

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16974

研究課題名（和文）難治性血管奇形に対するmTOR経路に着目した血管新生阻害療法の開発

研究課題名（英文）Development of antiangiogenic therapy targeting mTOR signaling pathway for the treatment of complicated vascular malformations

研究代表者

石川 耕資（ISHIKAWA, Kosuke）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：60791374

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）：血管奇形においてmTOR経路を介した血管新生が起きているのかを検討した。病理組織学的に血管奇形に対する硬化療法後に、閉塞した血管内で血管新生したと考えられる血管内血管を認めた。新生血管の血管内皮細胞はリン酸化mTORに対する免疫組織化学染色が陽性であった。血管奇形に対する硬化療法後の血管再疎通を予防するため、mTOR経路阻害薬を用いた血管新生阻害療法の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

血管奇形は約40%が難治性であり、その多くが小児期から生涯にわたり治療を要するため、新たな薬物療法の開発が望まれる。本研究により、血管奇形に対する硬化療法後にmTOR経路を介した血管新生が起きている可能性が示唆された。硬化療法後の血管内血管新生による血管再疎通を阻害し硬化療法の効果を高めるため、mTOR経路をターゲットにした新たな薬物療法の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate angiogenesis through the mTOR signaling pathway as a therapeutic target in vascular malformations. Histopathological examination of vascular malformations after sclerotherapy showed angiogenesis in sclerosed vessels. The vascular endothelial cells of neovasculature were immunohistochemically positive for phospho-mTOR. This study demonstrated the possibility of the antiangiogenic therapy targeting mTOR signaling pathway for the treatment of vascular malformations to prevent recanalization of sclerosed vessels.

研究分野：形成外科

キーワード：血管奇形 血管新生 血管内皮細胞 硬化療法 ラバマイシン シロリムス 動静脈奇形 脈管奇形

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。

## 1. 研究開始当初の背景

血管奇形は局所的な脈管形成異常により生じた先天性の病変で、我が国の疫学調査では 42% が難治性であり<sup>1</sup>、術後の再発予防を含めた新たな薬物療法の開発が望まれる。血管奇形の病変増大には、血流不均衡による局所的な低酸素状態に起因した血管新生の寄与などが考えられるが、その病態はいまだ解明されていない。治療法には切除や塞栓療法、硬化療法などがあるが、確立された薬物療法はない。近年、欧米で行われたラパマイシンを用いた難治性血管腫・血管奇形に対する第 Ⅲ 相臨床試験において、85% の症例で改善が認められ<sup>2</sup>、新たな薬物療法として期待が高まっているが、血管奇形に関する基礎研究は少ないのが現状である。ラパマイシンは、その標的タンパク質 mTOR の阻害によって血管新生を抑制する作用があるとされる。

## 2. 研究の目的

血管奇形において、特に硬化療法後に mTOR 経路を介した血管新生が起きているのかを検討し、mTOR 経路をターゲットにした新たな治療を開発することを本研究の目的とした。

また、ヒト血管奇形の手術検体から血管内皮細胞を初代培養し、その遊走能、増殖能、管腔形成能などに対する各種 mTOR 経路阻害剤の作用を検討すること、ラットの硬化剤による静脈閉塞モデルに対し、ラパマイシンを投与後、閉塞した静脈の再疎通について比較することで硬化療法後の血管新生阻害作用を検討することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 北海道大学病院および斗南病院において、本研究に関する自主臨床研究「血管奇形における血管新生を中心とする病態機序についての臨床研究」を申請し、承認を得た。対象となる血管奇形症例の既存パラフィン包埋組織標本を調査し、HE 染色、エラスティカ・マッソン染色などの結合組織染色による病理組織学的検討を行い、リン酸化 mTOR に対する免疫組織化学染色を検討した。

(2) 血管奇形の手術残余検体（静脈奇形 1 例、動静脈奇形 2 例）を用いて組織片培養により血管内皮細胞の初代培養を行った。手術残余検体の血管を 1mm 大に細片化し、内腔が下になるようフィブロネクチンでコーティングした培養皿(培地 EGM-2 / 20% FBS)に播種した。培養中、位相差顕微鏡下に線維芽細胞をセルスクレーパーで適宜選択的に除去し、敷石状に単層配列した血管内皮細胞を継代培養した。線維芽細胞の完全な除去が困難であったため、CD31 抗原に対するフローサイトメトリー(FACS Aria)により血管内皮細胞の単離を行った。positive control として HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞)、negative control として同検体からの線維芽細胞を使用した。

