

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15704

研究課題名(和文) 脈管異常に合併する凝固異常の病態解明と治療薬開発

研究課題名(英文) Development of coagulopathy with vascular anomalies

研究代表者

遠渡 沙緒理 (Endo, Saori)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90816117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脈管異常は先天性の脈管異常疾患で、血管腫内で異常な血液凝固が起こり、血小板減少や血栓を形成するが、そのメカニズムは未だ不明である。特に小児血管性腫瘍に合併するカサバツハメリット現象(Kasabach-Merritt Phenomenon: KMP)は重篤な凝固異常を呈し、致死率も高いが、対症療法のみとなっている。我々は他の脈管異常に合併する凝固異常とKMPとの違いに着目し、凝固異常に伴うサイトカイン分析および、新規治療薬投与後の凝固異常について解析した。その結果を論文で公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、これらの疾患は病理学や遺伝生物学的な研究の発展に伴い、原因や病態が徐々に解明されてきている。我々は小児科の中でも血液腫瘍学を専門としているため、脈管異常に起こっている凝固異常を、本体から理解し研究をすることが可能である。国内外においても、この点に注目して研究を行っている施設はほとんどなかった。一方で、mTOR阻害剤であるシロリムスの難治性脈管異常に対する有効性は極めて高く、ブレイクスルーになると期待されている。その有効性を検証するための臨床試験は海外で行われてきつつあり、今後さらに注目されるだろう。また本薬の薬理作用に関する研究報告はほとんどないため、本研究は非常に意義深かったと考える。

研究成果の概要(英文)：Vascular anomalies are very rare diseases, which cause severe coagulopathy, thrombocytopenia and blood clot in vein. Kasabach-Merritt Phenomenon is caused by vascular tumors and have poor prognosis. Pathogenesis of these conditions are not known. Considering the difference between vascular tumors and vascular anomalies, we examined the cytokine analysis to identify the pathogenesis of it. It is considered that the difference of origin lesion could cause some type of coagulopathy in these diseases. We reported these results on the papers.

研究分野：血液

キーワード：血管腫 カサバツハメリット現象

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脈管異常とは、全身の臓器に血管やリンパ管といった脈管が主に先天的に異常な構造や腫瘍化した腫瘍が起こる疾患である。いわゆる“血管腫”や“リンパ管腫”と呼ばれ、小児期に発生しやすいが、腫瘍によって整容面だけでなく、機能障害や疼痛、出血などをきたし、難治例は一生苦しむ。さらに、腫瘍内で血液が異常な凝固を起こし、血小板減少や血栓などを起こすため、重篤な出血症状や深部静脈血栓症を来し、致死性である。最も知られているものは、カサバハメリット現象(Kasabach-Merritt Phenomenon: KMP)といい、四肢や後腹膜などに乳幼児期に発生するカポジ肉腫様血管内皮腫(Kaposiform hemangioendothelioma: KHE)に合併する重篤な凝固異常で、致死率は約 30%に達するとされる。また静脈奇形(venous malformation, VM)に合併するとされている Localized intravascular coagulopathy (LIC)は病変内で異常な凝固反応が起こる。さらにリンパ管腫症の中でも、中等度の出血症状や血小板減少、D-dimer 上昇を示すカポジ型リンパ管腫症(Kaposiform lymphangiomatosis, KLA)はその中間的な重症度である。これらは臨床的には似ているが、それぞれ原因と治療法も異なるため、正確な病態の理解とともに、治療法の研究が急務である。申請者は、これらの病態の謎を解く“鍵”を基に、病態を解明する研究を計画した。

2. 研究の目的

悪性腫瘍に合併する凝固異常である播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation, DIC) は研究対象とされることがあるが、脈管異常に合併する凝固異常は最も有名な KMP ですら研究報告はほとんどない。そもそも原疾患となる脈管異常は、“血管腫”と称され、大きな括りの中で正確な病態理解がなされずにいた。KHE だけでなく、カポジ型リンパ管腫症(Kaposiform lymphangiomatosis, KLA)などの疾患が正確に分類されたのも、2014年に脈管異常の国際学会である The International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA)分類が初である。したがって、新たな疾患分類を基に、凝固異常を病態から理解し、整理することは世界的にも非常に重要、かつ意義の深いことである。KMP with KHE と KLA の臨床学的特徴は異なるが、病理像の違いに注目したところ、双方とも D2-40 陽性の紡錘型細胞を持っていた (表 1)。さらに、重篤な凝固障害である KMP は腫瘍内に紡錘型細胞が密に存在するのに対して、中等度の凝固障害を示す KLA は一部に集簇しているのみである。そのため、この紡錘型細胞が異なる重症度の凝固障害の“鍵”であると考えた。

