

機関番号：32202

研究項目：若手研究(B)

研究期間：2008-2010

課題番号：20790743

課題研究名(和文)：小児血管腫進展における血管内皮前駆細胞と VEGF, VEGF-C の役割の解明

課題研究名(英文)：The role of endothelial progenitor cells and VEGF, VEGF-C in proliferating infantile hemangioma.

研究代表者：

中村 幸恵 (NAKAMURA SACHIE)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20382955

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞から分泌された VEGF は腫瘍血管新生に関与する。小児血管腫および神経芽細胞腫患者では、VEGF(-A)は健常者と比較し有意に上昇していた。増殖期血管腫患者は、定常期から回復期の血管腫患者と比較し VEGF-A が上昇する傾向にあった。また、神経芽細胞腫において腫瘍摘出後 2 か月経過しても VEGF-A は正常化せず、高値が持続していた。VEGF-C, D は、血管腫患者は健常者と比較し有意に低下していた。

研究成果の概要(英文)：hemangioma and neuroblastoma in children were characterized by increased expression of VEGF-A. The expression of VEGF-A is higher in proliferating hemangioma than hemangioma in stable state. In neuroblastoma patients, the expression of VEGF-A remained high-level after tumorectomy. VEGF-C and VEGF-D are significantly lower in infantile hemangioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：癌、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

①小児血管腫は、自然退縮が見込まれる小さな莓状血管腫から、巨大血管腫となり DIC 伴い Kasabach-Merritt 症候群を呈し致死的な経過をとる疾患まで多彩である。特に、Kasabach-Merritt 症候群は、血管内皮異常から局所的血管内凝固がおこり、消耗性凝固障害から重篤な出血傾向を示し治療に抵抗性の症例も多く経験される。治療は放射線照射、ステロイド、抗癌剤が使用される一方で、治療

と無関係に増悪消退することも知られているがその機序は不明である。

vascular endothelial growth factor (VEGF) は、血管内皮細胞に働き血管新生に関わるとされるが、現在 VEGF(-A) 以外に VEGF-B, C, D, E が発見され各々の役割についての解明が進んでいる。VEGF-A, B は VEGFR-1, 2 のリガンドとして血管新生に関わり、VEGF-C, D は VEGFR-3 のリガンドとしてリンパ管新生に関わるこ

とが報告されている。病的な腫瘍血管新生では腫瘍細胞から分泌されるVEGF-AがVEGFR-1, 2を介して腫瘍周囲の血管新生に働き、腫瘍の増大や遠隔転移に関与していると考えられ、臨床においてもヒトVEGF中和抗体 (bevacizumab) による結腸・直腸癌や肺癌、乳癌におけるすぐれた延命効果が報告されている。日本でも、治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に対し2007年4月より使用され、同時に他の腫瘍においても臨床試験が行われている。このため、小児の血管腫においても血管腫の増大縮小にVEGFが関与していることがあきらかにできれば血管新生阻害薬は強力な治療薬になることが期待される。

また、VEGF-Cは、腫瘍周囲のリンパ管新生やリンパ転移に関与することが知られているが、近年、腫瘍の病的血管新生にも関与している可能性が報告されている。具体的には、悪性度の高い脳腫瘍であるglioblastomaやastrocytomaにおいてVEGF-C, Dが発現しているという報告や、Stage IIIのWilms腫瘍でVEGF-Cが発現しているという報告がある。また、VEGF-Cの受容体であるVEGFR-3が胎児血管新生や腫瘍血管新生に関与する報告も散見されることから、VEGF-Cは進行性の悪性腫瘍の血管新生に関与することが予想され、小児の血管腫の中でも、Kasabach-Merritt症候群を呈する急激に増大する血管腫においてVEGF-Cシグナルが関与するかどうかは非常に興味深く、関与を証明できれば治療にも大きく役立つと考えられた。

小児の血管腫進展における VEGF シグナルの関与については、cutaneous capillary hemangioma の症例において、VEGF が過剰発現していること、血管内皮細胞の増殖を特徴とする蕁状血管腫では VEGF が高値を呈し静脈の奇形である海綿状血管腫との鑑別が可能と

