

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10928

研究課題名(和文) ヒト及びマウスリンパ管腫モデル動物の生物学的特性解析及び病態発生機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of biological characteristics and pathogenesis of human and mouse lymphangioma animal models

研究代表者

藤野 明浩 (Fujino, Akihiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器・運動器病態外科部・診療部長

研究者番号：50306726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：重症・難治性のリンパ管腫(リンパ奇形)は有効な治療法がなく、患者QOL改善のため世界中で新たな治療法開発が待たれている。我々はリンパ管腫切除組織より確立したリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株をマウスへ移植することによりヒトリンパ管腫モデル動物を得た。一方、ゼラチンを用いた *in vitro* の3Dリンパ管(リンパ管腫)モデルの最適化を検討し、それらを用いていくつかの薬剤の効果及び疾患関連遺伝子の機能を検討した。特に治療に用いられているOK-432のリンパ管内皮細胞への直接的な影響を検討し、内皮細胞による取り込み、遺伝子発現プロファイルを検討している。これらの成果は現在まとめを行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症・難治性のリンパ管腫(リンパ奇形)は有効な治療法がなく、患者QOL改善のため世界中で新たな治療法開発が待たれている。治験が始まっている内服薬mTOR阻害剤はあるが、根治を得るものではなく、引き続き基礎的研究を進めねばならない。この研究におけるモデル動物および *in vitro* モデルの確立により新たな治療薬、治療法の検討が可能となる。現在、平行して行われているリンパ管腫特異的発現遺伝子の意義を確定し、標的を絞った上でモデル動物および *in vitro* モデルで検討する。他に遺伝子変異に関する研究が海外でなされており、その情報も合わせて検討することで最終的に大きな成果が期待される。

研究成果の概要(英文)：There is no effective treatment for severe / refractory lymphangioma (cystic lymph malformation), and development of new treatments is awaited around the world for improving patient QOL. We obtained a human lymphangioma model animal by transplanting a lymphangioma-derived lymphatic endothelial cell line established from human lymphangioma tissue into mice. On the other hand, optimization of *in vitro* 3D lymphatic vessel (lymphangioma) model using gelatin was examined, and effects of several drugs and functions of disease related genes were examined using them. In particular, we have examined the direct effects of OK-432 on lymphatic endothelial cells, which are used in therapy, and are examining endothelial cell uptake and gene expression profiles. These results are currently under summarizing.

研究分野：小児外科学、リンパ管学

キーワード：リンパ管疾患 リンパ管奇形 リンパ管腫 モデル動物 遺伝子導入 不死化細胞 前臨床試験 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

重症・難治性のリンパ管腫(リンパ奇形)は有効な治療法がなく、患者 QOL 改善のため世界中で新たな治療法開発が待たれている。我々はリンパ管腫切除組織より確立したリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株をマウスへ移植することによりヒトリンパ管腫モデル動物を得たが、これを元に既存のマウス de novo リンパ管腫モデルの生物学的特性を検討し、ヒトリンパ管腫発生の機序の解明及び新規治療への応用を模索する。既にヒトリンパ管腫由来細胞株の遺伝子発現プロファイル解析にて発見された遺伝子異常につき、両モデル動物を用いてその意義を検討する。先行研究で得られた疾患特異的材料の応用研究であり確実に展開する。



図 1, 重症頸部リンパ管腫

2. 研究の目的

先行研究で得られた疾患特異的材料および新規材料を用いて以下の研究を進める。1、リンパ管腫モデル動物を用いた各種薬剤効果の検討  
2、invitro リンパ管腫モデルにおけるリンパ管形成能の検討  
3、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) の収集



図 2, 病理組織像 D2-40

1は確立したモデルを用いて治療に役立てるための重要な研究であり、結果を積み重ねていく。2はまだ検討が十分とは言えないが、各種の実験を繰り返しつつ、モデルとして最適化していく。その中でリンパ管腫の嚢胞形成機序に迫りたい。3細胞株はがん細胞ではなく有限であるので、貴重な臨床検体からの株樹立を引き続き行っていく。以上のことを最終年度に行っていく予定である。4は遺伝子発現プロファイルを得ることができたので、細胞内での変化をまとめる

3. 研究の方法

これまでの成果をふまえて以下の研究を進めた。

(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) の収集 (研究代表者、研究分担者)

現在までにリンパ管腫由来内皮細胞 10 株以上及び不死化細胞株 1 株の樹立に成功し解析をしているが、各種リンパ管腫由来 HL-LEC の共通性質を探るため、研究期間内には継続的にリンパ管腫切除による新たな組織検体に対しては HL-LEC の樹立を試み、10 株以上を目標にデータを蓄積する。得られた検体から細胞を単離する方法は確立している。検体採取をおこなう共同研究機関は図 4 の如く組織されており、引き続き協力を得る。各施設の倫理審査委員会にて既に研究計画の承認が得られている。

