

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告

② 先天性リンパ管疾患診断技術の改良
リンパ管腫症とゴーハム病の鑑別診断法の確立

担当責任者

小関 道夫 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 併任講師

研究要旨

【研究目的】

リンパ管腫症・ゴーハム病は、全身、特に胸部にリンパ管組織が異常増殖し、窒息や感染症により死に至る非常に稀な原因不明の予後不良疾患である。平成 24、25 年度に全国調査を行ったが、リンパ管腫症とゴーハム病を明確に区別する診断法を得ることが出来ず、結局これまでの海外の文献を超える疾患調査結果は得られなかった。今回は、情報収集法や質問項目を新たに検討し、ホームページを用いた前方視的縦断的症例登録システムを作成することを本研究の目的とした。

【研究進捗状況】

本疾患の情報を ID、パスワードによって管理された「症例登録医」が登録できるように、「小児リンパ管疾患情報ステーション」のホームページ上に症例登録ページを開設する予定である。具体的には基礎情報、発症時の症状、病変部位、発症～初回調査時までに出現した症状、病変部位、診断に使用した画像検査、病理検査、治療、転帰が主な項目である。さらに、前回の全国調査項目で重要と考えられる項目、画像、病理検査のレビュー、収集の依頼、患者血漿、血液細胞、病変組織検体を使う研究の説明と収集の依頼、発症、病態を解明するために得るべき質問項目なども盛り込んだ。また情報を集めた後に、我々が知りたい内容、仮説を証明できるように、解析方法、統計分析も検討した。現在、これらのフォームを作成し、ホームページ上で確認している状況である。

【結論】

リンパ管腫症、ゴーハム病の鑑別法を得ること、さらに新しい病態、原因を解明することを目的とした、前方視的症例登録システムを作成した。

A. 研究目的

リンパ管腫症（Lymphangiomatosis、最近は Generalized lymphatic anomaly

と呼ばれる）は全身臓器にリンパ管組織が増殖する原因不明の希少性難治性疾患である。小児、若年者に多く発症し、症状は浸潤臓器により様々だが、乳び胸な

ど胸部病変を合併すると予後不良である。骨溶解や乳び腹水、脾臓浸潤、リンパ浮腫、血液凝固異常も起こす。一方、ゴーハム病は1954年にGorhamとStautらが最初にまとめた“disappearing bone”を特徴する疾患で、骨が溶解し、血管やリンパ管組織に置換する疾患である。1983年にHefezらが提唱した診断基準では、内臓への浸潤はないとされているが、乳び胸を伴う症例報告も多い。別々の疾患であるにも関わらず、臨床的にはリンパ管腫症と明確に区別が出来ないことが問題である。

1990年代の報告では世界で約200例程度とされていたが、国内からは症例報告程度で疫学的データもなかったため、平成24、25年度に「リンパ管腫症の全国症例数把握及び診断・治療法の開発に関する研究」にて全国調査を行い、国内症例の患者情報をまとめた。しかし、後方視的解析であり、リンパ管腫症とゴーハム病の区別が出来ないだけでなく、疾患の診断も統一されておらず、他のリンパ管疾患（リンパ管腫、リンパ管奇形など）が混在していた。また診断に有益な画像や病理などの検査の情報が足りなかったり、治療法、投与方法などの統一がなされておらず、それぞれの治療効果判定も困難であった。

我々は、全国調査を基に、「リンパ管腫症・ゴーハム病の診断基準」「重症度分類」を作成した。これによって、2疾患が臨床症状と画像、病理検査を基に診断することができるようになった。我々はこの診断基準によって、国内症例が診断可能かどうかの検証と、前回の調査で十分でき

なかった、「症例の画像、病理組織検査の収集」、「治療の有効性の検証」、「患者血漿、組織検体の収集と解析」を行うことを考えた。これらによって、疾患の病態および発症に関わる危険因子の検索や、患者血漿を用いた疾患特異的マーカーの測定、また血液細胞、組織検体を用いた疾患原因遺伝子の解析に繋げることが可能となる。