なることが報告されている。しかしながら、現在までに血管内皮前駆細胞や病的血管新生に関与する VEGF-C の発現と血管腫の重症度や増悪消退に伴う変動を検討した報告はなく、小児の血管腫症例における VEGF および VEGF-C の動態を検討することは血管腫の増悪機序の解明につながるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究において申請者は、血管腫の増悪消退に連動して血中VEGF・VEGF-C, Dが動き、かつKasabach-Merritt症候群を呈する巨大血管腫においてはこれらが異常な動態を呈していることを予想した。

このことが証明できれば、

- i) VEGFを標的とした抗血管新生阻害薬の血管腫治療への適応についての理論的根拠を与える。
- ii) Kasabach-Merritt症候群を合併する危険性の高い巨大血管腫においては、ステロイド、放射線、抗がん剤等の強力な治療が行われるが、VEGF、VEGF-Cを経時的に追うことにより本疾患の増大や消退の予想ができれば血管腫の治療管理に大きな進歩をもたらすと考えた。

3. 研究の方法

- ① 検体採取：当院を受診し、小児血液腫瘍専門医が血管腫と診断した患児13名を対象に末梢血の採取を行った。また、最近、小児神経芽腫においても、腫瘍進展度とVEGF発現について相関があるという報告があり (J Exp Clin cancer Res 2009, 28, 143)、小児における代表的な固形腫瘍である神経芽細胞腫患者1名、Wilms腫瘍患者1名を対象者を拡大し同様に検体採取した。また、血管新生に異常を認めないと考えられる遺伝性球状赤血球症や鉄欠乏性

貧血といった非腫瘍性疾患 11 名についても対照として検体採取し、同時に測定を行った。

- ② 血清採取：採取した血液を、Ficoll 密度勾配遠心分離法 (Lymphoprep; Nycomed, Oslo, Norway) にて 1500rpm で 15 分間遠心分離し、血清成分を採取した。血清については検査時まで -80°C で凍結保存した。
- ③ VEGF-A, C, D 測定：採取した血清を用いて ELISA 法 (human ELISA キット; R & D Systems, Inc) にて VEGF-A, C, D を経時的に測定した。
- ④ 統計処理：血管腫患者と対照者の二群について、t 検定を用いて有意差の検討を行った。 $p < 0.05$ を有意とした。神経芽細胞腫や Wilms 腫瘍については、患者数がそれぞれ 1 名であったため、各患者について、複数回検体採取したものと、対照者について同様に比較を行った。

4. 研究成果

今回検討した血管腫患者は、対象年齢は 0 歳から 4 歳、男女比は男児 7 名、女児 6 名だった。血管腫の種類は、Sturge-Weber 症候群を含む単純性血管腫が 4 名、莓状血管腫が 5 名、海綿状血管腫が 5 名（この内、莓状血管腫と海綿状血管腫の合併例が 1 名）だった。いずれも、血液検査で凝固異常は認めなかった。

神経芽細胞腫患者は、国際病期分類で Stage I であり、腫瘍摘出術のみで経過観察している。Wilms 腫瘍患者は米国 Wilms 腫瘍研究グループの病期分類で Stage IV であり、腫瘍摘出術および多剤化学療法、放射線療法を行っており、腫瘍摘出後、化学療法中、放射線前後、全治療終了後について血管増殖因子群の推移を追った。

VEGF-A については、血管腫患者が $296.7 \pm 173.5 \text{ pg/ml}$ 、対照者が $120.8 \pm 95.7 \text{ pg/ml}$ と血管

腫患者において有意に上昇していた ($P < 0.05$)。腫瘍縮小期に経時的に VEGF-A レベルの推移を追えた、左眼瞼の莓状血管腫症例での検討では、VEGF-A は $250\text{--}300 \text{ pg/ml}$ で変動はなかった。この患者については、治療でプレドニゾロン 3 mg/kg を内服し、血管腫縮小に合わせて漸減しており、最近、Corticosteroid が infantile hemangioma-Derived stem cell において、VEGF-A の抑制に働くと報告もある (N Engl J Med 2010 Mar 18;362(11):1005-13) ことから、ステロイド投与により増大期の VEGF レベルが低く修飾された可能性がある。