紡錘型細胞は D2-40 (ポドプラニン) 陽性であるが、ポドプラニンとはリンパ管内皮細胞に特異的に発現している膜蛋白で、血小板に発現している C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) と結合し、血小板の凝集に関わるとされている。したがって紡錘型細胞を多数持つ KHE は KMP を起こし、KHE より少ない KLA は中等度の凝固障害、また静脈奇形 (VM) はこうした異常細胞がなく、構造異常で血栓を形成するのみで軽症の凝固障害である LIC となるという仮説を立てた。我々の仮説を証明することによって、こうした凝固異常の病態解明に繋がるとともに、新規治療薬の開発にも貢献できると考えられる。

さらに、当教室では現在、mTOR 阻害剤であるシロリムスが KMP や KLA、VM などの難治性脈管異常に有効であることに注目し、平成 28 年より医師主導治験を開始した。自験例の KMP に対しては、翌日から凝固異常が改善し、著効であった。海外でも高い有効性が期待され、臨床試験が行われているが、シロリムスの薬理作用は解明されていない。シロリムスは腫瘍増殖抑制に関わると考えられているが、翌日から凝固異常が改善するということは説明できないだろう。申請者は、凝固異常に直接的に作用するメカニズムがあると考えている。本研究で“病態解明”および“凝固異常に対する mTOR 阻害剤の Proof of concept”を示す。

3. 研究の方法

1、凝固異常のメカニズムの証明

A 凝固異常症例からの血液検体を用いた解析(血小板凝集能試験、サイトカインプロファイル)
凝固異常のある脈管異常症例の血液を用いて、血小板凝集能試験を行う。また CLEC-2、血管・リンパ管新生に関わるマーカー (VEGF-A、C、D、MMP2、9、Angiopoietin1、2、BMP-9、EGF、Endoglin、Endothelin-1、FGF-1、FGF-2、Folistatin、HB-EGF、PLGF など)などを ELISA 測定キット (R&D など) およびマルチプレックスアッセイシステムを用いた解析パネル (MILLIPLEX) によって解析する。

B KHE、KLA、VM の病変部位のサンプルおよび細胞株を用いた解析、血小板凝集の証明

それぞれの病変部位から採取したサンプルより、紡錘型細胞および免疫組織染色でポドプラニン陽性細胞を証明する。またポドプラニン陽性細胞をセルソーターで抽出し、疾患特異的な細胞株を初代培養する。継代した細胞を用いて、ヒト正常血小板が細胞量依存性に血小板凝集を起こすかどうかを FCM および VerifyNow によって証明する。

C ポドプラニン発現細胞を用いた結合解析、血小板凝集の証明

H31 年度にポドプラニン遺伝子をクローニングし、GFP 遺伝子と融合させ、ベクターに組み込む。Hela 細胞にトランスフェクトし、蛍光蛋白陽性細胞をセルソーターで分取する。またヒト正常血小板が細胞量依存性に血小板凝集を起こすかどうかを FCM および VerifyNow によって証明する。

D KMP、KLA、LIC モデル動物の作成

上記で作成した細胞株を移植したマウスを用い、H31年度に病変部位で過剰な血小板凝固反応が起こっていることを証明する。ポドプラニン陽性細胞の量と血小板凝集に相関があるかどうか検討する。

2、凝固異常に対するシロリムス療法の Proof of concept

シロリムスの抗腫瘍効果、細胞周期、アポトーシス関連因子、血管新生の検討

H30年度に各細胞株および正常血管内皮細胞株を培養し、シロリムスを添加し、細胞増殖アッセイを行う。また治療後の細胞周期、および細胞内のアポトーシス蛋白の発現をウエスタンブロット法、定量的RT-PCRで評価する。また治療後のmTORおよびリン酸化mTOR蛋白の発現なども測定する。

