform lymphangiomatosis (KLA), are extremely rare diseases with severe symptoms and poor prognosis. It is described as an aggressive disease of the lymphatic system and has foci of "kaposiform" abnormal spindle lymphatic endothelial cells; however, the pathogenesis of the patients remains unknown. Recently, genetic research has attempted to elucidate the actual conditions and pathogenesis of vascular anomalies. We conducted the mutation analysis and experiment for elucidating the etiology of LAs. We performed multiple cytokine analysis and whole-exome sequencing of DNA samples from biopsy specimen. Our results provide the first evidence that 8 angiogenic factors are associated with KLA pathogenesis and NRAS oncogenic variant was identified in DNA samples from not only an affected lesion but also plasma and pleural effusion.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：血管腫 リンパ管腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

リンパ管腫症とは中枢神経を除く全身の臓器にリンパ管組織が増殖する希少性難治性疾患である。病因、病態は不明で、診断、治療法も確立されていない難病である。胸部に浸潤し、凝固異常をきたすと致死性であるが、既存の治療は治癒率が低く、また副作用や合併症も多い。しかし、疾患の原因や発症要因に関しては、全く解明されておらず、本疾患の基礎研究を進める必要がある。リンパ管腫症は全身のリンパ管内皮細胞が「複雑に拡張、増殖する」疾患であるが、病理学的には病変部位の細胞は正常リンパ管との差が明らかでないことと、培養やリンパ管腫症細胞のみを分離することが困難であることが、研究が進まないこと一因となっている。2014年、病変部位の病理組織の一部に「異常な紡錘型細胞」が存在することが確認され“Kaposiform Lymphangiomatosis(KLA)”という新しい概念が提唱された。我々はこの「異常な紡錘型細胞」が、正常分布しているリンパ管内皮細胞に対してサイトカインなどの何らかの影響を与えることによって、リンパ管腫症を発症するという“仮説”を立てた。

2. 研究の目的

「リンパ管腫症の発症因子および病態の解明」のため、リンパ管腫症が「異常な紡錘型細胞」を介し、正常リンパ管内皮細胞を拡張、増殖させるという“発症仮説”を立て、1)リンパ管腫症検体から「リンパ管腫症細胞」と「異常な紡錘型細胞」を分離培養し、2)「異常な紡錘型細胞」によって正常リンパ管内皮細胞からリンパ管腫症を発症するかどうかを検証することで、本疾患の発症に関わる因子を解明することを目的とする。さらに、サイトカイン、遺伝学的解析も行うことで、病態のマーカーなどを検出する。

3. 研究の方法

リンパ管腫症細胞株樹立と「リンパ管腫症細胞、異常な紡錘型細胞」の分離のため、同意の得られた患者で、腫瘍摘出術または腫瘍生検の際に、採取された腫瘍検体を用い、培養を行った。リンパ管内皮細胞特異的な抗原によって「リンパ管腫症細胞と異常な紡錘型細胞」をソーティングし、分離した。また正常リンパ管内皮細胞と異常な紡錘型細胞の共培養を行った。リンパ管腫症の病態や発症機序には、“リンパ管形成”および“リンパ管増殖”に関連する経路、レセプターが関与していると考えられており、患者血漿中のサイトカインの測定(VEGF-A、C、D、PDGF、IL-1、IL-6、IL-8、Pleiotrophin、IGF-1、Endothelin-1、Thrombospondin、Angiopoietin-1/2、sIL2Ra、TNF- α 、MCP-1など)を行った。また病変部位の組織よりエクソソーム解析を行い、遺伝子変異を検出した。

4. 研究成果

予定通り、異常なリンパ管内皮細胞を培養分離した。チューブフォーメーションを行うと、やはり脈管構造に異常が生じていた。またこれらと正常リンパ管内皮細胞を共培養したところ、いびつな構造の脈管が出現した。またサイトカイン分析では Soluble VEGFR3、angiopoietin 2、HGF、soluble HER2、tenascin C、soluble HGFR、soluble VEGFR1、soluble TIE2 は有意なマーカーとなった。また病変部位から NRAS c. 182A>G missense variant (p. Q61R) を認め、cell free DNA からも同様の遺伝子変異を検出した。こうした研究は過去にほとんど行われておらず、さらに重要な結果が出たため、国際誌に報告した。これらは病態解明から、さらに新たな治療法の開発にも繋がる可能性があり、社会的意義は高い。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 32 件)

