

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461587

研究課題名(和文) 難治性血管腫・リンパ管腫に対するプロプラノロール療法の確立

研究課題名(英文) Propranolol therapy for intractable hemangioma and lymphangioma

研究代表者

小関 道夫(OZEKI, MICHIO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60444303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プロプラノロールは乳児血管腫に有効な治療法であるが、VEGF測定の有用性はわかっていない。乳児血管腫患者35例に対し、プロプラノロールを投与後、治療前後の血漿VEGF濃度をELISAで測定した。開始時月齢6ヶ月前と6か月後、表在型と腫瘤型、頭部顔面病変とそれ以外の改善度および治療前VEGF値を比較した。また腫瘍の大きさと月齢とVEGF値の相関、治療後のVEGF値の推移も比較した。腫瘍の大きさとVEGF値は有意に相関し、治療4週間後のVEGF値は、治療前の値より有意に低下していた。VEGF値は乳児血管腫の治療経過の予測と治療効果のモニタリングとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Propranolol has recently been shown to be highly effective for infantile hemangiomas (IHs). However, the therapeutic mechanism of action of propranolol and the usefulness of measurement of vascular endothelial growth factor (VEGF) remains poorly understood. This study aimed to determine the efficacy of propranolol treatment on various features and to evaluate changes in plasma VEGF levels in patients with IH who underwent propranolol treatment. The study group consisted of 35 children with IH. Oral propranolol was administered at a dose of 2.0 mg/kg/day and was divided in three doses. Plasma VEGF concentrations were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay, and the values between the groups were compared. VEGF concentrations 4 weeks after treatment were significantly lower than those before treatment ( $p < 0.01$ ). We conclude that measurement of VEGF may be a useful tool for predicting the course of hemangioma and monitoring the effectiveness of treatment.

研究分野：医学

キーワード：小児腫瘍学 血管腫 リンパ管腫 薬物療法

## 1. 研究開始当初の背景

血管腫・リンパ管腫は小児期に頻度の高い良性腫瘍で、顔面や四肢など全身に出現し美容的に問題となる症例が多い。中には眼・鼻・口・気道などを圧迫し致命的となる症例や、四肢の機能障害を起こす場合もあり積極的な治療が必要である。しかし、外科治療を始めとする既存の治療は治癒率が低く、また副作用や合併症も多いため、患者にとっては一生通じて苦悩する厄介な疾患である。

2008年にNew England Journal of Medicineに初めて乳児血管腫に対する新規治療としてプロプラノロールであるプロプラノロールが報告された。使用した全症例に効果を認め、さらに副作用もほとんどないという画期的な治療薬である。以後3年間で100を超す治療報告がなされ、非常に注目されている薬剤である。申請者らは同誌に世界で初めてリンパ管腫症に対する治療例を報告した。(Ozeki M et al. NEJM. 2011)その後、血管腫だけでなく、リンパ管腫に対しても治療効果が得られることが期待され、当院において世界に先駆けて治療研究を進めている。特にリンパ管腫に対してこの治療を行っているのは全国的にも皆無であり、非常にユニークでかつ先進的な治療といえる。しかし、プロプラノロールの血管腫およびリンパ管腫に対する作用機序は解明されておらず、臨床研究のみならず、基礎研究による裏付けが急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、プロプラノロールの血管腫・リンパ管腫に対する臨床応用を確立させることである。すなわち効果、安全性を検証する臨床試験と並行して、有効性に関する「概念の証明(Proof of Concept)」を

確立する基礎研究を行いたい。これらは日本から世界に発信する革新的医療の創生に繋がるトランスレーショナルリサーチである。

## 3. 研究の方法

(1) 血管腫・リンパ管腫患者に対する有効性、安全性の評価

プロトコルに従い、同意の得られた患者に対し治療を行った。24週(6ヶ月)時の有効性をプライマリーエンドポイントとする。評価法は一般的な評価スケール(Visual Analogue Scale (VAS)など)、または腫瘍サイズを画像(エコー、MRI)を用いて、経時的に評価した。有害事象の評価や有害事象については血圧、脈拍、血糖など統計学的な解析を行う。病態に関連するといわれる血漿中VEGF、bFGFなどの血管新生因子の測定を行った。具体的には、4週間毎の外来受診時に採血を行い、血漿を小児科研究室にて凍結保存した。検体はELISAにて血管新生因子を測定した。VEGF(A,C,D)の他、bFGF, Angiopoietin-1,2, MMP2,9などを行った。