4. 研究成果

凝固異常のある脈管異常症例の血液を用いて、CLEC-2、血管・リンパ管新生に関わるマーカー(VEGF-A、C、D、MMP2、9、Angiopoietin1、2、BMP-9、EGF、Endoglin、Endothelin-1、FGF-1、FGF-2、Folistatin、HB-EGF、PLGFなど)などをELISA測定キット(R&Dなど)およびマルチプレックスアッセイシステムを用いた解析パネル(MILLIPLEX)によって網羅的に解析した。本研究結果は論文化し、公表した。

また病変部位から採取したサンプルより、紡錘型細胞および免疫組織染色でポドプラニン陽性細胞を証明した。またポドプラニン陽性細胞をセルソーターで抽出し、疾患特異的な細胞株を初代培養する。継代した細胞を用いて、ヒト正常血小板が細胞量依存性に血小板凝集を起こすかどうかを検討した。各細胞株および正常血管内皮細胞株を培養し、シロリムスを添加し、細胞増殖アッセイを行った。また治療後の細胞周期、および細胞内のアポトーシス蛋白の発現をウエスタンブロット法、定量的RT-PCRで評価した。また治療後のmTORおよびリン酸化mTOR蛋白の発現なども測定した。本研究結果については論文化する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ozeki M., Nozawa A., Yasue S., Endo S., Asada R., Hashimoto H., Fukao T.	4. 巻 14
2. 論文標題 The impact of sirolimus therapy on lesion size, clinical symptoms, and quality of life of patients with lymphatic anomalies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orphanet J Rare Dis.	6. 最初と最後の頁 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-019-1118-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nozawa A., Ozeki M., Matsuoka M., Nakama M., Yasue S., Endo S., Kawamoto N., Ohnishi H., Fukao T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Perampanel Inhibits Neuroblastoma Cell Proliferation Through Down-regulation of AKT and ERK Pathways.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 3595-3599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ozeki M., Aoki Y., Nozawa A., Yasue S., Endo S., Hori Y., Matsuoka K., Niihori T., Funayama R., Shirota M., Nakayama K., Fukao T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Detection of NRAS mutation in cell-free DNA biological fluids from patients with kaposiform lymphangiomatosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orphanet J Rare Dis.	6. 最初と最後の頁 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-019-1191-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nozawa A., Ozeki M., Yasue S., Endo S., Ohe N., Miyazaki T., Fukao T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Proinflammatory Cytokine Secretion in a Patient With Recurrent Neuroblastoma Related to the Onset of Malignancy-associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 e199-e201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000001617	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nozawa A., Ozeki M., Yasue S., Endo S., Kawamoto N., Ohnishi H., Fumino S., Furukawa T., Tajiri T., Maekawa T., Fujino A., Souzaki R., Fukao T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Immunologic Effects of Sirolimus in Patients With Vascular Anomalies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001650	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kumagai C., Ozeki M., Nozawa A., Kakuda H., Fukao T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Efficacy of sirolimus in an infant with Kasabach-Merritt phenomenon.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 887-889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13630.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozeki M, Asada R, Saito A, Hashimoto H, 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.	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficacy and safety of sirolimus treatment for intractable lymphatic anomalies: a study protocol for an open-label, single-arm, multicenter, prospective study (SILA)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 84-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nozawa A, Ozeki M, Hori T, Kato H, Ohe N, Fukao T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Fatal progression of Gorham-Stout disease with skull base osteomyelitis and lateral medullary syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Med.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2118-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozeki M, Fukao T	4. 巻 1
2. 論文標題 Generalized lymphatic anomaly and Gorham-Stout disease: overview and recent insights.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advance Wound Care.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1089/wound.2018.0850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 遠渡沙緒理, 野澤明史, 安 志保, 木村豪, 小関道夫, 深尾敏幸.
2. 発表標題 Kasabach-Merritt phenomenonに対するmTOR阻害剤の有効性と安全性について.
3. 学会等名 日本血管腫血管奇形学会(第15回)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 16.Ozeki M, Nozawa A, Kawamoto N, Fujino A, Hirakawa S, Fukao T.
2. 発表標題 Differences in clinical findings and plasma cytokine profiles between generalized lymphatic anomaly and kaposiform lymphangiomatosis.
3. 学会等名 The 22nd International Workshop of the International Society for the Study of Vascular Anomalies. (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----