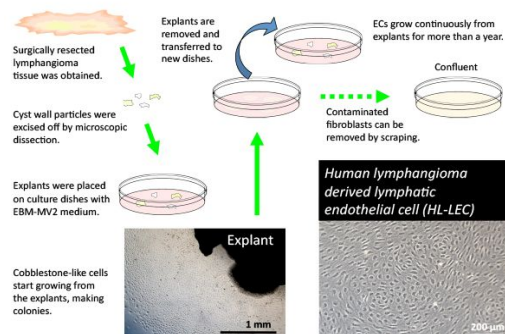


図 3 HL-LEC の樹

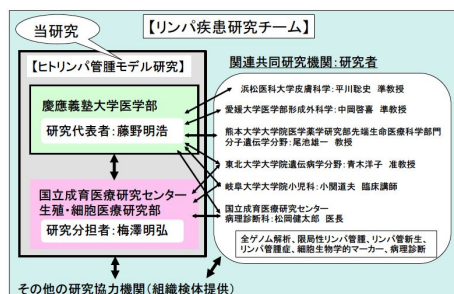
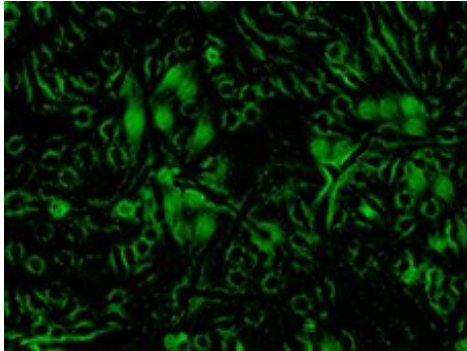


図 4

(2) ヒトリンパ管腫モデル動物の確立 (研究代表者、研究分担者)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

蛍光標識不死化 LEC の検討: 重症複合免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下及び筋肉内へ HL-LEC を移植すると、顕微鏡的にヒトリンパ管腫と同様のリンパ嚢胞を形成することは、現在までに確認されたが、外観上明らかな大きさの腫瘍を形成するとはなかった。外観上明らかでない腫瘍病変では可視化が問題となり治療効果判定などに動物モデルとして用いることは困難である。そのためこれまでの研究にて不死化した 1m-HL-LEC に蛍光蛋白発現 vector 導入し、*in vitro* における HL-LEC の標識を試み成功した (図 5)。標識した HL-LEC を移植する実験を行い、移植後 2、4 週間での病変形成は確認されているが、さらに長期間もしくは短期期間の観察期間において病変の広がりや腫瘍形成の有無、変化を観察、分析する。数を重ね、安定した数 mm 大の組織を得るための標準的手法を確立する。一定の大きさを確保できるようになれば治療薬の検討等に用いることが出来るようになるが、移植後のその最適期間を決定する



**(3) 3D *in vitro* リンパ管腫モデルの検討** (研究代表者、研究分担者): リンパ管内皮細胞を様々な細胞外基質内で立体的に培養し、リンパ管組織を形成させる条件を検討した。形成された組織は免疫染色等によりリンパ管としての性質を保持していることを確認する。またそのモデルの最適化を検討し、いくつかの薬剤の効果及び疾患関連遺伝子の機能を確認する。

図 5, 蛍光導入 HL-LEC

で

**(4) OK-432 の HL-LEC への影響の検討** (研究代表者、研究分担者): 現在唯一の保険適用約として硬化療法治療に用いられている OK-432 はその作用発現機序が明らかでない。ここではリンパ管腫内皮細胞への直接的な影響の把握を目的として、内皮細胞による取り込み、遺伝子発現プロファイル作成を行い、薬剤効果発現機序を検討した。

#### 4. 研究成果

現時点までに以下の成果を得た。

**(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) の収集:** 手術による切除検体から新たに 6 株の初代培養細胞株を得た。

**(2) ヒトリンパ管腫モデル動物の確立:** Host として NOG マウスが適当であることを確認した。NOG マウス内に図 6 のようにリンパ管腫様病変が形成されることが確認された。また移植細胞への遺伝子導入による蛍光標識により病変の可視化・定量化を可能とした (図 7)



