

Title	ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株を用いたリンパ管腫モデル動物の作製
Sub Title	Establishment of the animal model of lymphangioma using human lymphangioma derived lymphatic endothelial cell
Author	藤野, 明浩(Fujino, Akihiro) 梅澤, 明弘(Umezawa, Akihiro) 秦, 順一(Hata, Jyunichi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>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シーズ発掘、またそれを検討するために必要なリンパ管腫の動物モデルの作成であった。</p> <p>当研究ではリンパ管腫由来細胞培養法と、その移植によりNOGマウスに安定してリンパ管腫様病変をつくる手法を確立した。またこの細胞を不死化し蛍光・発光蛋白を導入することに成功した。今後この細胞を移植することにより体外から観察可能な病変をもつ動物モデルとすべく検討を続ける必要がある。</p> <p>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, and establishment of animal model of the lymphangioma necessary to examine the new therapeutic methods. In this study, we established technique to make lymphangioma-like lesion in the NOG mouse by transplanting primary culture cells derived from lymphangioma lesions. In addition, we succeeded in immortalizing this cell, and introducing the fluorescence and light emission protein. We need to continue this project it in order to make an animal model in which the lesion is observable from the outside the body by transplanting this cell.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2011～2014 課題番号：23591917 研究分野：小児外科, リンパ管疾患
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23591917seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23591917seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591917

研究課題名(和文) ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞株を用いたリンパ管腫モデル動物の作製

研究課題名(英文) Establishment of the animal model of lymphangioma using human lymphangioma derived lymphatic endothelial cell

研究代表者

藤野 明浩 (Fujino, Akihiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50306726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000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シーズ発掘、またそれを検討するために必要なリンパ管腫の動物モデルの作成であった。

当研究ではリンパ管腫由来細胞培養法と、その移植によりNOGマウスに安定してリンパ管腫様病変をつくる手法を確立した。またこの細胞を不死化し蛍光・発光蛋白を導入することに成功した。今後この細胞を移植することにより体外から観察可能な病変をもつ動物モデルとすべく検討を続ける必要がある。

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, and establishment of animal model of the lymphangioma necessary to examine the new therapeutic methods.

In this study, we established technique to make lymphangioma-like lesion in the NOG mouse by transplanting primary culture cells derived from lymphangioma lesions. In addition, we succeeded in immortalizing this cell, and introducing the fluorescence and light emission protein. We need to continue this project in order to make an animal model in which the lesion is observable from the outside the body by transplanting this cell.

研究分野：小児外科、リンパ管疾患

キーワード：リンパ管腫 リンパ管奇形 モデル動物 リンパ管内皮細胞 細胞生物学 病態発生 新規治療法

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ管腫は良性疾患とされるが、重症・難治性患者が 20% 前後存在し、有効な治療がないため、患者の QOL 改善のため世界中で新たな治療法開発が待たれて久しい。しかしながらリンパ管自体の研究が遅れていたことや、有用な疾患モデル動物は存在しないこともあり、疾患治療においては大きな発展がないのが現状である。

我々は先行研究にて、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 ( Human lymphangioma -derived lymphatic endothelial cells, HL-LECs) 株の全てが、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を確認した。( 図 1 ) この知見を疾患克服へ生かすべく研究を進めている。

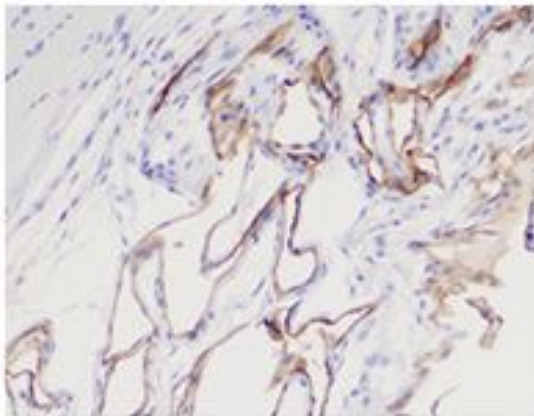


図 1 HL-LEC 移植組織 (D2-40)

## 2. 研究の目的

二つの大きな目的がある。

1, リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞を移植したマウスをリンパ管腫モデル動物として確立すること。