1. [Ozeki M](#), Nozawa A, Yasue S, Endo S, Asada R, Hashimoto H, Fukao T. The impact of sirolimus therapy on lesion size, clinical symptoms, and quality of life of patients with lymphatic anomalies. *Orphanet J Rare Dis*, in press. (査読有)
2. [Ozeki M](#), Nozawa A, Kawamoto N, Fujino A, Hirakawa S, Fukao T. Potential biomarkers of kaposiform lymphangiomatosis. *Pediatr Blood Cancer*, in press. (査読有)
3. [Ozeki M](#), Fukao T: Generalized lymphatic anomaly and Gorham-Stout disease: overview and recent insights. *Advance Wound Care*. 7 Jan 2019. (査読有)
4. Nozawa A, [Ozeki M](#), Hori T, Kato H, Ohe N, Fukao T: Fatal progression of Gorham-Stout disease with skull base osteomyelitis and lateral medullary syndrome. *Internal Med*. 2019 Feb 25. (査読有)
5. Ueno S, Fujino A, Morikawa Y, Iwanaka T, Kinoshita Y, [Ozeki M](#), Nosaka S, Matsuoka K, Usui N.: Indication of tracheostomy for head and neck lymphatic malformation in children -analysis of nationwide survey in Japan. *Surg Today*. 2019 Feb 18. (査読有)
6. [Ozeki M](#), Hashimoto H, Asada R, Saito A, Fujimura T, Kuroda T, Ueno S, Watanabe S, Nosaka S, Miyasaka M, Umezawa A, Matsuoka K, Maekawa T, Yamada Y, Fujino A, Hirakawa S, Furukawa T, Tajiri T, Kinoshita Y, Souzaki R, Fukao T. Efficacy and safety of sirolimus treatment for intractable lymphatic anomalies: a study protocol for an