図 6

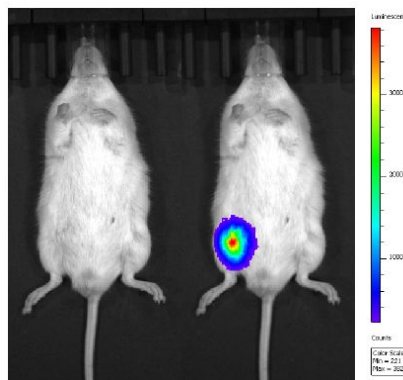


図 7

**(3) 3D *in vitro* リンパ管腫モデルの検討:** ゼラチンを用いた *in vitro* の 3D リンパ管 (リンパ管腫) モデルの最適化を検討し、安定してリンパ管腫様組織を作成することが確認された (図 8)。さらにいくつかの薬剤の効果及び疾患関連遺伝子の機能を確認した。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

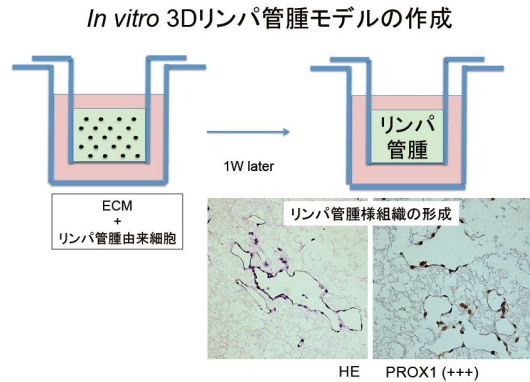


図 8

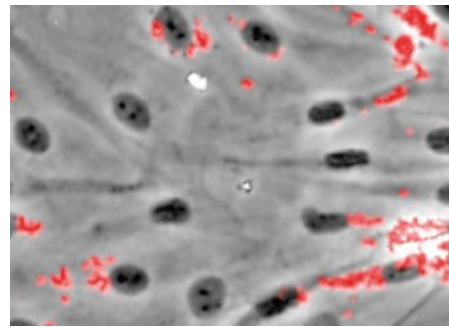


図 9

**(4) OK-432 の HL-LEC への影響の検討**: 現在治療に用いられている OK-432 のリンパ管内皮細胞への直接的な影響を検討し、内皮細胞による取り込み(図 9)、遺伝子発現プロファイルを検討した。

これらはいずれもまとめて論文化は済んでいないが、論文化とともに順次終了していく見込みである。

## 5. 主な発表論文等

雑誌論文](計 19 件、以下抜粋)

Ueno S, Fujino A, Morikawa Y, Iwanaka T, Kinoshita Y, Ozeki M, Nosaka S, Matsuoka K, Usui N. Indication for tracheostomy in children with head and neck lymphatic malformation –analysis of nationwide survey in Japan. *Surg Today*, 査読有, vol2, 2019,410-419, DOI: 10.1007/s00595-018-1755-3.

Ozeki M, Asada R, Saito AM, Hashimoto H, Fujimura T, Kuroda T, Ueno S, Watanabe S, Nosaka S, Miyasaka M, Umezawa A, Matsuoka K, Maekawa T, Yamada Y, Fujino A, Hirakawa S, Furukawa T, Tajiri T, Kinoshita Y, Souzaki R, Fukao T. Efficacy and safety of sirolimus treatment for intractable lymphatic anomalies: A study protocol for an open-label, single-arm, multicenter, prospective study (SILA). *Regen Ther*. 査読有, 2019, 84-91, DOI: 10.1016/j.reth.2018.12.001.

Ueno S, Fujino A, Morikawa Y, Iwanaka T, Kinoshita Y, Ozeki M, Nosaka S, Matsuoka K, Usui N. Treatment of mediastinal lymphatic malformation in children: an analysis of a nationwide survey in Japan. *Surg Today*. 査読有, 2018, vol48, 716-725, DOI:10.1007/s00595-018-1640-0

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. 査読有, *Pediatr Blood Cancer*. 2016, vol.63, 2016, 832-838

[学会発表](計 35 件、以下抜粋)

藤野明浩、リンパ管腫・リンパ管拡張症・原発性リンパ浮腫、第 3 回小児リンパ管疾患シンポジウム、2018

藤野明浩、嚢胞性リンパ管奇形の診断と治療、第 10 回日本血管腫血管奇形講習会、2018

藤野明浩、後藤倫子、小川雄大、沓掛真衣、朝長高太郎、大野通暢、渡邊稔彦、田原和典、菱木知郎、金森豊、画像検査で正診に至らなかった急性発症の小児腹腔内リンパ管腫 3 例の検討、第 32 回日本小児救急医学会学術集会、2018