今年度は、全国から症例を集めるための入口となる、ホームページを用いた前方視的縦断的症例登録システムを作成することを最大の目標とした。

B. 研究方法

前方視的全国調査システムの構築

(a) ホームページへの登録フォーム作成
症例登録は「小児リンパ管疾患情報ステーション」のホームページ上で行えるようにする。具体的には、ID、パスワードによって管理された「症例登録医」が1例ずつ入力できるようにする。症例登録医は、これまでのリンパ管腫症・ゴーハム病の全国調査等の研究で症例登録をされたことのある主治医と、これから新しくリクルートした主治医、協力医師などがホームページにアクセスし、ID、パスワードを得ると登録医となる。セキュリティを考慮し、それ以外の人は症例を登録できない形とする。また登録医に登録後、登録する症例毎に、自動的に「症例管理番号」（大小英数字交じりの10文字の番号がランダムに割り付けられる）が発行され、症例管理番号と施設の患者ID番号との対応は入力した症例登録医のみ

が確認可能となるようにする。

また登録フォーム作成時に以下のことを留意して、フォームに盛り込まれるようにする。

- ①前回の全国調査項目で重要と考えられる項目
- ②画像、病理検査のレビュー、収集の依頼
- ③患者血漿、血液細胞、病変組織検体を使う研究の説明と収集の依頼
- ④発症、病態を解明するために得るべき臨床情報

これらのフォームを作成後、「小児リンパ管疾患情報ステーション」のホームページ管理会社の担当者と連携し、症例登録ページを組み立てていく。ホームページでアクセスしやすい形となっているか、実際の質問項目を入力し、回答者が答えやすい形になっているか、漏れなく必要な事を入力できるか、という点に留意する。

(b) 前方視的解析方法と病態の仮説

これまでの調査や文献等で、本疾患における病態や、発症リスクなど、様々な考察がなされているが、推測の域を超えない。私たちの行った全国調査などは、横断的であり、単一症例の後方視的検討から疾患全体の特徴や実態を客観的に評価できたが、同じような疾患とは思えないほど個体差が非常に大きいため、まとめた結果も全例には当てはめられないことが問題であった。こうした個別の傾向や病変毎のフォローを継時的に追えるようにする。具体的には、症例登録された際の最初の調査から約2年を目途に、フ

ォローアップの症例調査を行う。その際に、継時的に効くべき項目を設定する。またこれまでの調査や文献等で、この疾患の病態や考えられていることを証明するために、いくつかの仮説と質問項目を作成する。

(c) 得られた情報の解析法の検討

収集された情報を基に、目的を達成できる期待される結果を得られるように、目標とする症例数や統計解析法を検討する。

(倫理面への配慮)

全国調査は複数の医療機関に依頼し、リンパ管腫症診療情報を調査・集計し、解析して患者数、実際の治療、予後、社会生活レベル等を明らかにし、現在の考え得る最善の治療指針を作成し、また医療全体における当疾患の位置づけを行うことを目的としており、厚生労働省の「疫学研究における倫理指針」の適応範囲に合致する。集計されるデータは、「連結可能匿名化された情報」「人体から採取された試料等を用いない」「観察研究である」「被験者の心理的苦痛を伴わない」ものであると考えられる。人権擁護については厚生労働省の「疫学研究における倫理指針」に準拠しており、プライバシーの保護、不利益・危険性の排除については特に厳守した研究計画を作成する。現計画では倫理問題に抵触する研究は含まれないと考えられるが、研究計画は研究に協力する各施設における倫理審査委員会へ必ず提出し、厳正な審理の後に承認を受けた上で実行に移す。また施行後

も岐阜大学倫理審査委員会により、定期的な監査・モニタリングがおこなわれる。本疫学研究は岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会にて「リンパ管腫症・ゴーハム病症例に関する前方視的調査研究」として申請中である。

