

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11507

研究課題名(和文)リンパ管奇形に対する漢方薬による制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the regulatory mechanism of lymphatic malformations by Kampo medicine

研究代表者

小川 恵子 (Ogawa, Keiko)

金沢大学・附属病院・特任准教授

研究者番号：30514575

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)：越婢加朮湯の抗炎症作用や細胞増殖抑制作用を明らかにするために、既に実験細胞として確立している成人の頭頸部がん細胞でのmTOR、Akt、ERKなどのリン酸化と発現/分布の解析と、越婢加朮湯投与による細胞増殖阻害、アポトーシスの促進について明らかにした。また、内視鏡下に取得したリンパ管奇形のリンパ管上皮細胞に計画を修正した。しかし、COVID-19パンデミックのため、内視鏡件数が減少したため、期間内にLECs取得ができなかったため、正常リンパ管上皮細胞を購入し、培養して増殖させ、培養による形態の観察を行った。さらに、越婢加朮湯投与によるMTTアッセイを行い、増殖が抑制されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

越婢加朮湯が腫瘍細胞の増殖を抑制し、それがmTOR阻害効果によるものであることが初めて示唆され、論文にて発表した。近年LMに対するmTOR阻害剤の効果が報告されており、本研究の成果は、LMに対する漢方薬による制御メカニズムを解明する一助となったと考えられる。また、リLM症例からのリンパ管内皮細胞取得が困難であり、さらに細胞培養も腫瘍細胞ラインに比べて困難であったことから、他の細胞ラインや動物モデルを検討する必要があることも分かった。この知見をもとに研究を継続することによって、漢方薬のLMに対する効果の機序とmTOR阻害剤との機序の相違を明らかにし、より安全に漢方薬を使用できると予測される。

研究成果の概要(英文)：Since it was difficult to obtain lymphatic malformation-derived tissues and lymphatic endothelial cells (LECs), we first analyzed the phosphorylation and expression/distribution of mTOR, Akt, ERK, etc. in adult head and neck cancer cells. We clarified the inhibition of cell proliferation and the promotion of apoptosis by the administration of eppikajyutsuto to clarify the anti-inflammatory and cell proliferation inhibitory effects of eppikajyutsuto (Makita H, 2020).

As surgical resection of lymphatic malformations is infrequent and specimens cannot be easily obtained, we plan to obtain LECs from endoscopically acquired lymphatic malformations. However, due to the COVID-19 pandemic, the number of endoscopies decreased and we were not able to travel to obtain specimens, we could not obtain LECs within the time frame. Therefore, we used normal LECs for MTT assay, suggesting that proliferation was inhibited by eppikajyutsuto.

研究分野：小児外科学

キーワード：リンパ管奇形 漢方薬 リンパ管内皮細胞 越婢加朮湯 細胞増殖抑制 外科 小児腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

リンパ管奇形 (LM:Lymphatic Malformation) はリンパ管の先天異常である。周辺臓器に境界不明瞭に浸潤・発育し、周辺臓器を圧排、自然退縮は稀である。境界が不明瞭である脈管系組織であることから、根治的手術は難しく、本邦では OK-432 注入による硬化療法が治療の中心となっている。しかし、小児リンパ管奇形は頸部に発生することが多く、気管や重要な脈管組織と隣接しているため、硬化療法による病変部の一時的な腫脹により気道閉塞や循環不全を来す可能性があり、治療が困難な症例も多い。

申請者は小児外科医として LM の治療に取り組んできたが、硬化療法や切除術が非常に困難な縦隔 LM に対し、漢方医学的診断から越婢加朮湯を投与し、著明な縮小を得た症例を経験し、2011 年に報告した (図 1)。この症例では、越婢加朮湯投与に追加して黄耆建中湯を処方したところ、さらなる改善が認められた。以来、多施設で LM に対し越婢加朮湯が投与されるようになり、橋詰らが 3 か月～4 歳の頭頸部・胸部の LM に対し越婢加朮湯を使用し、8 例中 6 例で有効であったと報告している。さらに、2016 年 8 月現在までに、小児外科関連の学会にて 18 例の有効症例が報告されている。しかし、リンパ管奇形になぜ有効なのか、その機序は明らかになっていない。

また、申請者は新生児頸部リンパ管奇形の症例において、慎重な経過観察による越婢加朮湯・黄耆建中湯増量により病変の著明な縮小が得られたことを報告 (血管腫血管奇形学会、2015) している。越婢加朮湯は、他の疾患に対しても経験的に炎症や症状が強い場合には適宜増量して投与されている。越婢加朮湯には麻黄が含まれており、循環器系への影響が懸念されるものの、現在までに副作用の報告はないが、安全性の確認も必要と考えられる。