また、臨床上、増殖期にある小児血管腫患者 4 名と、定常期から回復期にあたる小児血管腫患者 9 名について数値を比較した。増殖期は平均 374.44 pg/ml 、定常期から回復期は平均 90.25 pg/ml と、増殖期の方が高値となる傾向にあったが、有意差はなかった ($P = 0.12$)。

神経芽細胞腫の患者については、1 名のみであったため、同一患者で複数回測定し経時的な推移を追うとともに、対照者と比較した。神経芽細胞腫患者は腫瘍摘出前から 2 か月後までを平均し $883.3 \pm 104.0 \text{ pg/ml}$ と、対照者と比較し有意に上昇していた ($P < 0.05$)。本症例は、外科治療で腫瘍全摘が出来ており、腫瘍摘出のみで再発なく 1 年半経過している。摘出前と摘出後 1 か月、2 か月について数値を測定したが、いずれも VEGF-A が上昇しており、(摘出前 850 pg/ml 、1 か月後 1000 pg/ml 、2 か月後 800 pg/ml) 摘出直後に数値の正常化は得られないことが判明した。

Wilms 腫瘍患者についても、1 例のみであったため、治療経過中に複数回検体採取したが、平均 $173.4 \pm 145 \text{ pg/ml}$ であり、対照者との有意差はなかった。Wilms 腫瘍患者については、化学療法を先行し、その後腫瘍摘出術、放射線治療と進めたが、腫瘍摘出前 120 pg/ml 、放射線治療中 110 pg/ml 、治療終了後 3 か月で 200 pg

/ml、と治療相に一致した変動はなかった。

VEGF-A, Bが主に血管新生に関わる一方、VEGF-C, Dは主にリンパ管新生に関わるとされるが、同時に、VEGF-C, Dについても、血管腫や固形腫瘍との関わりがないか、数値を追った。VEGF-Cについては、対照者が 1650 ± 1012 pg/mlに対し、血管腫患者が 767.9 ± 537.8 pg/ml、神経芽細胞腫患者が 712.5 ± 256.1 pg/ml、Wilms腫瘍患者が 354.5 ± 299.6 pg/mlであり、血管腫患者および神経芽腫患者、Wilms腫瘍患者すべてが対照者と比較し有意に低下していた ($P < 0.05$)。VEGF-Dについては血管腫患者が 348.7 ± 149.7 pg/ml、対照者は 456.3 ± 179.0 pg/mlと、むしろ血管腫患者の方が低下している傾向にあったが、有意差はなかった ($P = 0.08$)。

5. 考案

本研究の研究中に小児血管腫において、Western blot法で、増殖期にはVEGF-Aが発現し、回復期には発現しないという報告 (N Eng J Med 2010;362:1005-13) や、ELISA法で血清VEGF-A濃度を測定し、増殖期の血管腫は、回復期血管腫や血管奇形 (vascular malformations) と比較し有意に数値の上昇がみられるという報告 (Cytokine 2010;49:141-47) がなされたが、本研究でも、増殖期は回復期と比較しVEGF-Aが上昇している傾向があったことから、増殖期にVEGF-A発現亢進しているということは確認できた。今まで、血管腫の標準的治療とされたステロイドに関して、マウスモデルで、corticosteroidが、血管腫誘導幹細胞のVEGF-A発現を抑制する (N Engl J Med 2010;362:1005-13) こと、最近治療薬として注目されているpropranololについても、VEGF, bFGF (basic fibroblastic growth factor) のダウンレギュレーションが機序ではないかとされており (Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2010;74:338-42)、血管腫の治療として、V