2, 市販の正常リンパ管内皮細胞を対照として、すでに蓄えている細胞株の遺伝子発現プロファイルの解析等をもとに新たな治療法の開発を追求すること。

そのために臨床検体を収集し有用な細胞株の確立を常時行っていく。

## 3. 研究の方法

有用なリンパ管腫モデル動物の確立には HL-LEC 移植により形成するリンパ管腫の標識が必要となるため、蛍光・発光標識した HL-LEC を作成する。

安定したリンパ管腫モデルマウスを確立した後、モデル動物を利用して、考え得る新治療法の開発やリンパ管腫発生機序や正常リンパ管発生の解明を進める。

我々が確立した手法による臨床検体からのリンパ管腫患者由来リンパ管内皮細胞株 (HL-LECs) の樹立を続け、HL-LEC の遺伝子

発現プロファイル・メチル化解析等により共通の性質を把握し正常 LEC と比較する。

## 4. 研究成果

【リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞及び不死化細胞の確立】

我々は 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内皮細胞株の樹立を試みてきたが、2005 年の初めての成功以降、現在までにリンパ管腫由来内皮細胞 10 株及びその不死化細胞株 1 株を樹立して解析を行っている。

【リンパ管腫特異的遺伝子の検討】

樹立した HL-LEC と正常ヒトリンパ管内皮細胞との遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析によって行ってきた。現在までに約 20 個の HL-LEC に共通して発現異常を認める遺伝子が検出されている。個々の遺伝子の HL-LEC における働きを順に解析開始している。特にリンパ管腫内皮細胞において正常リンパ管内皮細胞の数十倍の遺伝子発現を認める転写因子 X (未公表) について shRNA によるノックダウン細胞を作製し、遺伝子の機能解析を行っている。

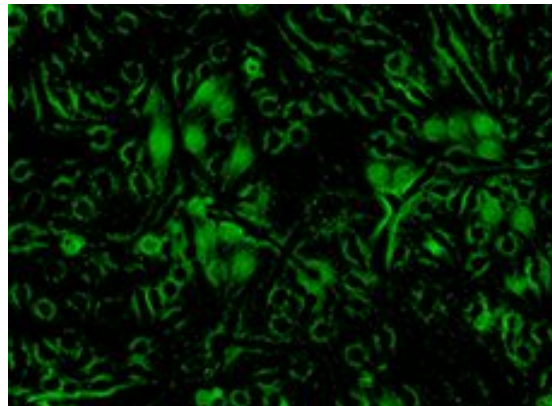


図 2, 蛍光導入 HL-LEC

【リンパ管腫モデル動物の作成】

従来この難治性疾患の発生メカニズムを深く理解し治療法を開発するために必要なヒトリンパ管腫モデル動物は存在しなかった。我々は樹立した HL-LEC を重症複合免疫不全マウス (NOG マウス) に移植するとリンパ管腫様組織を作ることを確認した (10 例にて再現率 100%) ( 図 1 ) ( 投稿準備中 )。これをリンパ管腫モデル動物として様々な研究に応用できる可能性が示唆された。しかしながら、発生した病変部を体外から観察することは困難であった。そこで先ずリンパ管腫由来不死化細胞株を hTERT 及び HPV E6/E7 遺伝子導入により樹立した。これは NOG マウスへの移植によりリンパ管腫症組織を作成することが確認された。次にこの細胞株へ蛍光タンパク及び発光ルシフェラーゼを導入し、安

定した細胞株作成に成功した(図2)。得られた細胞の機能については引き続き検討を要する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

藤野明浩, 高橋信博, 石濱秀雄, 藤村匠, 加藤源俊, 富田紘史, 淵本康史, 星野健, 黒田達夫: 気道周囲を取り巻く頸部・縦隔リンパ管腫切除. 小児外科 査読有 46(2), 2014, 105-110.

藤野明浩, 森定徹, 梅澤明弘, 黒田達夫: ヒトリンパ管腫モデル動物の作成. 小児外科 査読有 46(6), 2014, 635-638.

藤野明浩, 上野滋, 岩中督, 木下義晶, 小関道夫, 森川康英, 黒田達夫: リンパ管腫. 小児外科 査読有 46(11), 2014. 1181-1186.

Ozeki M, Kanda K, Kawamoto N, Ohnishi H, Fujino A, Hirayama M, Kato Z, Azuma E, Fukao T, Kondo N: Propranolol as an alternative treatment option for pediatric lymphatic malformation. *Tohoku J Exp Med* 査読有 229, 2013, 61-66.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/229/1/229\\_61/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/229/1/229_61/_pdf)

藤野明浩: 頭頸部炎症疾患の画像診断と治療 5 「頸部瘻・嚢胞性疾患の炎症」. 小児科 査読無 54, 2013, 1221-1228.

