

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20304

研究課題名(和文)リンパ管腫のリンパ管内皮細胞内の生存シグナル阻害を応用した新規治療の開発

研究課題名(英文)To develop a novel treatment against lymphangioma applying signaling pathway for proliferation and survival of lymphatic endothelial cell

研究代表者

高橋 正貴 (TAKAHASHI, MASATAKA)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：10626766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前からヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞HL-LECの培養法を確立し、20株以上の細胞株を樹立してきた。HL-LECの解析、不死化細胞株の樹立、モデルマウスの作成を行ってきた。リンパ管腫に対して使用されている薬剤の有効性を確認した。OK-432とブレオマイシンは濃度依存性に殺細胞効果を有し、ED-50を明らかにした。OK-432の作用機序は不詳であったが、マイクロアレイによる解析からは、アポトーシスを誘導することがわかり、蛋白レベルで証明した。また、mTOR経路の阻害剤であるラパマイシンは一定以上の濃度で細胞増殖抑制効果を示すが、殺細胞効果を示さない可能性がある事がわかった。

研究成果の概要(英文)：Lymphangioma is still a difficult disease to obtain satisfactory results. Surgical resection or sclerotherapy is the first choice for treatment. OK-432 and bleomycin have been used for sclerotherapy, and rapamycin for systemic therapy. OK-432 is well known to be one of the first line drugs for sclerotherapy, although it is not available in every country. Some cases are very effective to use OK-432. Although mechanism of action is unclear. We established a method to obtain primary culture of human lymphangioma derived lymphatic endothelial cell (HL-LEC) from surgically resected tissue. It became a very good material for studying lymphangioma. The purpose of this study is to understand mechanism of several drug's, especially OK432's, direct action against lymphangioma using HL-LEC in a condition without immune reaction. HL-LEC incorporates OK-432 and then dies. OK-432 particle remained after cell death. Microarray analysis showed OK-432 induced apoptosis for HL-LEC.

研究分野：小児外科

キーワード：リンパ管腫 リンパ管奇形 OK-432 ブレオマイシン ラパマイシン

1. 研究開始当初の背景

難治性リンパ管腫は細胞生物学的には良性疾患ではあるが、治療法がない。外観上の問題、機能的な影響、繰り返す出血と炎症により、QOLを著しく低下させるため、臨床的には「悪性」の経過をたどる。しかし、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・病態発生的な検討は十分なされておらず、基礎的研究による生物学的特性に基づいた良い治療法がない。

2. 研究の目的

リンパ管腫は臨床的に強い増殖性を示す例は稀であり、抗癌剤等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OK-432のリンパ管嚢胞内への局注による硬化療法が行われている。重症・難治性のリンパ管腫は良性疾患とされるが、リンパ管腫に対する現行の治療法は、作用機序が分かっておらず、また有効例と無効例があり、未だ確立されていない。本研究ではリンパ管腫由来内皮細胞株(HL-LECs)に対して臨床で用いられている薬剤(OK432、bleomycin、Rapamycin、etc)の作用機序を明らかにする。各種薬剤の有効性を検討し、作用機序を明らかにすることで、有効な治療法が確立できる可能性があると考えた。

3. 研究の方法

(1) ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株における各種薬剤の有効性の検討

我々は現在までにリンパ管腫由来内皮細胞株(HL-LEC) (N>10)及び不死化細胞株を樹立しており、利用可能である。現在までに得られたHL-LECに対して各種薬剤を加えた効果をin vitroで生物学的に比較検討する。また、薬剤としては、現在本邦の第一選択であるOK-432、欧米で頻用されているBleomycin、近年注目されているRapamycinの検討を行った。

HL-LECに各薬剤を投与し、HL-LECの形態変化、増殖抑制を、細胞数計測、免疫染色等で検討した。

(2) ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株における有効な薬剤の作用機序の検討

特に本邦での第一選択であるOK-432は有効例と無効例があり、その作用機序は不明である。これを明らかにすべく、HL-LECに細胞死を誘導するメカニズムを、免疫染色、アポトーシスアッセイ、ウェスタンブロット、microarray等の手法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株における各種薬剤の有効性の検討

OK-432とbleomycinはin vitroでHL-LECに直接作用して濃度依存性に生細胞数を減少させた。Rapamycinも同様に生細胞数を減少させたが(図1)。

