

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861487

研究課題名(和文) 遺伝子発現プロファイルより導かれたリンパ管腫関連遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) The Gene Function Analysis Using the Lymphangioma Cell Line

研究代表者

加藤 源俊 (Kato, Motoyoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20573463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：当研究の目的は、リンパ管腫発症のメカニズムの解明、それに応じた新規治療法の開拓であった。リンパ管腫由来細胞培養法の確立、その解析から得られた異常発現遺伝子を疾患関連候補遺伝子として解析を行った。

近年、リンパ管腫に対して漢方薬(越婢加朮湯、黄耆建中湯)の内服により病変の縮小を示した、との報告が増えており、新規の治療として期待される。同漢方薬、構成生薬がリンパ管腫由来細胞に与える影響を検討した結果、リンパ管腫内皮細胞の増殖抑制、遊走能の阻害、管腔形成阻害、リンパ管腫内皮細胞の透過性を亢進させる効果がみられた。in vitroの実験結果からはリンパ管腫病変の縮小と関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study were the elucidation of the mechanism for the pathogenesis of lymphangioma, the exploration of seeds for new therapeutic methods for the disease. In this study, we established technique to make primary culture cells derived from lymphangioma lesions. And, we analyzed abnormally expressed genes, which we obtained from previous analysis of the cell, as a lymphangioma-related gene.

Recently, two Kampo medicines were reported to be effective for Lymphangiomoma. We examined these drugs' direct effect on Lymphangioma derived cell. We co-cultured Lymphangioma cells with Kampo medicines and their crude drugs. They reduced proliferation rate, cell migration, and tube formation. Then, permeability of the cell sheet was increased. Our basic study supported that Kampo medicine could be a therapeutic option for lymphangioma.

研究分野：小児外科

キーワード：リンパ管腫 リンパ管奇形 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

リンパ管腫は主に小児（多くは先天性）に発生する腫瘍性病変で、リンパ管内皮に覆われた大小の嚢胞を含むことが特徴である（図1）。悪性腫瘍ではないものの、正常組織内に網目状に広がる性質を有しており、頭頸部に好発し、奇異な外観を呈し、咽喉頭部で気道狭窄を生じることが多い

（Fujino et al. J Pediatr Surg. 2003）。外科的切除は神経、血管、筋群を損ない機能的及び美容的犠牲を伴うため積極的には選択できないことが多い。四肢体幹の体表に限局した小病変もあるが、新生児期から気道周辺の病変による気道狭窄にて死亡したり、気道確保のため長期挿管もしくは気管切開を余儀なくされている患儿が後を絶たない（図2）。

細胞生物学的には悪性腫瘍の分類に入らない疾患であるが、当事者である患者及び医療従事者は臨床的に「悪性」と考えざるを得ない。世界的にもリンパ管腫の研究報告はきわめて少なく、生物学的・病態発生学的な検討は十分なされておらず、リンパ管自体の基礎的研究も血管と比較して大きく遅れていたことより、いまだ病変の生物学的特性に基づいた良い治療法はない。

リンパ管腫は臨床的に強い増殖性を示す例は稀であるため、抗癌剤等の細胞毒の有効性は低いと考えられる。現在の主な治療は、本邦では溶血性連鎖球菌の菌体成分を製品化したOK432のリンパ管嚢胞内への局注により炎症を惹起し、内皮細胞への細胞障害を誘導して腫瘍全体の体積を縮小する、という硬化療法が行われている（Fujino et al. J Pediatr Surg. 2003）。しかしながら、生物由来成分を用いていること、強い炎症を起こし、患者への負担も無視できないこと、また嚢胞のサイズにより治療効果が得られない

ことなどより、世界的に生物学的特性を考慮した治療法の開発が待たれている。

また、近年、リンパ管腫に対して特定の漢方薬の内服により病変の縮小を示した、との報告が増えている。これらの漢方薬の作用機序は未知な部分が多いが、新規の治療として期待される部分大きい。

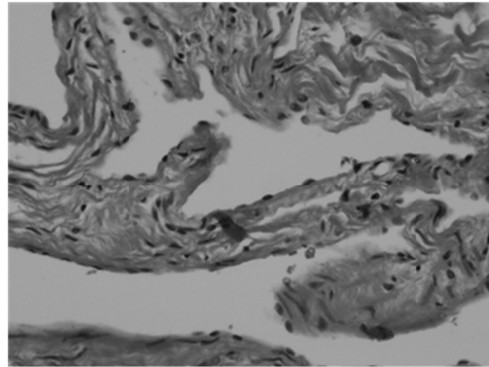


図1 リンパ管腫組織像



図2 頸部リンパ管腫（新生児）

2. 研究の目的

Fujinoらが確立したリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株（HL-LEC）は、NOGマウスへの移植によりリンパ管腫様組織を形成することが確認され、リンパ管内皮細胞自体の異常が疾患の原因として疑われた。HL-LECから得られた疾患候補遺伝子の機能解析を目的とした。

また、リンパ管腫に対する新たな治療戦略として、漢方薬（越婢加朮湯、黄耆建中湯）が注目されている。これらの漢方薬および構

成生薬が HL-LEC に与える影響を検討し、その作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) リンパ管腫患者由来リンパ管内皮細胞株 (Human lymphangioma-derived lymphatic endothelial cells, HL-LECs) の樹立

