

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791895

研究課題名(和文)リンパ管腫に対する各種薬剤の治療効果の検討と作用機序の解析

研究課題名(英文)DIRECT EFFECT OF OK-432 AND OTHER CLINICALLY USED DRUGS FOR HUMAN LYMPHANGIOMA DERIVED LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELL

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・臓器運動器病態外科部・フェロー

研究者番号：10626766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在リンパ管腫の治療に対して、有効性が期待される各種薬剤(OK432、Rapamycin、-blocker、bleomycin, etc)の治療効果と作用機序についての検討を行った。続いて、HL-LECに対するOK-432の直接効果の機序を検討した。

治療についての研究結果、OK-432, bleomycin, rapamycin, propranolol はin vitroでHL-LECに直接作用する。OK-432はエンドサイトーシスによってHL-LECに取り込まれ、免疫反応を介さずに細胞死を惹起することが分かった。

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. Several drugs have been reported effective for lymphangioma. OK-432 and bleomycin have been used for sclerotherapy, propranolol, sildenafil, dexamethasone and rapamycin for systemic therapy. These are very recent reports. Recently, 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-LECs were cultured with these drugs for up to 72 hours with concentration's described in several papers. In summary, OK432 bleomycin propranolol reduced viable HL-LEC.

研究分野：小児外科学

キーワード：リンパ管腫

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。四肢体幹の体表に限局した小病変のこともあるが、頭頸部に好発し、奇異な外観を呈したり、咽喉頭部で気道狭窄を生じることが多く、外科的切除は選択できないことも多い。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児が後を絶たない。一般的に細胞生物学的にまた、予後的には悪性腫瘍の分類に入らない疾患であるが、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ることより、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 OK432 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。しかし、OK-432 の作用機所は不明であり、生物由来成分を用いていることと時に高熱が遷延する場合も有って患者への負担も無視できないこと、患者への負担も大きく、海綿型には無効で、嚢胞のサイズにより治療効果が得られないことなどが問題としてある。その他、各地で現在使用されている Lapamycin、 β -blocker、bleomycin など同様に効果が不明瞭である。そのため、我々はリンパ管腫に対して用いられてい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。また、同時に疾患の生物学的特性を検証し、その結果に基づいた有効な

治療法への開発へ向けて研究を進めている段階である。

2. 研究の目的

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。本研究は現在リンパ管腫の治療に対して、有効性が期待される各種薬剤(OK432、Rapamycin、 β -blocker、bleomycin, etc) の治療効果と作用機序を明らかにすることを目的とするものであり、過去に我々の進めてきたリンパ管内皮研究の延長として効率良く進められることが予想される。我々が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およびリンパ管腫モデル動物を用いて、効果を生物学的に検証する。上記研究により、有効な治療法が確立できる可能性があり、またリンパ管内皮の基礎生物学的研究を進める上にも非常に有益であると考えられる。リンパ管系の分子生物学の研究は血管系に比べて遅れているが徐々に明らかになってきており、増殖因子受容体の Vascular endothelial growth factor receptor -3 (VEGFR-3) がリンパ管腫の嚢胞内皮細胞に過剰発現していることを示す論文が発表されている (Huang et al. 2001 ; Norgall et al. 2007)。VEGFR-3 を介したシグナルはその下流で PI3K/AKT や MAPK 伝達系を活性化することが証明されているが (Vorg et al., 1995)、我々はすでにリンパ管腫 10 例の切除標本において、リンパ管内皮での PI3K/AKT 系の強い活性化を P-AKT に対する免疫組織化学染色にて確認した。PI3K/AKT 系の主な機能として増殖刺激や細胞死抑制があり、悪性腫瘍を始めとして PI3K 系への依存が強い細胞において、PI3K のリン酸化を阻害するとアポトーシス (細胞死) が誘導されることがよく知ら

れている (Osaki et al., 2004)。リンパ管腫においてこの伝達系が強く活性化されているのであれば、PI3K を阻害する薬剤を用いて、リンパ管腫細胞をアポトーシスに誘導することができる。また一方 MAPK 系も細胞増殖シグナルやアポトーシス抑制シグナルとして大きな役割を果たしているが、シグナル伝達を抑制するような薬剤を使用することでリンパ管細胞の増殖を抑えることが出来る可能性がある。われわれの樹立した培養細胞を用い、また当院での摘出組織を用いて、疾患の生物学的特性を検証し、その結果に基づいた有効な治療法への開発へ向けて研究を進めていく。

3. 研究の方法

現在までにリンパ管腫由来内皮細胞株 (HL-LEC) 及び不死化細胞株を樹立している。現在までに得られた HL-LEC および市販の正常 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。具体的には薬剤として OK-432、bleomycin、 β -blocker、Rapamycin、steroid、interferon の効果を検討する。

蛍光蛋白で標識されたリンパ管腫動物モデルを用いて、*In vivo* での薬剤の動態と治療効果を組織を用いて検証する。これにより、有効な投与方法や有効濃度などが明らかになる。投与方法としては腫瘍への直接投与や経静脈投与などを濃度を変えて投与する。大きさや形状変化を経時的に観察し、harvest した組織の遺伝子発現を genotip にて解析すると同時に、蛋白レベルでの変化を免疫組織学的に判定する。

4. 研究成果

本研究の前段階として、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ることを確認している。PI3K/AKT 系の下流のシグナル伝達に作用し、apoptosis の誘導について検討を行っ

た。OK-432 はいかに細胞内に取り込まれるのかを免疫染色を用いて、また endocytosis 後の細胞死への経路をシグナル伝達系を中心に検証した。bleomycin(以下 BLM)の局所注入療法はリンパ管腫周囲の正常組織に対する傷害作用が従来の薬剤に比較し弱い傾向が認められた。しかし、局注部位に硬結などの瘢痕形成を認めることが多く、BLM による肺線維症などの重篤な副作用が報告され、現在は広く使用されていない薬剤である。しかし、有効例も存在し、P-AKT 系のシグナル伝達に作用する可能性もあるため、OK-432 と同様に BLM の効果・作用を検証した。さらに、近年 β -blocker (propranolol) の有効性が期待されており、特にリンパ管腫症に対して臨床応用がなされている。作用機序としては特に RAF mitogen-activated protein kinase を介する VEGF 発現減弱作用が示唆されている。我々は HL-LEC への直接の作用を検討し、臨床応用への基礎データを構築した。また、Rapamycin については、LEC において 1 ng/ml で VEGF の下流に作用して増殖を抑制する作用が認められており (Kidney Int. 2007 Apr;71(8):771-7. Epub 2007 Feb 14., Cancer Sci. 2007 May;98(5):726-33.) 既に欧州ではリンパ管腫への臨床応用の報告もあり (Personal communication) 有効性が期待されるため、作用機序について HL-LEC を用いて検討した。

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 0 件)

{ 学会発表 } (計 0 件)

{ 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
臓器・運動器病態外科部・フェロー
研究者番号：10626766