芳賀大樹, 問田千晶, 六車崇, 藤野明浩: 集中治療管理を要した縦隔リンパ管腫症の2例. *日本小児科学雑誌* 査読有 117, 2013, 1483-1488.

藤野明浩, 山田耕嗣, 石濱秀雄, 高橋正貴, 山田和歌, 大野通暢, 佐藤かおり, 渡邊稔彦, 田中秀明, 淵本康史, 金森豊, 黒田達夫: リンパ管腫術後のリンパ漏を持続する皮膚隆起病変(限局性リンパ管腫)に対するエタノール局注療法. *日本小児外科学会雑誌* 査読無 49(1), 2013, 156.

高橋正貴, 松岡健太郎, 大喜多肇, 中澤温子, 藤野明浩: リンパ管関連疾患の臨床病理学的検討. *日本病理学会会誌* 査読無 102(1), 2013, 476.

藤野明浩: リンパ管腫(リンパ管奇形)の診断・治療戦略. *PEPARS 71, 血管腫・血管奇形治療マニュアル* 査読無 2012(11), 68-77.

藤野明浩: リンパ管腫. *小児科診療査読無* 75(2), 2012, 207-212.

〔学会発表〕(計 18 件)

松岡健太郎, 高橋正貴, 藤野明浩, 他. リンパ管奇形(Lymphatic malformation)の病理学的鑑別. 第34回日本小児病理研究会(2014年9月6日, 岡山大学鹿田キャンパス Junko Fukutake Hall(岡山県岡山市))

藤野明浩, 青木一憲, 黒田達夫, 他. 急性呼吸障害を生じた頸部・縦隔リンパ管腫症例の検討. 第28回日本小児救急医学会学術集会(2014年6月7日, パシフィコ横浜 アネックスホール(神奈川県横浜市))

藤野明浩, 黒田達夫, 他. 我が国における「リンパ管腫」と「ISSVA分類におけるリンパ管奇形」の現況. 第51回日本小児外科学会学術集会(2014年5月10日, 大阪国際会議場 グランキューブ大阪(大阪府大阪市))

高橋正貴, 松岡健太郎, 小関道夫, 藤野明浩, 他. リンパ管関連疾患診断基準策定のための臨床病理学的検討. 第103回日本病理学会総会(2014年4月24日, 広島国際会議場(広島県広島市))

彦坂信, 金子剛, 長島隼人, 藤野明浩. 顔面リンパ管腫の手術経験. 第57回日本形成外科学会総会・学術集会(2014年4月11日, 長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市))

高橋正貴, 藤野明浩, 黒田達夫, 他. 難治性リンパ管腫症(Lymphangiomas)の集学的治療における外科の役割. 第114回日本外科学会学術集会(2014年4月3日, 国立京都国際会館(京都府京都市))

Akihiro Fujino, Mari Ooba, Yasuhide Morikawa, Shigeru Ueno, Tadashi Iwanaka. The clinical criteria for "intractable" lymphangioma led by decisions of Japanese pediatric surgeons. 4<sup>th</sup> World Congress of Pediatric Surgery (2013/10/13-16, Berliner Congress Center (Berlin, Germany))

藤野明浩, 山田耕嗣, 石濱秀雄, 高橋信博, 藤村匠, 富田紘史, 星野健, 黒田達夫, 淵本康史, 金森豊. リンパ漏を呈する限局性リンパ管腫に対する無水エタノール局注療法. 第24回日本小児外

科 QOL 研究会 (2013 年 10 月 5 日, 福岡リーセントホテル レインボーホール (福岡県福岡市))

藤野明浩、大庭真梨、森川康英、上野滋、岩中督. 小児外科医によるリンパ管腫の重症・難治性の臨床診断基準. 第 10 回血管腫・血管奇形研究会 (2013 年 7 月 19-20 日, 岩手県情報交流センター(岩手県盛岡市))

和田友香、藤野明浩、兼重昌夫、花井彩江、高橋重裕、藤永英志、塚本桂子、淵本康史、金森豊、中村知夫、伊藤裕司. 当院における乳糜胸水に対する治療. 第 49 回日本周産期・新生児医学会学術集会(2013 年 7 月 15 日, パシフィコ横浜会議センター (神奈川県横浜市))