研究協力者の Fujino らは 2001 年より、リンパ管腫の生物学的特性を解析するために、リンパ管腫患者のリンパ管腫由来内皮細胞 (Human lymphangioma-derived lymphatic endothelial cells, HL-LECs) の細胞株を樹立した。その解析の結果、PI3K/AKT シグナル伝達系の関与を認めている (Fujino et al, Deve Biol 2009, Development 2006, PNAS 2008)。また樹立した HL-LEC を重症複合免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下及び筋内へ移植すると、ヒトリンパ管腫に酷似した HL-LEC よりなるリンパ嚢胞を形成することが、樹立株全てにおいて確認された。すなわちリンパ管腫の病因の中心にリンパ管内皮細胞の異常があることが示唆されたと考えられる。

Fujino らは、手術時の切除検体からリンパ管内皮細胞を単離する方法を確立しており、同様の手法により、研究期間内に新たな HL-LEC の樹立を行った。

(2) HL-LEC における異常発現遺伝子の確認

樹立した HL-LEC 株とヒト正常リンパ管内皮細胞株から、リンパ管腫由来細胞に異常発現遺伝子が複数列挙された (投稿中)。これらは HL-LEC に共通な異常としてリンパ管腫と非常に関連が深い可能性があり、疾患関連候補遺伝子と考えられる。

これらの遺伝子については細胞株にて RT-PCR による発現の確認を行った。

(3) 異常発現遺伝子の機能解析

正常 LEC と HL-LEC の遺伝子発現の相違が明らかにされた遺伝子については、遺伝子の性質上疾患との関連が強く疑われる遺伝子から順に機能解析を行った。具体的には異常発現遺伝子については HL-LEC 及びその不死化細胞において、siRNA による遺伝子ノックダウンモデルを作成、一方正常 LEC に対して同遺伝子導入による過剰発現モデルを作成した。

上記モデルを用いて、遺伝子導入または抑制による遺伝子の関与を検討した。具体的手法としては、増殖能や遊走能の検討、管状構造形成アッセイを行った。

(4) リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞に対する漢方薬及び各生薬の影響の検討

漢方薬および各構成生薬が HL-LEC に対して及ぼす影響に関して、機能解析を行った。具体的には HL-LEC の培地に漢方薬を一定の濃度で加え、増殖能や遊走能の検討、管状構造形成アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) リンパ管腫患者由来リンパ管内皮細胞株 (Human lymphangioma-derived lymphatic endothelial cells, HL-LECs) の樹立

リンパ管腫手術時の切除検体からリンパ管内皮細胞の単離を行い、研究期間内に HL-LEC の樹立を新たに 6 株行った。その他に、Gorham-Stout 病、リンパ管腫症の手術検体に関してもリンパ管内皮細胞の単離を行った。

(2) HL-LEC における異常発現遺伝子の確認

リンパ管腫関連遺伝子と考えられた複数の遺伝子に関し、RT-PCR による発現の確認を行った。その結果、HL-LEC では、

リンパ管腫関連遺伝子と考えられた複数の遺伝子の発現を確認した（論文作成中）。

（3）異常発現遺伝子の機能解析

正常 LEC と HL-LEC の遺伝子発現の相違が明らかにされた遺伝子の内、異常発現遺伝子について HL-LEC 及びその不死化細胞を用いて、siRNA による遺伝子ノックダウンモデルを作成、一方正常 LEC に対して同遺伝子導入による過剰発現モデルを作成した。

（4）リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞に対する漢方薬及び各生薬の影響の検討

越婢加朮湯、黄耆建中湯、構成生薬であるカンゾウ、マオウ、ソウジュツ、オウギに関し増殖性、細胞走化性、管腔形成能、内皮透過性に関して検討を行った。それぞれの漢方煎じ薬は Filter を通し、多糖類やタンニンなどを除去し、低分子のみを残す形とした。

結果では、越婢加朮湯、黄耆建中湯にはリンパ管内皮細胞の増殖抑制、遊走能の障害、管腔形成を障害、越婢加朮湯、黄耆建中湯には低濃度でリンパ管腫内皮細胞の透過性を亢進させる効果がみられた。invitro の実験結果からはリンパ管腫病変の縮小と関連する可能性が示唆された（論文作成中）。

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 1 件）

（1）加藤 源俊、藤野 明浩、リンパ管疾患に対する基礎研究、小児外科、査読無、Vol.48、No.12、2016、pp1241-1246、6 頁

〔学会発表〕（計 4 件）

（1）加藤 源俊、リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞に対する漢方薬及び各生薬の影響の検討、第 31 回日本小児外科 秋季シンポジウ

ム、2015 年 10 月 31 日、熊本県民交流館 パレア・鶴屋ホール（熊本県熊本市）

（2）加藤 源俊、リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞に対する漢方薬の影響の検討、第 12 回日本血管腫血管奇形学術集会、2015 年 7 月 18 日、中野セントラルパーク コングレスクエア（東京都中野区）

（3）Mototoshi Kato, A PRELIMINARY STUDY OF THE EFFECT OF KAMPO MEDICINE ON THE HUMAN LYMPHANGIOMA DERIVED LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS、THE 16th European Congress of Paediatric Surgery、20 Jun. 2015、Ljubljana(Slovenia)

（4）加藤 源俊、リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞に対する漢方薬の影響の検討、第 52 回日本小児外科学会学術集会、2015 年 5 月 28 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

6．研究組織

（1）研究代表者

加藤 源俊（KATO, Mototoshi）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20573463

（2）研究協力者

藤野 明浩（Fujino, Akihiro）