C. 研究結果

前方視的全国調査システムの構築

(a) ホームページへの登録フォーム作成

全国調査の質問項目をさらに検討し、以下の項目を盛り込むこととした。1) 基礎情報：生年月、性別、発症時年月、既往歴、家族歴、2) 発症時の症状：骨、胸部（肺、縦隔）、腹部（肝臓、脾臓など）、皮膚、神経、血液、その他、3) 発症～初回調査時までに出現した症状、4) 診断に使用した画像検査、病理検査、5) 治療内容、効果、安全性、6) 転帰が主な項目である。

画像検査に関しては、調査で集められた画像検査で閲覧可能なものを研究分担者である国立成育医療研究センター放射線診療部の野坂俊介部長にレビューして頂き、リンパ管腫症とゴーハム病の画像所見の差を検討する予定である。病理診断においては、研究分担者である国立成育医療研究センター病理部の松岡健太郎医長に調査で集められた病理標本で閲覧可能なもののレビューを依頼し、リンパ管腫症とゴーハム病の病理所見の差を検討する予定である。また形態のみでなく、リンパ管内皮細胞のマーカーや発生に関連したマーカーによる免疫組織所見の差を検討する予定である。これまでの調査

においても、画像に関しては約 40 例、病理検査に関しては約 15 例をレビューしている。

診断名に関しては、リンパ管腫症、ゴーハム病はオーバーラップした疾患であり、診断名は現れる症状や病変部位、検査結果などによって主治医が判断された診断を、自施設診断名とする。また海外の文献を参考に、本来のゴーハム病の診断基準を「皮質の骨欠損や進行性の骨溶解を示す骨病変を持った症例をゴーハム病」とし、それ以外の骨病変（髄質を主とした骨溶解）や骨病変のないものをリンパ管腫症と区別し、我々の診断名とする。前回の調査では 82 例中、42 例がリンパ管腫症、40 例がゴーハム病であった。

平成 26 年度内に、「小児リンパ管疾患情報ステーション」のホームページ管理会社の担当者と 4 回の会議を行い、症例登録システムについて協議した。現時点で、私たちが必要としている項目をお伝えし、仮版を作成頂いた。さらに必要な事項を埋め込んで、回答者が答えやすい形になっているか、漏れなく必要な事を入力できるか、という点に留意しながら作成している。平成 27 年 5-6 月に運行予定である。また登録フォームに、前回の全国調査項目で重要と考えられる項目、画像、病理検査のレビュー、収集の依頼、患者血漿、血液細胞、病変組織検体を使う研究の説明と収集の依頼、発症、病態を解明するために得るべき臨床情報などの、研究に必要な項目を盛り込んだ。（資料 1、2）

(b) 前方視的解析方法と病態の仮説

症例登録された際の最初の調査から約2年を目途に、フォローアップの症例調査を行う。症例登録医にその時期に自動的にフォローアップを促すメールを配布する。その際に以下のことを主に問うようにする。

①新たに出現した臨床症状：出現時期とそのきっかけとなった事、病変部位の経過、進行があったかどうかなどを問う。

②新たに追加された検査と異常：画像検査、病理検査については、日々進歩しており、追加されて疾患に特異的な所見などが得られたか、またどのくらいでフォローされているか、必要な事項を主治医から情報を得る。

③新たに追加した治療法：治療についても症状が悪化した際などに行われた治療を追加して頂く。薬物療法としてはどの程度使用されているか、新規治療薬の効果や安全性を主治医の判断で治療効果判定を行って頂く。

またこれまでの調査や文献等で、この疾患の病態や考えられていることを証明するためにいくつかの仮説と質問項目を作成し、これらの問いが得られるような項目を盛り込んだ。

仮説①ゴーハム病の骨病変の病勢、進行は波がある。進行する時期と、全く進行しない時期、寛解に至る場合もある：骨病変に関しては、経過中に進行があるかどうか、細かく問うこととする。