(3) 北海道大学において研究課題名「静脈閉塞動物モデルにおける血管再疎通に対する mTOR 阻害物質の作用の検討」の動物実験計画書を申請し、承認を得た。ラットを用いた硬化剤による静脈閉塞モデル作製を検討した。10 週齢雄の Wistar ラットに対し、実験動物麻酔装置を用いた 2.5% イソフルラン吸入による全身麻酔下にモデル作製を行った。手術用顕微鏡下に単径部を皮膚切開した上、大腿静脈もしくは浅腹壁静脈を 27G 針で穿刺し、硬化剤として無水エタノール 0.1ml を静脈内注射後、圧迫止血し、ナイロン糸で閉鎖した。1 週間後に大腿動静脈もしくは浅腹壁動静脈を採取し、4% パラホルムアルデヒドに浸漬して固定後、HE 染色で組織を確認した。

## 4. 研究成果

(1) 北海道大学病院および斗南病院において、対象となる血管奇形症例を調査し、特に静脈奇形・毛細血管奇形・患肢の過成長を三徴とする難治性疾患である Klippel-Trenaunay 症候群について、その特徴的な臨床所見や治療法を学会・論文発表した。

血管奇形症例の既存パラフィン包埋組織標本を調査し、硬化療法後に閉塞した血管内で血管新生したと考えられる血管内血管(図 1)および間質における微小血管の所見を認めた。それらの新生血管と考えられる脈管構造はリン酸化 mTOR に対する免疫組織化学染色が陽性であった(図 2)。

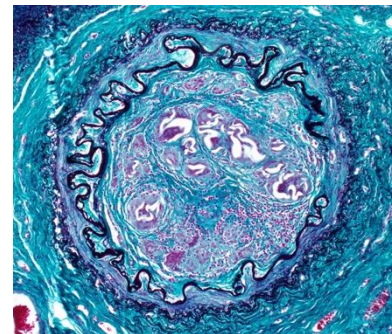


図 1. 動静脈奇形における閉塞した血管内での血管新生所見 (エラスティカ・マッソン染色)

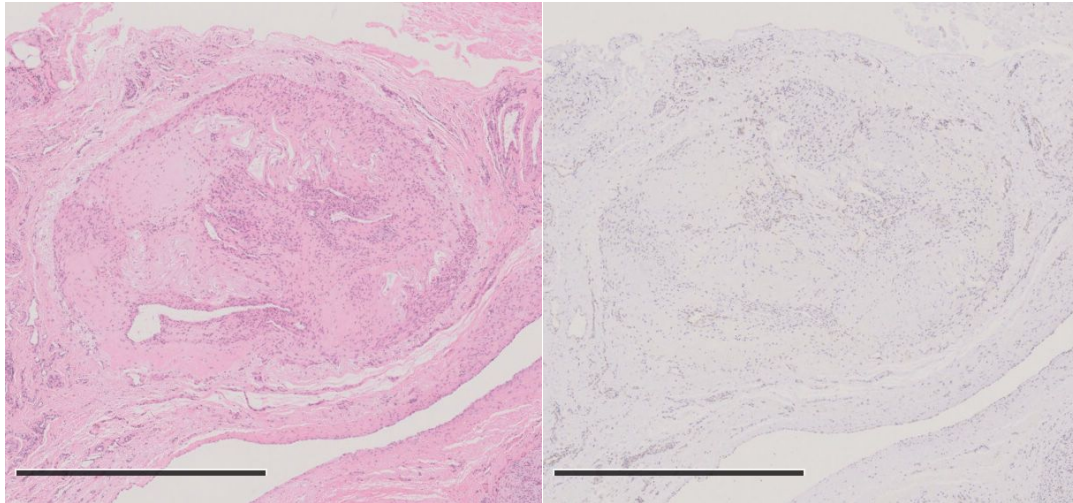


図 2. 動静脈奇形における閉塞した血管内での血管新生所見  
左：HE 染色、右：リン酸化 mTOR に対する免疫組織化学染色、bar 1mm

(2) ヒト血管奇形の手術残余検体を用いた組織片培養から血管内皮細胞を初代培養した(図 3)が、混入した線維芽細胞から血管内皮細胞をフローサイトメトリーにより単離することはできなかった。継代培養により血管内皮細胞 + 線維芽細胞を  $1.0 \times 10^6$  程度まで増やしたが、ゲーティング等 FACS の操作に技術的問題があった可能性が考えられた。

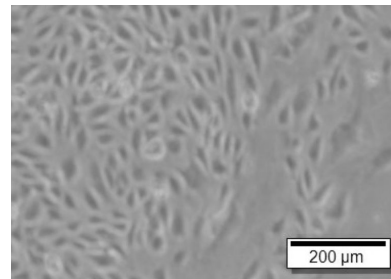


図 3. 動静脈奇形からの血管内皮細胞の初代培養

(3) ラットを用いた硬化剤による大腿静脈閉塞モデル作製を検討したが、単径部を切開し直視下で大動静脈を全周性に剥離後、ダブルクランプしてから静脈穿刺する方法では、硬化剤の漏出や剥離操作による術後の癒痕形成から手技的に安定したモデルは作製できなかった。そこで、浅腹壁静脈に周囲を剥離せず、クランプなしで無水エタノール 0.1ml を静脈内注射する方法に変更した。1 週間後に採取した浅腹壁静脈の HE 染色では、内腔の閉塞した静脈を確認できた(図 4)。しかし、動脈と並走しているため、閉塞した静脈の再疎通に関するインドシアニングリーンを使用した蛍光血管造影による非侵襲的な経時的評価は困難なモデルであった。また、単径部を皮膚切開するモデルでは術後創部にリンパ漏が原因と考えられる漿液腫が発生し、安定したモデルは作製できなかった。

