

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07851

研究課題名（和文）COX-2阻害薬によるリンパ管奇形に対する新しい治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for lymphatic malformations with COX-2 inhibitors

研究代表者

岡本 康裕（Okamoto, Yasuhiro）

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30398002

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）：リンパ管奇形の治療薬としてCOX-2阻害薬が有効であった症例を経験し、本研究ではCOX-2がin vitroでリンパ管内皮細胞の増殖を促進することを確認した後、次にCOX-2阻害薬が抑制すること、およびその分子生物学的な機序を明らかにすることを目的とした。初代培養リンパ管内皮細胞、および新たに作成したLM細胞株においてCOX-2がVEGFを介して、細胞増殖とtube formationを促進することがわかった。COX-2阻害薬の効果は、下流のPGE2やVEGF120によって救済され、COX-2阻害薬がPGE2やVEGF120を介してtube formationを抑制していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてCOX-2がリンパ管奇形の増殖の中心的な役割を果たしていること、COX-2阻害薬がリンパ管奇形の増殖を抑制する分子機序を明らかにしたことは本研究の学術的意義である。本研究を元に、COX-2阻害薬を実臨床へ応用する薬剤の開発が進めば社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：After experiencing patients where a COX-2 inhibitor was effective as a treatment for lymphatic malformation (LM), this study aimed to confirm that COX-2 promotes lymphatic endothelial cell proliferation in vitro and determine whether COX-2 inhibitors inhibit it. We then sought to elucidate the molecular biological mechanisms by which COX-2 inhibitors suppress LM. We found that COX-2 promotes cell proliferation and tube formation via VEGF in primary cultured lymphatic endothelial cells and a newly generated LM cell line; the effects of COX-2 inhibitors are rescued by downstream PGE2 and VEGF120, and COX-2 inhibitors inhibit PGE2 and VEGF120-mediated suppression of tube formation.

研究分野：小児血液、小児がん

キーワード：リンパ管奇形 COX-2阻害薬

1. 研究開始当初の背景

リンパ管奇形(lymphatic malformation: LM)は、リンパ管性嚢胞を中心とした腫瘍病変で、多くの場合は先天性で、頸部に発症することが多い。基本的な治療は外科的切除やピシバニールによる硬化療法である。しかし約7割の患者では治療後もLMが残存し、種々の問題が残る。LMは生物学的には良性の疾患であるが、増大すると発声・嚥下障害をおこしたり、気道を圧迫したりして、時に致死的となる重大な疾患である。小児慢性特定疾病情報センターによると、本邦には約10,000人のLM罹患者がいるとされ、多くの患者、特に小児が種々の症状に苦しんでいる。わたしたちは、COX-2阻害薬(セレコキシブ)がLMに効果のあることを見出し、報告した。すなわち、解剖学的な問題で外科的切除が行えず、ピシバニールによる硬化療法も無効であった小児患者がLMの増殖とともに気道閉塞を来したが、その疼痛に対してセレコキシブを内服したところ、内服開始から2週間でLMが軟化し始めた。継続したところ4週間目から縮小し、気道閉塞が解除された。セレコキシブはCOX-2に選択性の高い非ステロイド系の抗炎症剤で、鎮痛薬として用いられている。鎮痛作用とは別に、COX-2阻害薬は種々のがんの細胞株において抗リンパ管作用を介した抗腫瘍効果を示している。そこで、わたしたちはヒトの初代培養リンパ管内皮細胞をCOX-2阻害薬の存在下で培養したところ、リンパ管内皮細胞によるゲル上での管腔形成(tube formation)がCOX-2阻害薬の濃度依存性に抑制され、細胞増殖も抑制された。これまでのわたしたちの研究では、COX-2阻害薬によってcaspase 3活性が上がること、VEGF120が抑制されることがわかった。以上から、COX-2阻害薬によるリンパ管内皮細胞増殖の抑制には、少なくとも2つの経路(アポトーシス経路とVEGF経路)が関与していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、まずCOX-2が*in vitro*でリンパ管内皮細胞の増殖を促進することを確認した後、次にCOX-2阻害薬が抑制すること、およびその分子生物学的な機序を明らかにする。これらの機序を初代培養リンパ管内皮細胞、および新たに作成するLM細胞株における検討にて明らかにする。