仮説②リンパ管腫症の骨病変は進行が緩徐で、骨折は少ない。寛解に至ることは無い。

仮説③リンパ管腫症の骨病変は無症状であることが多く、見つからないことがあ

る：これまでの調査例も全身骨スクリーニングをされていない症例が多いため、スクリーニングを行って頂き、無症候性の骨病変を検索する。

仮説④臨床症状、画像検査、病理検査だけでは、リンパ管腫症とゴーハム病を区別できない症例がある：診断を決めた検査所見を明確にして頂く。その結果、どちらかに判定不能な症例が存在しないかどうかを検討する。

仮説⑤臨床症状、画像検査、病理検査だけでは、“リンパ管腫”と、“リンパ管腫症”を区別できない症例がある：診断を決めた検査所見を明確にして頂く。その結果、どちらかに判定不能な症例が存在しないかどうかを検討する。

仮説⑥胸水発症には、肋骨、胸椎の骨病変、周辺のリンパ管腫病変が関与している。またきっかけとして、胸腔の手術、肋骨病変の生検などの外科的処置の影響がある：胸水発症例の発症前の状況を詳細に問う。

仮説⑦ゴーハム病の皮膚病変は、溶骨病変の周辺に存在する・反対にリンパ管腫症ではそうとは限らない：直接的にそのことを問う。

仮説⑧凝固系異常値は症状悪化を反映する：最悪化時の凝固異常値と、その時の年月、状況を問う。また病状が安定している場合は、安定している時とどう違うかについても問う。

(C) 得られた情報の解析法の検討

収集された情報を基に、目的を達成できる期待される結果を得られるように、目標とする症例数や統計解析法を検討し

ている。

例えば、リンパ管腫症とゴーハム病の鑑別点を検討するため、リンパ管腫症とゴーハム病の臨床症状や特徴的所見を比較し、どちらの疾患により頻度が高いかを Fisher's exact test を用いて解析することとした。また骨病変の数などは the unpaired t test で解析することとした。予後規定因子の解析のため、様々な因子（病名毎、骨病変のタイプ別、胸部病変の有無、凝固異常の有無、血小板減少の有無）に関して、グループ毎に Log-rank test にて解析を行うこととした。

D. 考察

本研究は、これまでに行った全国調査の情報を上回る新たな情報を得ることで、本疾患のさらに重要なデータを得ることが目的である。そのため、症例情報を前方視的に登録して頂き、新規症例の経過や特徴を縦断的に解析することで、これまでわからなかった特徴や、病態を解明することが可能となる。また付随的に、診断に用いられた画像、病理検査のレビューによって、新たな診断方法の開発や、新規治療の有効性の検証も行うことが可能となる。この疾患に対する疾患特異的な症例登録システム、画像および病理のレビュー、検体収集は世界的にも類を見ない研究である。本研究が足がかりとなり、世界に発信できる新たな研究報告ができるようにしたい。

また今後は、症例登録時に同意頂いた場合に、患者の血漿および血液細胞、病変組織検体を収集する予定である。我々

は、これらを用いた病態解析、原因遺伝子検索を試みる予定であり、症例登録システム構築後、研究を進めていきたい。

E. 結論

本研究はリンパ管腫症、ゴーハム病の症例を縦断的に解析するため、症例登録システムを構築することが目的である。今年度、具体的な内容とホームページ変更に着手し、近日中に施行可能である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 2014; 46(11):1181-1186.