(2) プロプラノロールの血管腫・リンパ管腫細胞に対する薬理作用の解析

1. 患者検体より血管腫、リンパ管腫細胞株を樹立

同意の得られた患者で、腫瘍摘出術または腫瘍生検の際に、採取された腫瘍検体を用いた。検体を小児病態学研究室内で専用培地にて無菌的に培養を行った。増殖した細胞は凍結し、研究室の液体窒素室内で保存された。

2. 薬剤添加後の腫瘍細胞の増殖抑制効果(MTTアッセイ法)

血管腫、リンパ管腫細胞株を培養液(10% FCS-RPMI)に浮遊させ、96穴マイクロプレ

ートに1ウエルあたり $2 \times 10^5$ 個の細胞を分注する。プロプラノロール添加後、37 のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2日間培養後、MTTを加え、吸光度を測定し、生存率を評価した。

3. 薬剤添加後のVEGF、bFGFなどの血管増殖因子の発現解析(ウエスタン、PCRなど)プロプラノロール添加後の細胞からウエスタンブロット法とリアルタイムPCRを用い、蛋白発現、mRNA定量解析を行った。VEGF、VEGFR1、VEGFR2、bFGF、HIF- $\alpha$ 、MMP2、MMP9、COX2などを行った。

#### 4. 研究成果

(1)小児血管腫・リンパ管腫に対するプロプラノロール療法の有効性と安全性に関する臨床研究

乳児血管腫患者35例に対し、プロプラノロールを2.0mg/kg/日で投与後、大きさおよび色についてVisual analog scale (VAS)によって経時的に評価した。また治療前後の血漿VEGF濃度をELISAで測定した。各グループ間(開始時月齢6ヶ月前と6ヵ月後、表在型と腫瘤型、頭部顔面病変とそれ以外)のVASの改善度および治療前VEGF値を比較した。また腫瘍の大きさと月齢とVEGF値の相関、治療後のVEGF値の推移も比較した。結果:生後6ヵ月前に開始した患者は生後6ヵ月以降に開始した患者より、VAS改善率が高かった。腫瘍の大きさとVEGF値は有意に相関していたが( $p = 0.002$ )、年齢とは相関していなかった。治療4週間後のVEGF値は、治療前の値より有意に低下していた( $p < 0.01$ )。VEGF値の測定は乳児血管腫の治療経過の予測と治療効果のモニタリングとして有用である可能性が示唆された。

リンパ管腫に関しては、6例、その他の脈管異常に対しては11例に投与し、治療効果および安全性については検討し、学会および文献で症例報告した。

(2)プロプラノロールの血管腫・リンパ管腫細胞に対する薬理作用の解析

患者から得られた樹立培養細胞を用い、プロプラノロールの作用実験を行ったところ、濃度依存性に生存率の低下を認めた。また刺激薬であるイソプロテレノールを添加したところ、生存率は改善し、受容体を介した薬理作用であることが考えられた。また樹立細胞株に薬剤添加したところ、VEGF-A、MMP2、MMP9、COX2のmRNAの発現低下を認めた。

#### 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10件)

1. Ozeki M, Hori T, Kanda K, Kawamoto N, Ibuka T, Miyazaki T, Fukao T. Everolimus for primary intestinal lymphangiectasia with protein-losing enteropathy. *Pediatrics*. 2016 Feb 16. (査読有)

2. Matsumoto H, Ozeki M, Hori T, Kanda K, Kawamoto N, Nagano A, Azuma E, Miyazaki T, Fukao T. Successful Everolimus Treatment of Kaposiform Hemangioendothelioma with Kasabach-Merritt Phenomenon: Clinical Efficacy and Adverse Effects of mTOR Inhibitor Therapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016 Feb 22. (査読有)

3. Ozeki M, Nozawa A, Hori T, Kanda K, Kimura T, Kawamoto N, Fukao T,

Propranolol treatment for infantile hemangioma: Effectiveness and effect on plasma vascular endothelial growth factor. *Pediatric International*. 2016 Mar 15. (査読有)

4. Ozeki M, Fujino A, Matsuoka K, Nosaka S, Kuroda T, Fukao T. Clinical Features and Prognosis of Generalized Lymphatic Anomaly, Kaposiform Lymphangiomatosis and Gorham-Stout Disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Jan 25. (査読有)

5. Nozawa A, Ozeki M, Kuze B, Asano T, Matsuoka K, Fukao T. Gorham-Stout Disease of the Skull Base with Hearing Loss: Dramatic Recovery and Anti-Angiogenic Therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Dec 29 (査読有)

6. Otsuka H, Ozeki M, Kanda K, Hori T, Kawamoto N, Saigo C, Kato H, Makita H, Shibata T, Fukao T. Complete bone regeneration in hemophilic pseudotumor of the mandible. *Pediatr Int*. 2015 Nov 6. (査読有)