Akihiro Fujino, Mari Ooba, Yasuhide Morikawa, Shigeru Ueno, Tadashi Iwanaka. The clinical criteria for "intractable" lymphangioma led by decisions of Japanese pediatric surgeons. EUPSA 2013 (The 14<sup>th</sup> Congress of the European Pediatric Surgeons' Association, Annual Meeting), (2013/6/7, University Leipzig (Leipzig, Germany))

Masataka Takahashi, Akihiro Fujino, Masaya Suzuhigashi, Hideaki Tanaka, Toshihiko Watanabe, Kaori Satou, Michinobu Ohno, Waka Yamada, Kouji Yamada, Yasushi Fuchimoto, Yutaka Kanamori, Akihiro Umezawa. Direct effects of each drugs (especially OK-432) for human lymphangioma derived lymphatic Endothelial Cell. PAPS 2013 ( Pacific Association of Paediatric Surgeons, Annual Meeting) (2013/4/7-11, Crown Plaza Hunter Valley (Lovedale, Australia))

藤野明浩, 山田耕嗣, 石濱秀雄, 高橋正貴, 山田和歌, 大野通暢, 佐藤かおり, 渡邊稔彦, 田中秀明, 淵本康史, 金森豊, 黒田達夫: リンパ管腫術後のリンパ漏を持続する皮膚隆起病変(現局性リンパ管腫)に対するエタノール局注療法. 第 32 回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会 (2012 年 11 月 2 日, 静岡県コンベンションアーツセンターグラシップ (静岡県静岡市))

Fujino A, Kitamura M, Kuroda T, Kitano Y, Morikawa N, Tanaka H, Takayasu H, Takeda N, Suzuhigashi M, Matsuda S, Yamane Y, Masaki H: A Study of Lymphatic Flow in Lymphangioma. AAPS

2012 (23<sup>rd</sup> Congress of the Asian Association of Pediatric Surgeons, アジア小児外科学会) (2012/10/10, Severance Hospital Yonsei University (Seoul, Korea))

Fujino A, Kitamura M, Tanaka H, Takeda N, Watanabe T, Kitano Y, Kuroda T: A Study of Lymphatic Flow in Lymphangioma. リンパ研究会 (2012 年 9 月 5 日, 東京大学 (東京都文京区))

藤野明浩, 小関道夫, 高橋正貴, 石濱秀雄, 山田耕嗣, 山田和歌, 武田憲子, 渡邊稔彦, 田中秀明, 金森豊: プロプラノロール療法を施行した難治性リンパ管腫症例の検討(シンポジウム) 第 9 回血管腫・血管奇形研究会 (2012 年 7 月 14 日, 長崎大学 良順会館 (長崎県長崎市))

Fujino A, Ozeki M, Kanamori Y, Tanka H, Watanabe T, Takeda N, Yamada W, Takahashi M, Yamada K, Ishihama H: Propranolol for intractable lymphatic malformation (lymphangioma): a report of 4 cases. ISSVA 2012 (The 19<sup>th</sup> International workshop on Vascular Anomaly, 国際血管奇形研究学会) (2012/6/16-19, Malmo Opera (Malmo, Sweden))

藤野明浩, 齊藤真梨, 森川康英, 上野滋, 岩中督. リンパ管腫の重症・難治性度診断基準の作成-厚生労働省科研費難治性疾患克服研究事業研究結果報告-. 第 49 回日本小児外科学会学術集会 (2012 年 5 月 16 日, パシフィコ横浜 アネックスホール (神奈川県横浜市))

〔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〕  
ホームページ等  
リンパ管腫の診断・治療最前線 - 小児外科 -  
[http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical\\_info/presentation/201408.html](http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/presentation/201408.html)

UMIN 臨床試験登録情報 限局性リンパ管腫に対する無水エタノール注入硬化療法のパイロット研究  
<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&type=summary&recptno=R000013039&language=J>

リンパ管疾患情報ステーション  
<http://www.lymphangioma.net/>

慶應義塾大学小児外科 リンパ管疾患相談  
窓口  
[http://www.ped-surg.med.keio.ac.jp/patients/consultation\\_lymph.html](http://www.ped-surg.med.keio.ac.jp/patients/consultation_lymph.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤野 明浩 (FUJINO, Akihiro)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：50306726

### (2) 研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA, Akihiro)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・部長  
研究者番号：70213486

### (3) 連携研究者

秦 順一 (HATA, Jyunichi)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・名誉総長  
研究者番号：90051614