2. 学会発表

- 1) Michio Ozeki, Tomohiro Hori, Kaori Kanda, Eiko Matsui, Toshiyuki Fukao, Naomi Kondo, Kentaro Matsuoka, Shunsuke Nosaka, Akihiro Fujino, Tatsuo Kuroda, Nationwide Study of Lymphangiomatosis and Gorham-Stout disease in Japan. The 20th International Workshop of the International Society for the Study of Vascular Anomalies (2014年4月2日, メルボルン, オーストラリア)

- 2) 小関道夫、堀友博、神田香織、加藤善一郎、深尾敏幸、松岡健太郎、野坂俊介、藤野明浩、黒田達夫：リンパ管腫症・ゴーハム病症例の全国調査報告．第117回日本小児科学会学術集会（2014年4月13日 愛知）
- 3) 小関道夫、堀友博、神田香織、加藤善一郎、深尾敏幸、松岡健太郎、野坂俊介、藤野明浩、黒田達夫：リンパ管腫症・ゴーハム病症例の全国調査報告．第47回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会（2014年5月10日 大阪）
- 4) 小関道夫、堀友博、神田香織、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸：当科における乳児血管腫 に対するプロプラノロール療法の臨床的検討 第114回日本皮膚科学会（2014年5月29日 京都）
- 5) 小関道夫、堀友博、神田香織、加藤善一郎、深尾敏幸、松岡健太郎、野坂俊介、藤野明浩、黒田達夫：リンパ管腫症・ゴーハム病症例の全国調査報告．第51回日本小児外科学会学術集会（2014年7月18日 大阪）
- 6) 小関道夫、堀友博、神田香織、加藤善一郎、深尾敏幸、松岡健太郎、野坂俊介、藤野明浩、黒田達夫：リンパ管腫症・ゴーハム病症例の全国調査報告．血管腫血管奇形研究会（2014年7月20日 松本）
- 7) 小関道夫、堀友博、神田香織、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸：当科における乳児血管腫 に対するプロプラノロール療法の臨床的検討

第56回日本小児血液がん学会（2014年11月30日 岡山）

- 8) Michio Ozeki, Tomohiro Hori, Kaori Kanda, Eiko Matsui, Toshiyuki Fukao, Naomi Kondo, Kentaro Matsuoka, Shunsuke Nosaka, Akihiro Fujino, Tatsuo Kuroda, Nationwide Study of Lymphangiomatosis and Gorham-Stout disease in Japan. 第56回日本小児血液がん学会（2014年11月30日、岡山）

3. その他

☆講演

- 1) 小関道夫. リンパ管腫症・ゴーハム病. 第1回小児リンパ管疾患シンポジウム（2015年2月15日、東京）
- 2) 藤野明浩, 小関道夫. 疾患概要説明. 第1回小児リンパ管疾患シンポジウム（2015年2月15日、東京）

☆特集

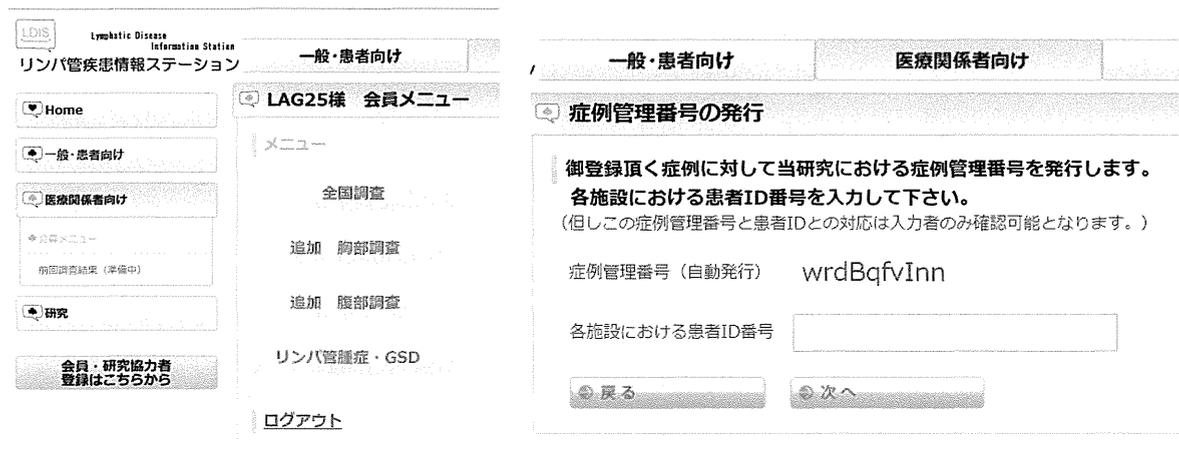
日経メディカル 「複数の診療科で遭遇しうる「リンパ管腫症」の実像」(小関道夫) 2014/7/25掲載