- open-label, single-arm, multicenter, prospective study (SILA). *Regen Ther.* 2019, 10; 84-91 (査読有)
7. Inoue T, Shitara S, Ozeki M, Nozawa A, Fukao T, Fukushima T. Hereditary clear cell meningiomas in a single family: three-cases report. *Acta Neurochir (Wien)*. 2018 Nov 13. (査読有)
 8. Kumagai C, Ozeki M, Nozawa, Kakuda H, Fukao T. Efficacy of sirolimus in an infant with Kasabach-Merritt phenomenon. *Pediatr Int.* 2018; 60(9), 887-889. (査読有)
 9. Funato M, Ozeki M, Suzuki A, Ishihara M, Kobayashi R, Nozawa A, Yasue S, Endo-Ohnishi S, Fukao T, Itoh Y. Prophylactic Effect of Polaprezinc, a Zinc-L-carnosine, Against Chemotherapy-induced Oral Mucositis in Pediatric Patients Undergoing Autologous Stem Cell Transplantation. *Anticancer Res.* 2018; 38(8), 4691-4697. (査読有)
 10. Ueno S, Fujino A, Morikawa Y, Iwanaka T, Kinoshita Y, Ozeki M, Nosaka S, Matsuoka K, Usui N. Treatment of mediastinal lymphatic malformation in children: an analysis of a nationwide survey in Japan. *Surg Today.* 2018; Feb 26. (査読有)
 11. Kato H, Ozeki M, Fukao T, Matsuo M. Chest imaging in generalized lymphatic anomaly and kaposiform lymphangiomatosis. *Pediatr Int.* 2018; Jun 20. (査読有)
 12. Nozawa A, Ozeki M, Hori T, Kawamoto N, Hirayama M, Azuma E, Fukao T. A Heterozygous CFHR3-CFHR1 Gene Deletion in a Pediatric Patient With Transplant-associated Thrombotic Microangiopathy Who was Treated With Eculizumab. *J Pediatr Hematol Oncol* (2018) 40(8): e544-e546 (査読有)
 13. Kadowaki S, Hori T, Matsumoto H, Kanda K, Ozeki M, Shirakami Y, Kawamoto N, Ohnishi H, Fukao T. Prepubertal onset of slipped capital femoral epiphysis associated with hypothyroidism: a case report and literature review. *BMC Endocr Disord* (2017) 18;17(1): 59 (査読有)
 14. Kato H, Ozeki M, Fukao T, Matsuo M. MR imaging findings of vertebral involvement in Gorham-Stout disease, generalized lymphatic anomaly, and kaposiform lymphangiomatosis. *Jpn J Radiol* (2017) 35(10): 606-612 (査読有)
 15. Matsuzawa-Kinomura Y, Ozeki M, Otsuka H, Orii K, Fukao T. Neonatal dysphonia caused by subglottic infantile hemangioma. *Pediatr Int* (2017) 59(8): 935-936. (査読有)
 16. Ozeki M, Nozawa A, Kanda K, Hori T, Nagano A, Shimada A, Miyazaki T, Fukao T. Everolimus for Treatment of Pseudomyogenic Hemangioendothelioma. *J Pediatr Hematol Oncol* (2017) 39(6): e328-e331 (査読有)
 17. Yoshida N, Sakaguchi H, Muramatsu H, Okuno Y, Song C, Dovat S, Shimada A, Ozeki M, Ohnishi H, Teramoto T, Fukao T, Kondo N, Takahashi Y, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Germline IKAROS mutation associated with primary immunodeficiency that progressed to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2017) 31(5): 1221-1223 (査読有)
 18. Ozeki M, Hori T, Kanda K, Kawamoto N, Ibuka T, Miyazaki T, Fukao T. Everolimus for primary intestinal lymphangiectasia with protein-losing enteropathy. *Pediatrics* (2016) 137(3): e20152562 (査読有)
 19. Ozeki M, Nozawa A, Hori T, Kanda K, Kimura T, Kawamoto N, Fukao T. Propranolol for infantile hemangioma: Effect on plasma vascular endothelial growth factor. *Pediatr Int* (2016) 58(11): 1130-1135 (査読有)
 20. Ozeki M, Fujino A, Matsuoka K, Nosaka S, Kuroda T, Fukao T. Clinical Features and Prognosis of Generalized Lymphatic Anomaly, Kaposiform Lymphangiomatosis and Gorham-Stout Disease. *Pediatric Blood Cancer* (2016) 63(5): 832-838 (査読有)
 21. Matsumoto H, Ozeki M, Hori T, Kanda K, Kawamoto N, Nagano A, Azuma E, Miyazaki T, Fukao T. Successful Everolimus Treatment of Kaposiform Hemangioendothelioma with Kasabach-Merritt Phenomenon: Clinical Efficacy and Adverse Effects of mTOR Inhibitor Therapy. *J Pediatr Hemato Oncol* (2016) 38(8): e322-e325 (査読有)
 22. Nozawa A, Ozeki M, Kuze B, Asano T, Matsuoka K, Fukao T. Gorham-Stout Disease of the Skull Base with Hearing Loss: Dramatic Recovery and Anti-Angiogenic Therapy. *Pediatr Blood Cancer* (2016) 63(5): 931-934 (査読有)
 23. Kato H, Matsuo M, Ozeki M, Fukao T. Rebound adenoid hyperplasia after chemotherapy in pediatric patients with head and neck lymphoma: MR imaging findings. *Jpn J Radiol* (2016) 34(9): 633-639 (査読有)
 24. Kato H, Ozeki M, Fukao T, Matsuo M. Craniofacial CT findings of Gorham-Stout disease and generalized lymphatic anomaly. *Neuroradiology* (2016) 58(8): 801-806 (査読有)
 25. Otsuka H, Ozeki M, Kanda K, Hori T, Kawamoto N, Saigo C, Kato H, Makita H, Shibata T, Fukao T. Complete bone regeneration in hemophilic pseudotumor of the mandible. *Pediatr Int* (2016) 58(5): 406-408 (査読有)
 26. Kubota K, Kinomura Y, Yamamoto T, Ozeki M, Kawamoto M, Kawamoto N, Fukao T. ACTH therapy for West syndrome with severe hemophilia A. *Epilepsy Behav Case Rep* (2016)

- 10;6: 1-2 (査読有)
27. 小関道夫. Generalized lymphatic anomaly, LM in Gorham-Stout disease (リンパ管腫症, ゴーハム病) 血管腫・血管奇形臨床アトラス 2018: 134-138. (査読無)
 28. 小関道夫, 深尾 敏幸. 【頸部腫瘍の診かた】先天性形成異常 血管性病変. 小児内科. 2018; 50(2), 226-230. (査読無)
 29. 小関道夫. 乳児血管腫 (プロプラノロール)、リンパ管奇形 (シロリムス) 知っておくべき治療可能な胎児・新生児希少疾患 周産期医学, 2018; 48;10 (査読無)
 30. 小関道夫, 藤野明浩, 深尾敏幸. リンパ管腫症・ゴーハム病について. 小児外科 (2016) 48(12): 1320-1324 (査読無)
 31. 高橋正貴, 藤野明浩, 小関道夫, 渡邊稔彦, 前川貴伸, 松岡健太郎, 野坂俊介, 黒田達夫, 瀧本康史, 金森 豊. 難治性胸水の外科治療 小児外科 (2016) 48(9): 933-937 (査読無)
 32. 小関道夫, 深尾敏幸. リンパ管腫症/ゴーハム病の診断と治療 指定難病最前線 新薬と臨牀 (2016) 65(6): 857-862 (査読無)