3. 研究の方法

COX-2の増殖効果の証明

COX-2にリンパ管内皮増殖効果があることを証明する。

- 1) 初代培養リンパ管内皮細胞および後述2のLM細胞株を用いる。
- 2) 刺激: COX-2を直接添加し培養する。
- 3) 評価: tube formation アッセイ、細胞増殖アッセイ、COX-2作用の下流にあるPGE₂測定、HIF1 発現、VEGF120発現で評価し、増殖効果があることを確認する。

LM細胞株の樹立

上記の1と並行して、LM細胞株の樹立を行う。

- 1) 初代培養リンパ管内皮細胞を用いる。
- 2) ヒトLMで報告されているPIK3CA変異(p.E542K、p.E545A)³⁾を組み込んだプラスミッド・ベクターを作成
- 3) エレクトロポレーション(AMAXA(Lonza))で導入
- 4) 評価: 変異導入率の評価(RT-PCR)
- 5) 機能評価: tube formation アッセイ、細胞増殖アッセイ

COX-2阻害薬の作用機序解明

COX-2阻害薬に増殖抑制効果があることを証明し、作用経路を明らかにする。

- 1) 初代培養リンパ管内皮細胞および前述2のLM細胞株を用いる。
- 2) 阻害: 上記1の培養にCOX-2阻害薬を添加し培養

- 3) 障害の評価：tube formation アッセイ、細胞増殖アッセイ、PGE₂測定、HIF1 発現、VEGF120 発現、テロメラーゼ活性、caspase 3/7 活性、annexin 発現
- 4) 障害の救済：COX-2 阻害薬によって抑制された増殖を、その下流の因子によって救済
- 5) 救済する標的：PGE₂、VEGF120
- 6) 救済の評価：tube formation アッセイ、細胞増殖アッセイ(図 6：予想される代表的結果)

4. 研究成果

初代培養リンパ管内皮細胞に、COX-2 を添加して培養した。Tube formation は、非添加時に比べ、面積にして 129% (n = 12)に増加した。細胞数は 154% (n=12)に増加した。COX-2 作用の下流にある PGE₂ を PGE₂ 測定 CLIA キットで測定すると、COX-2 添加時には培養液中の PGE₂ は 2.58 倍に増加していた。HIF1 の蛋白発現は Western blot で 1.81 倍に増加していた。VEGF120 の蛋白発現は 2.66 倍に増加していた。以上より、COX-2 にはリンパ管内皮細胞において、増殖効果があることがわかった。これらの作用は、PGE₂ HIF1 VEGF 経路を介していることも推測された。

LM 細胞株の樹立：ヒト LM で報告されている PIK3CA 変異(p.E542K、および p.E545A)を組み込んだプラスミッド・ベクターを作成した。エレクトロポレーション(AMAXA(Lonza))を用いて人初代培養リンパ管内皮細胞に遺伝子導入を行った。しかし、エレクトロポレーション後の細胞の増殖は著しく悪く、遺伝子導入を行い、かつ安定して細胞培養を継続する条件は見出せなかった。そこで、マウスの内皮細胞である RCB1994 細胞を用いた。RT-PCR で遺伝子導入率の評価をすると、約 30%程度であった。導入された RCB1994 細胞をクローニングし(clone 1, 2, 3)、以下の実験には clone を用いた。Tube formation は、親株に比べ clone 1 では、面積にして 153% (n = 12)に増加した。細胞数は 157% (n=12)に増加した。培養液中の PGE₂ は 2.10 倍に増加していた。HIF1 の蛋白発現は Western blot で 1.51 倍に増加していた。VEGF120 の蛋白発現は 2.33 倍に増加していた。以上から COX-2 が VEGF を介して、細胞増殖と tube formation を促進することがわかった。また、マウス LM 細胞株の樹立に成功した。