EGF-Aの経路を抑制する、抗VEGF抗体を使用する標的治療は理にかなっていると考える。現在、小児領域での臨床治療においてはVon Hippel-Lindau病の網膜血管芽腫に対し、VEGFヒト化モノクローナル抗体であるbevacizumabを硝子体注入し網膜血管新生を防ぐという治療法は試みられているが、小児血管腫に関して、抗VEGF抗体を使用する試みはまだなされていない。本研究でも、増殖期にVEGF発現亢進することは証明できており、今後、検体を集積し、抗VEGF抗体を使用した場合の反応について、in vivoで抑制効果が証明できれば臨床に向けての大きな一歩になると考えられた。また、今回の症例には凝固障害をきたす巨大血管腫は含まれておらず、巨大血管腫におけるVEGFの推移についてもぜひ比較検討したいと考えている。

VEGF-C, Dについては、主にリンパ管新生にかかわるとされ、腫瘍でもリンパ転移をきたしやすい疾患については発現亢進がみられると報告されている。頭皮および顔面の血管肉腫についてはVEGF-C受容体であるVEGFR3の発現亢進については報告があり (Human pathology 2010;41:407-14)、血管腫に関しては、遺伝性血管腫の一部で5p31-33の異常が報告されており、同部位はVEGFR3も含むとされ (Journal of Dermatology 2010;37:939-55)、血管腫進展におけるVEGF-Cの関与について興味を持たれる。今回の研究では、血管腫症例においてはVEGF-Cは逆に有意に低下しており、血管腫の進展に関しては、VEGF-A/VEGFR1またはVEGFR2を介した経路の異常が主と考えられた。一方、血管腫細胞では、VEGFR1の発現低下およびVEGF依存性のVEGFR2活性化およびその下流のシグナル伝達経路の活性化がおこるという報告があり (Nat Med 2008;14:1236-46)、今後は小児血管腫におけるVEGFR1/VEGFR2、可溶性VEGFR1/VEGFR2の関与についても症例

を増やし、検討することで、小児血管腫の増殖や退縮の機序についてもより明確になると考えられる。

神経芽腫に関しては、神経芽腫を移植したマウスモデルについて、bevacizumabを使用することで生存率が改善したという報告 (Surgery 2008;144:269-75) があり、多剤併用療法の補助治療としての抗VEGF抗体が注目されている。今回の検討では、腫瘍摘出直後はVEGF-Aの上昇、かつ2か月経過しても正常化しないことが判明した。本研究では腫瘍摘出直後には、VEGF発現亢進が正常化しない可能性が示唆され、今後、症例数を増やし、正常化するまでの時期を明らかにすることで、抗VEGF抗体を併用する適正時期を明らかにすることができる。同時に、微小残存病変があった場合には、摘出直後には、VEGF経路の亢進が持続していると考えられ、腫瘍再増大の可能性も考えられる。再発予防としての抗VEGF抗体有用性についても、今後検討が必要と考えた。

固形腫瘍とVEGF-Cについては、M. Nowickiらが神経芽腫やWilms腫瘍について、腫瘍組織におけるVEGF-C発現をみており、Stage III以上の神経芽腫およびStage IIIのWilms腫瘍の腫瘍および血管新生部位にVEGF-C発現がみられるとし、予後不良因子としての可能性を示唆している (Folia Histochem Cytobiol 2008;46(4):493-9, Histopathology 2007;50:358-364)。今回の研究ではいずれもVEGF-Cが低下しており、相反する結果となったが、神経芽腫についてはStage Iと初期段階のものであったことで発現増加がなかった可能性がある。また、今回の研究では血清を使用しているが、前述の文献では腫瘍組織を染色しており、腫瘍細胞浮遊液を使用した場合には違う結果となる可能性もある。いずれにしても、今までの報告では少数の報告のみであり、いずれの

腫瘍についても総数を増やし、各病期におけるVEGF-C, DやVEGFR1, 2, 3について検討を加えることで、腫瘍増殖に関わる経路を明確にし、その経路を阻害することが腫瘍進展を抑制する治療につながるのではないかと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

第53回日本小児血液・がん学会学術集会発表予定 (2011年11月25-27日、群馬)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村幸恵 (NAKAMURA SACHIE)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：20382955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし