

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15079

研究課題名(和文) 難治性リンパ管異常における薬物治療効果予測因子の確立

研究課題名(英文) Analysis of mTOR Pathway Expression in Lymphatic malformation and Related diseases

研究代表者

堀 由美子 (Hori, Yumiko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60528785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管異常は、リンパ奇形、カボジ型リンパ管腫症、カボジ型血管内皮腫を含む希少疾患群である。巨大病変や顔面の病変は外科的切除が困難であり、QOLを著しく低下させる。この疾患群は変異遺伝子や生物学的態度が異なるにもかかわらず、mTOR経路の阻害薬であるシロリムスが著効し、mTORとその下流の4EBP1、S6K1はリンパ管異常の病因に重要と考えられている。

本研究ではリンパ管異常におけるmTOR経路の発現パターンを初めて明らかとした。正常リンパ管と比較し、リンパ管異常ではp-4EBP1とp-mTORが高発現していた。mTOR経路の発現分析はリンパ管異常の予後予測につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性リンパ管異常に対してmTOR阻害剤であるシロリムスが著効した例があり、本邦でも薬事承認を目指した第Ⅲ相医師主導治験が行われたが、どのような機序で治療効果が得られるのか、またどのような症例において治療効果が得られやすいのかなど、詳細は明らかになっていない。

本研究では、シロリムス治療が行われた症例の組織検体を使用して、mTOR関連タンパクの免疫染色を行った。この検討の結果、シロリムスの治療効果に関与する因子が明らかとなり、免疫染色による簡便な治療効果予測につながる。

研究成果の概要(英文)：The mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor sirolimus is an effective treatment for difficult-to-treat lymphatic anomalies. However, little is known about the expression of mTOR pathway components in lymphatic anomalies. Here we investigated the expression pattern of mTOR pathway components and their phosphorylated forms (mTOR, p-mTOR, 4EBP1, p-4EBP1, S6K1 and p-S6K1) in normal lymphatic vessels and lymphatic anomalies using immunohistochemistry. In this study, we described expression pattern of mTOR pathway components in lymphatic anomalies and related diseases. A detailed protein expression analysis of mTOR-pathway components may shed light on their roles in lymphatic anomalies, and lead to predicting the clinical prognosis of sirolimus treatment.

研究分野：人体病理

キーワード：リンパ管異常 リンパ管奇形 mTOR シロリムス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「難治性リンパ管異常」は、異常に拡張したリンパ管の集簇からなる希少疾患である。良性病変ではあるが、病変が大きく広範囲に及ぶ場合、機能面、整容面において患者のQOLは著しく低下し、しばしば致死的となる。正確な有病率は不明だが、小児、若年者に多く発生する。現在の治療法は手術や放射線治療、硬化療法などであるが、巨大病変や重要臓器の病変はとくに治療が困難であり、重大な合併症も存在する。外科治療が困難な場合には、薬物による標準治療はなく、有効かつ安全性の高い治療法の開発が急務である。

一方で近年、血管やリンパ管の発達や脈管異常の病態にPI3kinase/Akt/mTOR経路が重要であることが解明されてきた¹⁾。海外では、この経路を標的としたmTOR阻害剤であるシロリムスの難治性リンパ管異常に対する高い効果が報告されている²⁻⁶⁾。本邦でも、世界に先駆けて薬事承認を得るために臨床試験が開始されている。シロリムスはリンパ管奇形やリンパ管系腫瘍といった、生物学的動態や遺伝子的背景が異なる病変にも著効するが、その縮小メカニズムは不明な点が多く、治療効果に乏しい症例の報告もある³⁾。

2. 研究の目的

シロリムスのmTOR阻害作用が難治性リンパ管異常の新規治療ターゲットとして脚光を浴びている。mTOR経路は、正常リンパ管の発生およびリンパ管異常の病因に重要な役割を果たしていると考えられており、シロリムスは経験的に病変を縮小することが知られている。しかし、ヒト検体を用いた縮小メカニズムの解析は行われていない。本研究では、リンパ管異常症例を集積し、それらにおけるmTOR経路の発現やmTOR阻害薬であるシロリムスの作用の共通点・相違点から、治療効果予測因子を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、mTORとその下流でタンパク合成に関与する4EBP1 (the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein)とS6K1 (the ribosomal protein S6 kinase 1)およびそれぞれの活性型(リン酸化修飾型)に着目した。免疫組織化学的手法により、ヒト検体を用いてリンパ管異常病変におけるmTOR経路の発現を検討した。さらにシロリムスとmTORのノックダウンによる、リンパ管におけるmTOR経路への影響を検討した。