藤野明浩、リンパ管腫症・ゴーラム病について、第 117 回日本皮膚科学会総会、2018

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

藤野明浩、金森豊、菱木知郎、瀧本康史、黒田達夫、リンパ管腫(リンパ管奇形)に対する外科的治療戦略、第79回日本臨床外科学会総会、2017

藤野明浩、小川雄大、朝長高太郎、田原和典、後藤倫子、沓掛真衣、大野通暢、渡邊稔彦、金森豊、菱木知郎、当院におけるリンパ管腫(リンパ管奇形)、Klippel-Trenaunay症候群の四肢皮下病変に対する減量手術の検討、第28回日本小児外科QOL研究会、2017

藤野明浩、小川雄大、朝長高太郎、野村美緒子、竹添豊志子、大野通暢、渡邊稔彦、田原和典、菱木知郎、金森豊、杉林里佳、左合治彦、出生前診断されたリンパ管腫(リンパ管奇形)症例における発見時在胎週数と予後の検討、第53回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会、2017

藤野明浩、小川雄大、朝長高太郎、野村美緒子、竹添豊志子、大野通暢、渡邊稔彦、田原和典、菱木知郎、金森豊、松本正太郎、西村奈穂 上気道閉塞をきたす救急疾患に対する治療 当院における急性上気道閉塞をきたした頸部リンパ管腫(リンパ管奇形)に対する治療の検討、第31回日本小児救急医学会学術集会、2017

藤野明浩、上野滋、岩中督、木下義晶、小関道夫、松岡健太郎、野坂俊介、森川康英、黒田達夫、リンパ管腫(嚢胞性リンパ管奇形)における自然退縮-厚労科研難治性疾患等政策研究事業による全国症例調査より-、第117回日本外科学会定期学術集会、2017

藤野明浩、リンパ管腫(リンパ管奇形)研究進捗状況、第2回小児リンパ管疾患シンポジウム、2016

藤野明浩、高橋正貴、リンパ管腫(嚢胞性リンパ管奇形)の細胞生物学的検討、第2回小児リンパ管疾患シンポジウム、2016

藤野明浩、中原理紀、清水隆弘、藤村匠、阿部陽友、森禎三郎、高橋信博、石濱秀雄、山田洋平、下島直樹、星野健、黒田達夫、胎児水腫からリンパ浮腫へ移行したリンパ管形成不全の1例(リンパ管シンチグラフィ所見からの考察)、第16回小児核医学研究会、2016

藤野明浩、清水隆弘、阿部陽友、森禎三郎、高橋信博、石濱秀雄、藤村匠、山田洋平、下島直樹、星野健、黒田達夫、当院におけるリンパ管腫(リンパ管奇形)に対するプレオマイシン局注硬化療法の検討、第53回日本小児外科学会学術集会、2016

藤野明浩、Arhans C. Ismael、加藤源俊、藤村匠、森定徹、平川聡史、梅澤明弘、黒田達夫、リンパ管腫(一般型・嚢胞状リンパ管奇形)前臨床試験モデルの作成、第13回日本血管腫血管奇形学会学術集会、2016

藤野明浩、清水隆弘、阿部陽友、森禎三郎、高橋信博、石濱秀雄、藤村匠、山田洋平、下島直樹、星野健、黒田達夫、難治性リンパ管腫(特に海綿状)に対するプレオマイシン局注療法の実際、第13回日本血管腫血管奇形学会学術集会、2016

藤野明浩、リンパ管奇形の診断と治療、第8回日本血管腫血管奇形講習会、2016

Akihiro Fujino, From clinical to basic biological study: a strategic approach to new treatment of lymphangioma. 68th Annual Congress of Korean Surgical Society (KSS 2016) 2016

藤野明浩、リンパ管腫(嚢胞性リンパ管奇形)の治療標準化について、第31回日本小児外科学会秋季シンポジウム、2015

藤野明浩、難治性リンパ管疾患の実態、第12回日本血管腫血管奇形学会学術集会、2015

藤野明浩、リンパ管腫(嚢胞性リンパ管奇形): 周産期の諸問題、第51回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会、2015

- ⑳ Kato M, Fujino A, Morisada T, Takahashi N, Kano M, Fujimura T, Ymada Y, Hoshino K, Kuroda T, A preliminary study of the effect of kampo medicine on the human lymphoma derived lymphatic endothelial cells. EUPSA 2015(European Pediatric Surgical Association, Annual Meeting), 2015

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：梅澤 明弘

ローマ字氏名：UMEZAWA, AKIHIRO

所属研究機関名：国立成育医療研究センター

部局名：再生医療センター

職名：副所長/再生医療センター長

研究者番号(8桁): 70213486

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：高橋正貴

ローマ字氏名：Takahashi, Masataka

研究協力者氏名：鈴木絵李加

ローマ字氏名：Suzuki, Erika

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、研究者個人に帰属されます。