7. Yamamoto H, Natsume J, Kidokoro H, Ishihara N, Suzuki M, Tsuji T, Kubota T, Yamada A, Ozeki M, Kato Z, Kawamura Y, Yoshikawa T, Okumura A, Ando N, Saitoh S, Takahashi Y, Watanabe K, Kojima S. Clinical and neuroimaging findings in children with posterior reversible encephalopathy syndrome. *Eur J Paediatr Neurol* 2015; 19(6): 672-678. (査読有)

8. 藤野明浩, 小関道夫, 上野 滋, 岩中 督, 木下義晶, 野坂俊介, 松岡健太郎, 森川康英, 黒田達夫. リンパ管腫とリンパ管腫症・ゴーハム病の成人例の実際. *小児外科* 2015; 47(7): 775-782. (査読無)

9. 小関道夫, 藤野明浩, 松岡健太郎, 野坂

俊介, 深尾敏幸 リンパ管腫症・ゴーハム病. *日本臨床* 2015; 73(10): 1777-1788. (査読無)

10. 小関道夫, 藤野明浩, 黒田達夫, 濱田健一郎, 中村直子, 高橋正貴, 松岡健太郎, 野坂俊介, 深尾敏幸. Lecture リンパ管腫症・ゴーハム病の診断と治療. *臨床整形外科* 2015; (6): 531-539. (査読無)

[学会発表](計 10件)

1. 小関道夫, 堀友博, 神田香織, 川本典生, 折居建治, 松井永子, 加藤善一郎, 深尾敏幸, 中山則之, 大江直行, 矢野大仁, 岩間亨: 抗 VEGF 療法を行った悪性神経膠腫の3例 東京小児がん研究会 (2015.2.7 名古屋大学、愛知県名古屋市)

2. 小関道夫, 神田香織, 堀友博, 川本典生, 深尾敏幸: リンパ管腫症に対するエベロリムス療法、第118回日本小児科学会学術集会 (2015.4.18 大阪国際会議場、大阪府大阪市)

3. 小関道夫, 神田香織, 堀友博, 川本典生, 深尾敏幸: KMP を伴う血管性腫瘍に対する mTOR inhibitor 療法の有効性と安全性、第12回日本血管腫血管奇形学会学術集会 (2015.7.17 中野セントラルパーク、東京都中野区)

4. 小関道夫, 西村沙織, 野澤明史, 神田香織, 堀友博, 川本典生, 加藤善一郎, 深尾敏幸, 藤野明浩, 黒田達夫, 松岡健太郎, 野坂俊介: Kaposiform Lymphangiomatosis に合併した凝固異常について、岐阜血友病研究会 (2015.9.4 ホテルリソル岐阜、岐阜県岐阜市)

5. 小関道夫, 神田香織, 堀友博, 川本典生, 深尾敏幸: The efficacy of mTOR inhibitor for Kasabach Merritt Phenomenon, 第77回日本血液学会学術集会 (2015.10.16 石川県立音楽堂等、石川県金沢市)

6. Ozeki M, Nozawa A, Hori T, Kanda K, Kawamoto N, Fukao T. Clinical efficacy of mammalian target of rapamycin inhibitor for kaposiform hemangioendothelioma with Kasabach-Merritt phenomenon. 第57回小児血液がん学会 (2015.11.27 甲府富士屋ホテル、山梨県甲府市)
7. 小関道夫、野澤明史、神田香織、堀友博、川本典生、前川貴伸、藤野明浩、深尾敏幸：リンパ管腫(リンパ管奇形)とリンパ管腫症に対する新しい薬物療法(シンポジウム) 第31回日本小児外科学会秋季シンポジウム (2015.10.31 くまもと県民交流館パレア鶴屋ホール、熊本県熊本市)
8. 小関道夫:小児リンパ管疾患の最近の話題について(講演) 第3回京都岐阜小児外科カンファレンス (2015.4.24 岐阜大学、岐阜県岐阜市)
9. 小関道夫、神田香織、堀友博、川本典生、深尾敏幸：リ小児がんに関わる生命倫理について(講演)、中部生命倫理研究会 (2015.4.11 じゅうろくプラザ、岐阜県岐阜市)
10. 小関道夫、野澤明史、神田香織、堀友博、川本典生、深尾敏幸：頭頸部の複雑型脈管異常に対する新しい薬物療法の選択肢(講演) 第60回日本口腔外科学会総会・学術集会 (2015.10.18 名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小関 道夫(OZEKI MICHIO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60444303

### (2)研究分担者 なし