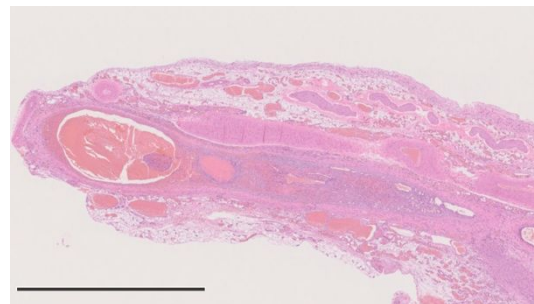


図 4. 硬化剤注入 1 週間後のラット浅腹壁動静脈の HE 染色、bar 2.5mm

#### <引用文献>

- 力久直昭, ほか. 血管腫・血管奇形の全国疫学調査に向けての予備調査結果の報告 重症度と難治性の分析. 日本形成外科学会誌, Vol. 33, No. 8, 583-590, 2013  
Adams DM, et al. Efficacy and safety of sirolimus in the treatment of complicated vascular anomalies. Pediatrics, Vol. 137, No. 2, e20153257, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa Kosuke, Yamamoto Yuhei, Funayama Emi, Furukawa Hiroshi, Sasaki Satoru	4. 巻 8
2. 論文標題 Wound-healing problems associated with combined vascular malformations in Klippel-Trenaunay syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advances in Wound Care	6. 最初と最後の頁 246 ~ 255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/wound.2018.0835	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 Ishikawa Kosuke, Funayama Emi, Yamamoto Yuhei, Furukawa Hiroshi, Hayashi Toshihiko, Murao Naoki, Osawa Masayuki, Maeda Taku, Fujita Munezumi, Sasaki Satoru	4. 巻 46
2. 論文標題 Squamous cell carcinoma arising in a chronic leg ulcer in Klippel-Trenaunay syndrome after the Charles procedure: A case with 40 years of follow up	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e403 ~ e405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15001	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 佐々木了、石川耕資	4. 巻 145
2. 論文標題 特集 / 患児・家族に寄り添う血管腫・脈管奇形の医療：混合型脈管奇形	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PEPARS	6. 最初と最後の頁 53 ~ 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川耕資、藤 雄大、藤田宗純、森山宇蘭、舟山恵美、山本有平、佐々木了
2. 発表標題 上肢の過成長を伴う血管奇形症例の検討
3. 学会等名 第62回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川耕資
2. 発表標題 PI3K 阻害薬による静脈奇形とPROSの治療
3. 学会等名 第62回日本形成外科学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川耕資、藤 雄大、藤田宗純、森山宇蘭、竹田朋弘、三田村真太郎、舟山恵美、佐々木了
2. 発表標題 下肢Klippel-Trenaunay症候群における創傷の検討
3. 学会等名 第11回日本創傷外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川耕資、藤田宗純、竹田朋弘、三田村真太郎、舟山恵美、佐々木了
2. 発表標題 下肢Klippel-Trenaunay症候群に対する治療の検討
3. 学会等名 第16回日本血管腫血管奇形学会学術集会
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
研究協力者	山本 有平  (YAMAMOTO Yuhei)  (70271674)	北海道大学・医学研究院・教授    (10101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	舟山 恵美 (FUNAYAMA Emi) (10533630)	北海道大学・医学研究院・准教授  (10101)	
研究協力者	林 利彦 (HAYASHI Toshihiko) (00432146)	北海道大学・歯学研究院・准教授  (10101)	
研究協力者	村尾 尚規 (MURAO Naoki) (90706558)	北海道大学・大学病院・講師  (10101)	
研究協力者	大澤 昌之 (OSAWA Masayuki) (70625029)	北海道大学・大学病院・助教  (10101)	
研究協力者	前田 拓 (MAEDA Taku) (80813542)	北海道大学・医学研究院・助教  (10101)	
研究協力者	藤田 宗純 (FUJITA Munezumi) (60813938)	北海道大学・医学研究院・客員研究員  (10101)	
研究協力者	古川 洋志 (FURUKAWA Hiroshi) (00399924)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	
研究協力者	佐々木 了 (SASAKI Satoru)	国家公務員共済組合連合会 斗南病院・形成外科・科長	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	小山田 ゆみ子  (OYAMADA Yumiko)	国家公務員共済組合連合会 斗南病院・病理診断科・科長	