<http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/mem/pub/report/201407/537642.html>

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他
「リンパ管疾患情報ステーション」
<http://lymphangioma.net>

資料1 症例調査の入口と症例管理番号の発行例



資料2 症例情報入力例の1例

(A ; 臨床症状、B ; 画像病理検査、C ; 治療、D ; 画像等の提供依頼)

A) 臨床症状

症例管理情報
 症例管理番号 JEK9XM3FVU
 11
 患者ID番号

2. 臨床症状 (発症時)

皮膚 症状

皮疹 出血班
 蕁麻疹 浮腫
 リンパ浮腫 リンパ腫
 その他

骨病変周辺の軟部組織浸潤 なし

病変部位

神経症状、頭蓋内(脳内)病変 症状

しびれ 麻痺
 末梢神経障害 頭蓋内病変(出血、梗塞など)
 髄膜炎 画像検査の異常のみ
 その他

血液検査の異常 所見 白血球数異常 貧血

B) 画像病理検査

画像
 診断根拠となった画像検査

皮膚 出血班
 蕁麻疹 浮腫
 リンパ浮腫 リンパ腫
 その他

特徴的な所見

画像のみで診断可能ですか? はい

病理
 生検施行されましたか? いいえ

C) 治療

内科的治療種類

ステロイド インターフェロン
 オクトレオチド サリドマイド
 ラパマイシン プロプラノロール
 ビスホスホネート ベリシスマブ
 その他

1回投与量

投与回数

投与期間

治療効果

有効 有効
 反応あり 不変
 判断できない
 その他

治療効果の根拠など

栄養療法行ったか種類 いいえ

D) 画像等

検査情報提供について

画像検査情報を提供して頂けますか? はい
 はいの場合、提供・貸し出して頂けるもの 画像ファイルそのもの(CDRなど)
 病理検査情報を提供して頂けますか? はい
 はいの場合、提供・貸し出して頂けるもの 病理標本(スライド)

血液検体提供について

血清、血漿の残り、凍結検体を提供して頂けますか? いいえ

遺伝子解析について

エクソーム解析のため、血液細胞検体を提供して頂けますか? いいえ
 エクソーム解析のため、病変部位の検体を提供して頂けますか? いいえ

補足コメント等

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告

③ 先天性リンパ管疾患治療開発への応用

- ★ 各疾患由来初代培養株の作成
- ★ 疾患関連候補遺伝子の機能解析

担当責任者

黒田 達夫 慶應義塾大学医学部外科学（小児） 教授
藤野 明浩 慶應義塾大学医学部外科学（小児） 講師

研究要旨

【研究目的】

先天性リンパ管疾患は、原因不明で有効な治療法が存在しない稀少な難治性疾患が多く、患者 QOL に非常に大きな支障を来す。委託業務③先天性リンパ管疾患治療開発への応用の項目「各疾患由来初代培養株の作成」「疾患関連候補遺伝子の機能解析」は当疾患の研究における生物学的研究の基盤をなすものであり、最終的に新たな治療へ発展させるためのシーズを発掘することが目的である。

【研究進捗状況】

先天性リンパ管疾患病変の生検及び切除術より余剰組織を用いて初代培養細胞株の作成を行った。平成 26 年度前半には新たな組織検体が得られず、その後続くべき研究に影響を与えたが、後半にはリンパ管腫（嚢胞性リンパ管奇形）3 例、ゴーハム病 1 例の組織検体を得ることが出来た。これらよりそれぞれリンパ管内皮細胞、線維芽細胞を得ることができた。