[学会発表] (計 34 件)

1. 小関道夫, 野澤明史, 安江志保, 堀友博, 浅田隆太, 橋本大哉, 藤野明浩, 深尾敏幸: 難治性リンパ管疾患に対するシロリムス療法の有用性. 日本小児科学会学術集会(第 121 回) (2018 年 4 月 20-22 日 福岡市)
2. Ozeki M, Nozawa A, Yasue S, Endo S, Asada H, Hashimoto H, Fukao T. Sirolimus treatment improves the clinical symptoms and quality of life of the patients with intractable lymphatic malformations. The 22nd International Workshop of the International Society for the Study of Vascular Anomalies. (2018 年 5 月 28 日-6 月 1 日 アムステルダム)
3. Ozeki M, Nozawa A, Kawamoto N, Fujino A, Hirakawa S, Fukao T. Differences in clinical findings and plasma cytokine profiles between generalized lymphatic anomaly and kaposiform lymphangiomatosis. The 22nd International Workshop of the International Society for the Study of Vascular Anomalies. (2018 年 5 月 28 日-6 月 1 日 アムステルダム)
4. 小関道夫. 難治性リンパ管疾患に対するシロリムス療法の医師主導治験を通じて. 日本血管腫血管奇形学会 (第 15 回) (2018 年 7 月 20-21 日 大阪)
5. 横山真以, 後藤滉平, 野澤明史, 安江志保, 遠渡沙緒理, 小関道夫, 深尾敏幸. シロリムス療法後に貧血の改善がみられた青色ゴムまり様母斑症候群の一例. 日本血管腫血管奇形学会 (第 15 回) (2018 年 7 月 20-21 日 大阪)
6. 小関道夫, 横山真以, 後藤滉平, 野澤明史, 安江志保, 遠渡沙緒理, 深尾敏幸. 乳児血管腫患者家族の QOL 調査の妥当性検討および前方視的解析. 日本血管腫血管奇形学会 (第 15 回) (2018 年 7 月 20-21 日 大阪)
7. 遠渡沙緒理, 野澤明史, 安江志保, 木村豪, 小関道夫, 深尾敏幸. Kasabach-Merritt phenomenon に対する mTOR 阻害剤の有効性と安全性について. 日本血管腫血管奇形学会 (第 15 回) (2018 年 7 月 20-21 日 大阪)
8. 小関道夫, 野澤 明史, 安江志保, 遠渡沙緒理, 川本典生, 藤野明浩, 平川聡史, 深尾敏幸. Generalized lymphatic anomaly と Kaposiform lymphangiomatosis の鑑別法の開発. 日本血管腫血管奇形学会 (第 15 回) (2018 年 7 月 20-21 日 大阪)
9. 後藤滉平, 横山真以, 野澤明史, 安江志保, 遠渡沙緒理, 小関道夫, 深尾敏幸. 乳児血管腫に対するプロプラノロール療法 ~2mg/kg と 3mg/kg に違いがあるか~. 日本血管腫血管奇形学会 (第 15 回) (2018 年 7 月 20-21 日 大阪)
10. 小関道夫, リンパ管腫症の診断と治療 血管腫血管奇形講習会(第 10 回) (2018 年 7 月 20-21 日 大阪)
11. 小関道夫. 難治性リンパ管疾患に対するシロリムス療法の医師主導治験を通じて. 日本小児臨床薬理学会(第 45 回) (2018 年 10 月 7 日)
12. 小関道夫, 難治性血管腫・血管奇形 ~ 小児科医としての関わり方を通じて ~ 血管腫・血管奇形の患者会 医療講演会 2018(2018 年 10 月 8 日 東京都)
13. 小関道夫, 小児がん、小児脳腫瘍の克服に向けた取り組み 岐阜脳腫瘍研究会(第 13 回) (2018 年 11 月 10 日 岐阜市)
14. Ozeki M, Nozawa A, Yasue S, Endo S, Aoki Y, Fukao T. Kaposiform Lymphangiomatosis Caused by a Somatic Mutation in the Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog Gene (NRAS) 日本小児血液がん学会学術集会(第 60 回) (2018 年 11 月 14-16 日 京都市)
15. 小関道夫, 専門医に知って頂きたい乳児血管腫とその関連疾患. 日本小児血液がん学会学術集会(第 60 回) (2018 年 11 月 14-16 日 京都市)
16. 熊谷千紗, 小関道夫, 野澤明史, 堀友博, 神田香織, 角田治美, 深尾 敏幸, Kasabach-Merritt 現象を伴った血管性腫瘍の乳児例, Haemophilia seminar (2017 年 4 月 7 日, 岐阜市)
17. 小関道夫, 野澤明史, 堀友博, 神田香織, 川本典生, 深尾敏幸: 乳児血管腫患者家族の