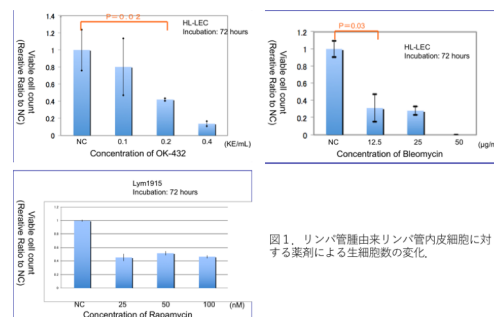


図1. リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞に対する薬剤による生細胞数の変化。

形態学的にはOK-432とbleomycinは形態学的変化を認め、細胞障害作用を起こしていた。Rapamycinは形態学的な変化は認めず、増殖を抑制するのみであると考えた。

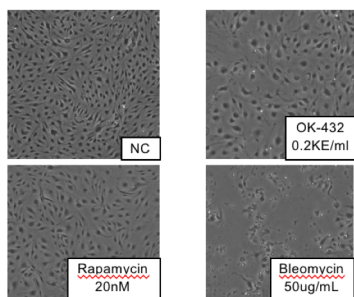


図2. 薬剤添加後のリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞の形態学的変化。

(2) ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株における有効な薬剤の作用機序の検討

OK-432の作用機序についてより詳細に検討した結果、免疫染色ではOK-432がendocytosisによりリンパ管内皮細胞の細胞質に取り込まれ(図3)、細胞死を誘導し、その後も細胞内にとどまることを確認した。

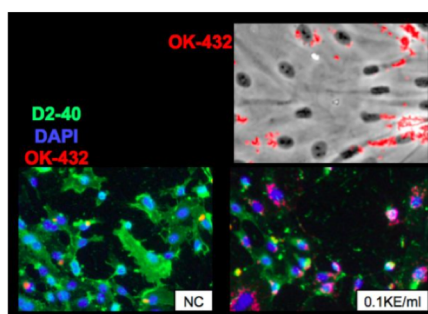


図3. OK-432は細胞質へ取り込まれて核周辺に局在する。

どのようなメカニズムで細胞死を誘導するのかを Microarray で解析した結果、アポトーシス関連のパスウェイが検出された。

すなわち、局所的に投与された OK-432 はリンパ流に乗って病変全体へ行きわたり、停留し、エンドサイトーシスによって病変部リンパ管内皮細胞に取り込まれてアポトーシスを誘導するのである。HL-LEC の OK-432 によるアポトーシスの誘導を定量的、定型的に証明しているところである。

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3件)

- 1) 高橋正貴, 藤野明浩, 小関道夫, 渡邊稔彦, 前川貴伸, 松岡健太郎, 野坂俊介, 黒田達夫, 瀧本康史, 金森豊: 難治性胸水の外科治療. 小児外科 2016; 48(9):933-937.
- 2) 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; 50(6):531-539.
- 3) 高橋正貴, 藤野明浩, 小関道夫, 渡邊稔彦, 前川貴伸, 松岡健太郎, 野坂俊介, 黒田達夫, 瀧本康史, 金森豊: 難治性胸水の外科治療. 小児外科 2016; 48(9):933-937.
- 4) Shirota C, Hinoki A, Takahashi M, Tanaka Y, Tainaka T, Sumida W, Murase N, Oshima K, Shiotsuki R, Chiba K, Morimoto Y, Uchida H. New Navigation Surgery for Resection of Lymphatic Malformations Using Indocyanine Green Fluorescence Imaging. Am J Case Rep 2017;18:529-31.

[学会発表] (計 2件)

- ① 高橋正貴, 藤野明浩, 前川貴伸, 松岡健太郎, 野坂俊介, 小関道夫, 田原和典, 渡邊稔彦, 大野通暢, 竹添豊志子, 黒田達夫, 瀧本康史, 金森 豊: 難治性胸腹水を呈するリンパ管関連疾患の外科的治療. 日本小児外科学会雑誌 2015, 51 (6): 991.
- ② 高橋正貴, 出家亨一, 杉山正彦, 新井真理, 石丸哲也, 佐藤かおり, 魚谷千都絵, 高見尚平, 藤代 準, 岩中 督: リンパ管腫の至適治療時期の検討. 日本小児外科学会雑誌 2015, 51 (6): 999-1000.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 正貴 (TAKAHASHI MASATAKA)

独立行政法人国立成育医療研究センター

細胞医療研究部 リサーチアソシエート

研究者番号：10626766