4. 研究成果

リンパ管奇形症例の集積

LM; リンパ管奇形 (n = 14)、KLA; カポジ型リンパ管腫症 (n = 2) およびKLE; カポジ型血管内皮腫 (n = 2) の計 18 名のリンパ管異常患者の病理検体を用いた。検体は、生検、掻爬または切除によって得た。

mTOR経路の免疫組織学的解析

正常リンパ管およびリンパ管異常におけるmTOR経路の発現について、免疫組織化学染色的手法を用いて検討した(図1)。

正常リンパ管は4EBP1、S6K1およびp-S6K1を発現していたが、mTOR、p-mTOR、p-4EBP1は発現していなかった。全てのリンパ管異常でmTOR、4EBP1、S6K1、p-S6K1が発現していた。p-mTORはKLAとKHEの半分の症例で発現しており、p-4EBP1はLM、KLAおよびKHEの約半分の症例で発現していた。

図1 リンパ管異常におけるmTOR経路の発現

	Normal LV	LM (n = 14)	KLA (n = 2)	KHE (n = 2)
Staining pattern	- / +	- / +	- / +	- / +
mTOR	-	0 / 14	0 / 2	0 / 2
p-mTOR	-	13 / 1	1 / 1	1 / 1
4EBP1	+	0 / 14	0 / 2	0 / 2
p-4EBP1	-	4 / 10	1 / 1	1 / 1
S6K1	+	0 / 14	0 / 2	0 / 2
p-S6K1	+	1 / 13	0 / 2	0 / 2

Staining pattern (-; negative / +; positive)

Normal LV; 正常リンパ管

LM; リンパ管異常

KLA; カポジ型管腫症

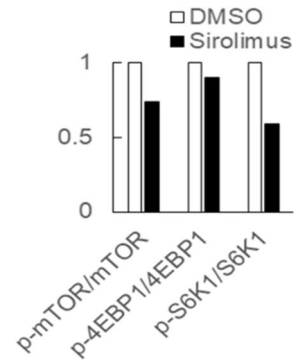
KHE; カポジ型血管内皮腫.

In vitro 解析

mTOR 経路阻害によるリンパ管新生への影響を検討するため、ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC: Human umbilical endothelial cells) にシロリムスあるいは mTOR のノックダウン処理を行い、mTOR 経路の発現を western blot にて検討した。シロリムス (20 nM) を投与した細胞では、p-mTOR / mTOR、p-4EBP1 / 4EBP1 および p-S6K1 / S6K1 の比率は減少した。同様に、si-mTOR (15 nM) を用いて mTOR をノックダウンすると、p-mTOR / mTOR、p-4EBP1 / 4EBP1 および p-S6K1 / S6K1 の比率が減少した (図 2)。

図 2 は、ヒト臍帯内皮細胞へのシロリムス投与時の western blot によるタンパク発現の変化をまとめたものである。

図2 シロリムス投与による mTOR経路の発現の変化



以上、本研究ではリンパ管異常における mTOR 経路の発現パターンを初めて明らかとした。正常リンパ管と比較し、リンパ管異常では p-4EBP1 と p-mTOR が高発現していた。mTOR 経路の発現分析はリンパ管異常の予後予測につながる可能性が示唆された。今後はリンパ管異常症例における、シロリムス投与前後での縮小メカニズムの形態組織学的変化を解析していく予定である。

<引用文献>

- 1) Huber S, et al. *Kidney Int.* 2007, 71:771-777., 2) Hammill AM, et al. *Pediatr Blood Cancer.* 2011, 57: 1018-1024., 3) Adams DM, et al. *Pediatrics.* 2016, 137: e20153257., 4) Boscolo E, et al. *J Clin Invest.* 2015, 125:3491-3504., 5) Boon LM, et al. *Plast Reconstr Surg.* 2015, 136:38., 6) Nadal M, et al. *Acta Derm Venereol.* 2016, 96:448-452.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yumiko Hori, Michio Ozeki, Katsutoshi Hirose, Kentaro Matsuoka, Takahiro Matsui, Masaharu Kohara, Shinichiro Tahara, Satoru Toyosawa, Toshiyuki Fukao, Eiichi Morii	4. 巻 70
2. 論文標題 Analysis of mTOR Pathway Expression in Lymphatic Malformation and Related Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 323-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12913	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀由美子、松岡健太郎、森井英一
2. 発表標題 リンパ管異常症におけるmTOR関連蛋白発現の免疫組織学的検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀由美子
2. 発表標題 血管腫・血管奇形の病理診断
3. 学会等名 第16回日本血管腫血管奇形学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----