- プロプラノロール療法前後の QOL 調査 日本小児科学会学術集会(第 120 回)(2017 年 4 月 14 日-16 日, 東京)
18. 野澤明史, 小関道夫, 堀友博, 神田香織, 深尾敏幸, 加藤博基, 宮崎龍彦, 当院におけるリンパ管腫症・ゴーハム病の頭蓋骨病変の比較検討, 日本小児科学会学術集会(第 120 回)(2017 年 4 月 14 日-16 日, 東京)
 19. 小関道夫, 乳児血管腫の病態と治療, 桑名木曜サロン(第 348 回) (2017 年 5 月 11 日, 桑名市)
 20. 安江志保, 小関道夫, 松澤依子, 野澤明史, 堀友博, 棚橋裕吉, 川田紘資, 木村豪, 深尾敏幸 急性腭炎と大量胸水を認めたリンパ管腫症について, 岐阜小児血液免疫アレルギー難治疾患研究会(第 14 回)(2017 年 6 月 27 日 岐阜市)
 21. 安江志保, 小関道夫, 松澤依子, 野澤明史, 堀友博, 棚橋裕吉, 川田紘資, 深尾敏幸, 発症時に急性腭炎を認めたリンパ管腫症の 1 例, 日本血管腫血管奇形学会学術集会(第 14 回)(2017 年 7 月 15 日 郡山市)
 22. 野澤明史, 小関道夫, 堀友博, 神田香織, 深尾敏幸, 加藤博基, 宮崎龍彦, 当院におけるリンパ管腫症・ゴーハム病の頭蓋骨病変の比較検討, 日本血管腫血管奇形学会学術集会(第 14 回)(2017 年 7 月 15 日 郡山市)
 23. 小関道夫, 野澤明史, 堀友博, 神田香織, 川本典生, 深尾敏幸, Kasabach-Merritt phenomenon を伴ったカポジ型血管内皮腫に対する mTOR 阻害剤の有効性, 日本臨床腫瘍学会(第 15 回)(2017 年 7 月 27 日 神戸市)
 24. 安江志保, 小関道夫, 松澤依子, 野澤明史, 友博, 棚橋裕吉, 川田紘資, 深尾敏幸, 急性腭炎と大量胸水で発症し、シロリムスが有効であったリンパ管腫症の 1 例, 日本小児血液・がん学会(第 59 回)(2017 年 11 月 9-11 日 松山市)
 25. 小関道夫, 小児科医が知っておきたい乳児血管腫の診断と治療 ～プロプラノロール療法の押さえておくべきポイント～ 日本小児科学会学術集会(第 120 回)(2017 年 4 月 14 日-16 日 東京)
 26. 小関道夫, 難治性血管腫・リンパ管疾患に対するシロリムス療法について, 日本 IVR 学会(第 15 回)(2017 年 5 月 19 日 岡山)
 27. 小関道夫, 血管腫・血管奇形の薬物療法, 日本血管腫血管奇形学会学術集会(第 14 回)(2017 年 7 月 15 日 郡山市)
 28. 小関道夫, 脈管異常に合併する凝固異常について, 東海小児血液懇話会(第 74 回)(2017 年 9 月 19 日 名古屋市)
 29. 小関道夫, 乳児血管腫の病態と治療, 北勢地区小児臨床懇話会(第 406 回)(2017 年 9 月 13 日 四日市市)
 30. 小関道夫, 乳児血管腫の病態と治療, 伊勢地区小児科医会(第 233 回)(2017 年 9 月 20 日 伊勢市)
 31. 小関道夫, 難治性脈管異常に対する薬物療法, 東京小児がんグループ (TCCSG) セミナー(2017 年 10 月 29 日 東京)
 32. 小関道夫, 乳児血管腫の病態と治療, 西濃小児科医会学術講演会(第 46 回)(2017 年 11 月 11 日 大垣市)
 33. 小関道夫, 小児難治性脈管異常の診断と薬物療法, 九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス(2017 年 12 月 4 日 福岡市 演者)
 34. 小関道夫, リンパ管腫・リンパ管腫症の管理と治療, 「難治性血管腫・血管奇形・リンパ管奇形・リンパ管腫症および関連疾患についての調査研究班」市民公開講座(2017 年 3 月 3 日 福岡市 演者)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：青木 洋子

ローマ字氏名：AOKI YOKO

所属研究機関名：東北大学

部局名：遺伝病学

職名：教授

研究者番号（8桁）：80332500

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。