マウスの内皮細胞である RCB1994 細胞に PIK3CA 変異(p.E542K)を組み込んだベクターをエレクトロポレーションで遺伝子導入した。クローニングを行い、clone 1 を用いて実験を行った。Clone 1 に COX-2 阻害薬を添加した培養では、Tube formation は非添加時に比べ、面積にして 759% (n = 12)に減少した。細胞数は 41% (n=12)に減少した。COX-2 作用の下流にある PGE₂ を PGE₂ 測定 CLIA キットで測定すると、COX-2 阻害薬添加時には培養液中の PGE₂ は 63%に減少した。HIF1 の蛋白発現は Western blot で 54%に減少した。VEGF120 の蛋白発現は 51%に減少した。以上より、COX-2 阻害薬にはリンパ管内皮細胞において、増殖抑制効果があることがわかった。これらの作用は、PGE₂ HIF1 VEGF 経路を介していることも推測された。テロメラーゼ活性は COX-2 阻害薬添加時は、非添加時に比べ 75%に減少した。その結果、caspase 3 活性は 1.85 倍になった。MTT アッセイでは、COX-2 阻害薬添加によって 27%に減少した。

COX-2 阻害薬の作用を救済するために、PGE₂ または VEGF120 を添加した。PGE₂ 添加時には、非添加時に比べ、tube formation は 1.3 倍、細胞数は 2.2 倍となり、救済された。これは COX-2 阻害薬非添加時のそれぞれ 98%、88%まで回復していたことになる。VEGF120 による救済では、非救済時の 1.23 倍に tube formation は回復し、細胞数は 2.16 倍になり、救済された。これは COX-2 阻害薬非添加時のそれぞれ 99%と 99%にあたった。以上から COX-2 阻害薬の効果は、下流の PGE₂ や VEGF120 によって救済され、COX-2 阻害薬が PGE₂ や VEGF120 を介して tube formation を抑制していることを示している。

しかし、シグナルの抑制の程度と表現型の抑制の程度には乖離があり、他の経路も関与していることが推測された。このため clone 1 を用いて遺伝子発現を検討した。導入前後の細胞の RNA の発現量を RNA シークエンスで比較した。発現が増加したものに増殖シグナルに関連するもの、細胞のエネルギー産生に関連するものが含まれていた。今後は、これらの新しく候補と考えられる経路について機能解析を行い、本当にリンパ管奇形の増殖に関連しており、かつ COX-2 阻害薬が効果を示すことを確認する。さらに、これらの経路が COX-2 阻害薬以外の治療の標的となりうるかを検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14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 [Jun Nagahama, Takuro Nishikawa, Takashi Tasaki, Yuki Yasudome, Tatsuro Nakamura, Takanari Abematsu, Shunsuke Nakagawa, Yuichi Kodama, Akihide Tanimoto, Yasuhiro Okamoto]	4. 巻 70
2. 論文標題 Systemic Epstein-Barr virus-positive T-cell lymphoma of childhood treated with the ICE regimen and allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric blood & cancer	6. 最初と最後の頁 e30041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.30041	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 [Yoshihiro Takahashi, Kentaro Ueno, Naohiro Shiokawa, Koji Nakae, Junpei Kawamura, Yasuko Morita, Daisuke Hazeki, Yasuhiro Okamoto]	4. 巻 26
2. 論文標題 Successful coil embolization for pediatric internal mammary artery aneurysm after the Fontan procedure: A case report and literature review.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of cardiology cases	6. 最初と最後の頁 279-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jccase.2022.05.016	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 [Junpei Kawamura, Kentaro Ueno, Yoshihiro Takahashi, Naohiro Shiokawa, Daisuke Hazeki, Yasuhiro Okamoto]	4. 巻 6
2. 論文標題 Usefulness of Three-Dimensional Transthoracic Echocardiographic Planimetry in a 4-Month-Old Infant with Comorbid Aortic Stenosis and Coarctation of the Aorta Complicated with Low Left Ventricular Ejection Fraction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CASE (Philadelphia, Pa.)	6. 最初と最後の頁 324-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.case.2022.06.001	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 [Eri Taimura, Junpei Kawamura, Shinsuke Maruyama, Kentaro Ueno, Yasuhiro Okamoto]	4. 巻 58
2. 論文標題 Early infantile paroxysmal atrioventricular block with autonomic nervous system dysfunction: A case report and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Paediatrics and Child Health	6. 最初と最後の頁 2289-2292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jpc.16136	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 [有村 萌,米衛 ちひろ,丸山 慎介,上野 健太郎,岡本 康裕]	4. 巻 85
2. 論文標題 遷延する嘔吐、下痢の症状から溶連菌感染症の診断に至らず、リウマチ熱を発症した1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 885-888
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 -