2. 研究の目的

目的：リンパ管奇形に対する漢方薬による制御メカニズムを解明する

申請者は、リンパ管奇形 (LM:Lymphatic Malformation) に対して越婢加朮湯・黄耆建中湯を投与し、病変が著明に縮小する症例を多く経験しているが、その機序は不明である。近年、リンパ管奇形に対する mTOR 阻害剤の効果が報告されている。また、越婢加朮湯と同じ利水剤である五苓散の利水作用には細胞膜を介した水輸送を担うチャンネル分子であるアクアポリン aquaporin (AQP) の関与が報告されている。申請者は、「越婢加朮湯・黄耆建中湯は、リンパ管奇形病変において、mTOR シグナルネットワークを介してリンパ管増殖抑制効果を、AQP を介してリンパ液貯留抑制効果を示し、病変を縮小させる」という仮説の立証をおこなう目的で、本研究を計画した。

3. 研究の方法

リンパ管内皮細胞に対する越婢加朮湯・黄耆建中湯の増殖抑制効果の検証

LM 症例と、頭頸部手術症例のリンパ管組織から、リンパ管内皮細胞 (LECs) を採取し、その培養細胞を用いて、in vitro および in vivo における越婢加朮湯・黄耆建中湯の LECs への影響を解析することを目的として実験を行った。

(1) 培養細胞が LECs であることの確認

免疫組織化学による、LYVE-1、VEGFR-3 などの発現を確認した。

(2) リンパ管内皮細胞に越婢加朮湯を投与したことによる mTOR シグナルネットワークへの影響の解析

mTOR、Akt、ERK などのリン酸化と発現/分布の解析をウェスタンブロット法および PCR 法で行う。

(3) 増殖抑制効果の検討

MTT アッセイによる、細胞生存率や活動率の測定

FACS によるアポトーシス細胞の割合の測定

4. 研究成果

リンパ管奇形由来の組織とリンパ管内皮細胞が入手困難であったため、まずは越婢加朮湯の抗炎症作用や細胞増殖抑制作用を明らかにするために、既に実験細胞として確立している成人の

頭頸部がん細胞でのmTOR、Akt、ERK などのリン酸化と発現/分布の解析と、越婢加朮湯投与による細胞増殖阻害と、アポトーシスの促進について明らかにし、国際学会で発表した。この結果は、論文として採択された (Haruna Makita, Kazuhira Endo, Akiko Shirai, Kanji Kawasaki, Rei Mishima, Yoshiya Kasahara, Kazuya Ishikawa, Takayoshi Ueno, Yosuke Nakanishi, Satoru Kondo, Naohiro Wakisaka, Tomokazu Yoshizaki, Keiko Ogawa Ochiai, Eppikajutsuto (a Japanese herbal medicine) regulates mTOR and induces apoptosis in oral cancer cells. *Traditional & Kampo Medicine*, 7(2):72-77(2020.8))。

また、手術によるリンパ管奇形の切除は頻度が少なく、検体が得られないため、内視鏡下に取得したリンパ管奇形のリンパ管上皮細胞を取得することに計画を修正し、金沢大学医学部倫理委員会での承認を得た。しかし、COVID-19 パンデミックのため、内視鏡件数が減少し、検体を取得するために移動することができなかったため、期間内に LEC s 取得ができなかった。このため、正常リンパ管上皮細胞を購入し、培養して増殖させ、培養による形態の観察を行った。さらに、越婢加朮湯投与による MTT アッセイを行い、増殖が抑制されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Makita Haruna, Endo Kazuhira, Shirai Akiko, Kawasaki Kanji, Mishima Rei, Kasahara Yoshiya, Ishikawa Kazuya, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu, Ogawa Ochiai Keiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Eppikajutsuto (a Japanese herbal medicine) regulates mTOR and induces apoptosis in oral cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 72～77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tkm2.1244	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiko Ogawa
2. 発表標題 A Neonatal huge Cervical Lymphatic Malformation Successfully Treated with eppikajutsuto and ogikenchuto: A Case Report
3. 学会等名 5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR JAPANESE KAMPO MEDICINE (ISJKM) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上原 秀一郎 (Uehara Shuichiro) (00448060)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	酒井 清祥 (Sakai Seisho) (20735112)	金沢大学・附属病院・特任助教 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大須賀 慶悟 (Osuga Keigo) (90332741)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	
研究分担者	池原 久朝 (Ikehara Hisatomo) (10589815)	日本大学・医学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関