

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18913

研究課題名（和文）乳児血管腫に対するプロプラノロールの作用機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Study to clear the mechanism of propranolol for infantile hemangioma

研究代表者

藤木 政英（Fujiki, Masahide）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50532066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000 円

研究成果の概要（和文）：乳児血管腫組織より、血管内皮細胞の単離と培養を行った。続いて、単離した血管内皮細胞にプロプラノロールを0～100ng/mlの濃度で培養液に添加したが、プロプラノロールの添加のみでは血管内皮細胞の増殖抑制効果を認めなかった。そのため、プロプラノロール添加群と非添加群の血管内皮細胞においてproangiogenic growth factorであるVEGF、bFGF、MMP2/9の発現の差異を比較したが、両群に有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロプラノロールの乳児血管腫の退縮作用は、血管内皮細胞の増殖抑制とは異なる機序によって引き起こされていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The vascular endothelial cells isolated from infantile hemangioma were cultured. Although the propranolol were added to culture solution, proliferation of endothelial cells was not inhibited.

研究分野：形成外科学

キーワード：乳児血管腫 プロプラノロール

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

乳児血管腫の治療として、経過観察(wait and see policy)、色素レーザー、ステロイドの局所投与などが行われてきたが、近年、非選択的交感神経 β 受容体遮断薬であるプロプラノロールも用いられている。プロプラノロールはもともと降圧薬として用いられてきた薬剤であるが、2008 年、巨大乳児血管腫を有する児に併発した閉塞性肥大型心筋症に対してプロプラノロールが投与され、それが偶然血管腫の退縮をもたらした症例が報告された(Léauté-Labrèze C et al, N Engl J Med, 2008)。その症例報告以降、さまざまな臨床研究が行われ、乳児血管腫に対するプロプラノロールの有用性は現在ではほぼ確立しているといえる。しかしながら、乳児血管腫に対するプロプラノロールの作用機序は現在でも不明であり、基礎研究によるアプローチもなされていない。そのため、なぜ効果があるのかわからないまま臨床で使用されているのが現状であり、長期的な副作用や予期しない重篤な合併症が起きる可能性は否定できない。そのため、乳児血管腫に対するプロプラノロールの作用機序の解明が必要である。

その一方で、近年、血管奇形において遺伝子レベルの変異があることが報告されており、乳児血管腫に対しても分子生物学的に検討を行う必要性が高い。しかしながら、乳児血管腫に関して遺伝子レベルで検討した報告はなく、基礎研究は進んでいない。その理由として、研究対象となる乳児血管腫の組織の採取機会が少ないことや動物モデルが確立していないこと、また病変の主座である血管内皮細胞の初代培養が困難なためであると考えられる。特に血管内皮細胞の研究は重要であると考えられるが、血管内皮細胞は組織からの回収率が低く、混在する増殖能の高い線維芽細胞に容易に駆逐されてしまうため、単離すること自体が高い技術レベルを要する。さらに、in vitro での血管内皮細胞の老化は早く、仮に単離に成功しても、通常の培養ではせいぜい数世代で増殖速度が極端に低下してしまうため、血管内皮細胞の初代培養を確立し、実験に用いるだけの細胞数を確保することは困難である。しかし、当研究室ではすでに血管腫・血管奇形組織から血管内皮細胞を単離し、初代培養を行うプロトコルを確立している。さらに、Rho キナーゼ阻害薬である Y27632 を加えた培地を用いることにより、効率的に多数の血管内皮細胞を採取できることを報告してきた。

2. 研究の目的

乳児血管腫から単離した血管内皮細胞を用い、プロプラノロールの作用機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

乳児血管腫より血管内皮細胞を単離培養する。単離培養した血管内皮細胞にプロプラノロールを添加し、血管内皮細胞の増殖が抑制されることを確認することにより、プロプラノロールに感受性がある細胞株であることを確認する。添加する濃度はプロプラノロールの血中濃度として推奨されている 50ng/ml あたりを想定しており、0~100ng/ml の間で 10ng/ml 毎の割り付けで投与する。そして、得られたデータから回帰曲線を作製し、血管内皮細胞株に対して 50% の細胞増殖阻害を示す IC50(half maximal inhibitory concentration)を計測する。

次いで、これまでに報告されている悪性腫瘍における抗癌剤非感受性細胞株と同様の方法で(Di Nicolantonio F et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2008)、プロプラノロール非感受性血管内皮細胞株を作成する。具体的には、単離培養した血管内皮細胞に IC50 のプロプラノロールを培養液に添加して培養する。続いて、細胞はプロプラノロールを除いた培養液にて細胞密度が回復するまで 2 週間培養する。この操作を複数回繰り返すことで、プロプラノロール感受性細胞株の割合が減少し、非感受性細胞株の割合が増加していくことになる。そして、IC50 において血管内皮細胞株と比べ 20 倍の耐性を有する細胞株を作製し、プロプラノロール非感受性細胞株とする。

乳児血管腫血管内皮細胞株とプロプラノロール非感受性血管内皮細胞株間の遺伝子発現変化についてマイクロアレイ(Affimetrix 社、Gene ST1.0 array)による遺伝子解析を行う。行った遺伝子解析の結果、発現変化(耐性株において 2 倍以上の発現亢進あるいは 0.5 倍以下の発現減弱)を示した遺伝子については Real-time PCR でも発現の差異を確認する。さらに、候補と考えられた遺伝子に関しては免疫染色(タンパク質)、in situ hybridization(mRNA)を用いて、より直接的に評価する。

4. 研究成果

乳児血管腫組織より、血管内皮細胞の単離と培養を行った。続いて、単離した血管内皮細胞にプ

ロブラノロールを 0～100ng/ml の濃度で培養液に添加したが、プロブラノロールの添加のみでは血管内皮細胞の増殖抑制効果を認めなかった。そのため、プロブラノロール添加群と非添加群の血管内皮細胞において proangiogenic growth factor である VEGF、bFGF、MMP2/9 の発現の差異を比較したが、両群に有意差を認めなかった。プロブラノロールの乳児血管腫の退縮作用は、血管内皮細胞の増殖抑制とは異なる機序によって引き起こされていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------