1. 著者名 [Hiroki Iwaizako,Takuro Nishikawa,Ikumi Kitazono,Akhide Tanimoto,Yasuhiro Okamoto]	4. 巻 64
2. 論文標題 Unknown primary malignant small round cell tumor masquerading as acute leukemia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society	6. 最初と最後の頁 e15158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15158	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 [Koji Kume,Kentaro Ueno,Junpei Kawamura,Yasuhiro Okamoto,Yoshifumi Kawano]	4. 巻 64
2. 論文標題 Early use of angiotensin-converting enzyme inhibitor and -blocker attenuated doxorubicin-induced cardiomyopathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society	6. 最初と最後の頁 e14880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14880	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 Rindiarti Almitra, Okamoto Yasuhiro, Nakagawa Shunsuke, Hirose Junko, Kodama Yuichi, Nishikawa Takuro, Kawano Yoshifumi	4. 巻 63
2. 論文標題 Changes in intracellular activation-related gene expression and induction of Akt contribute to acquired resistance toward nelarabine in CCRF-CEM cell line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 404 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2021.1992617	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 Nakae Koji, Ooka Tadasuke, Murakami Koichi, Hara-Kudo Yukiko, Imuta Naoko, Gotoh Yasuhiro, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Okamoto Yasuhiro, Nishi Junichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversification of Escherichia albertii H-Antigens and Development of H-Genotyping PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.737979	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 Sakaguchi Hirotooshi, Miyamura Takako, Tomizawa Daisuke, Taga Takashi, Ishida Hiroyuki, Okamoto Yasuhiro, Koh Katsuyoshi, Yokosuka Tomoko, Yoshida Nao, Sato Maho, Noguchi Maiko, Okada Keiko, Hori Tsukasa, Takeuchi Masanobu, Kosaka Yoshiyuki, Inoue Masami, Hashii Yoshiko, Atsuta Yoshiko	4. 巻 56
2. 論文標題 Effect of extramedullary disease on allogeneic hematopoietic cell transplantation for pediatric acute myeloid leukemia: a nationwide retrospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-021-01250-9	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 Okada Satoshi, Miyazono Akinori, Inaba Yasuhiro, Eura Rumiko, Itesako Toshihiko, Kawano Yoshifumi, Okamoto Yasuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy of vesicostomy for refractory metabolic acidosis in persistent cloaca	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-022-00686-2	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 Kume Koji, Ueno Kentaro, Kawamura Junpei, Okamoto Yasuhiro, Kawano Yoshifumi	4. 巻 64
2. 論文標題 Early use of angiotensin converting enzyme inhibitor and blocker attenuated doxorubicin induced cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14880	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 Kawamura Junpei, Ueno Kentaro, Takumi Koji, Yoshiura Takashi, Okamoto Yasuhiro	4. 巻 86
2. 論文標題 Four-Dimensional Flow Magnetic Resonance Imaging in the Evaluation of Intracardiac Oxygenation in an Infant With a Single Ventricle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 166 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-21-0551	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 Abematsu Takanari, Nishikawa Takuro, Shiba Norio, Iijima Yamashita Yuka, Inaba Yasuhiro, Takahashi Yoshihiro, Nakagawa Shunsuke, Kodama Yuichi, Okamoto Yasuhiro, Kawano Yoshifumi	4. 巻 68
2. 論文標題 Pediatric acute myeloid leukemia co-expressing FLT3/ITD and NUP98/NSD1 treated with gilteritinib plus allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.29216	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
研究分担者	児玉 祐一 (Kodama Yuichi) (20535695)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	中川 俊輔 (Nakagawa Shunsuke) (60789973)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教 (17701)	
研究分担者	西川 拓朗 (Nishikawa Takuro) (90535725)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	

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