平成 26 年度までに得られたリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞 (Human lymphangioma derived lymphatic endothelial cell, HL-LEC) 株の遺伝子発現解析より疾患関連候補遺伝子 17 個が挙げられていたが、それらにつき検討を開始した。もっとも有力視している遺伝子 X は HL-LEC において共通して発現レベルの高い転写因子であるが、HL-LEC の不死化細胞において shRNA により遺伝子発現を抑えた細胞モデルを作成した。一方、正常リンパ管内皮細胞 (Normal LEC) の不死化細胞に遺伝子 X を強制発現するモデルを作成中である。これらを用いて遺伝子 X のリンパ管内皮細胞における機能を解析していく。

【結論】

リンパ管疾患由来初代培養細胞株作成においては、当初予定より得られるリンパ管疾患の組織検体数が少なかったが、平成 26 年度後半より臨床検体を元に細胞株が作成された。

特に非常に稀なゴーハム病より得られた組織及び細胞は今後の検討に特に重要であると
考えられる。

ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞を用いて疾患関連候補遺伝子の機能解析が開始
された。1番手として有力な転写因子である遺伝子 X につき、機能解析細胞モデルが作成
された。また順にその他の有力な遺伝子のスクリーニングを開始している。いずれの遺伝
子も疾患と何らかの関連があると考えられており、今後、診断におけるマーカーや治療の
ターゲットとしての可能性を調べていく。

研究協力者

高橋正貴

国立成育医療研究センター外科医員
同センター生殖・細胞医療研究部共同研
究員

加藤源俊

慶應義塾大学医学部外科学（小児）助教

Arhans Chiral Ismael

慶應義塾大学大学院医学研究科専攻生

A. 研究目的

先天性リンパ管疾患は、原因不明で有効な治療法が存在しない稀少な難治性疾患が多く、患者 QOL に非常に大きな支障を来す。しばしば鑑別診断が困難であり、小児関連各科が診療に難渋する。様々なリンパ管疾患が混同され診断・治療を困難にしている面もみられ、これらを整理し関連各科共通の診断基準・診療ガイドラインを作成する事は今後この領域の疾患の医療の質を高める上で避けることはできない。国際的にもそういう大規模な試みは過去に認められず意義が大きい。

当分担研究は、5年来厚生労働科研費難

治性疾患克服研究事業で進められてきた難治性疾患研究（平成 21-23 年度難治性疾患等克服研究事業「日本におけるリンパ管腫患者（特に重症患者の長期経過）の実態調査及び治療指針の作成に関する研究」藤野班、平成 24-25 年度「小児期からの消化器系希少難治性疾患群の包括的調査研究とシームレスなガイドライン作成」田口班、平成 24-25 年度「リンパ管腫症の全国症例数把握及び診断・治療法の開発に関する研究班」小関班）を再編したもののひとつに相当する。

当研究計画の3年間の業務項目は、大きく以下の4点で示される。

- ①総括
- ②先天性リンパ管疾患診断技術の改良
- ③先天性リンパ管疾患治療開発への応用
- ④臨床データ収集・管理、情報の発信

研究対象の疾患の克服においては基礎研究成果の診断・治療への応用が必須である。リンパ管の基礎研究は急速に発展しているが、当対象疾患の臨床寄りの基礎研究は少ない。その中で本研究班の研究責任・分担者は本研究班結成以前より対象疾患の基礎研究を進めてきた。その成果として既にリンパ管疾患検体収集、疾患別初代培養細胞作成のシステムが確立されており、これら

を利用して病理組織検体による診断マーカーの探索、各種初代培養細胞作成、疾患別iPS細胞を用いた生物学的検討や疾患関連遺伝子解析、ゲノム解析による原因遺伝子探索を進める。各研究計画の倫理審査は既に終了している。

研究初年度は特に得られた試料・細胞株から得た疾患関連候補遺伝子からの発症・診断に直結する遺伝子の抽出に重点をおく。また新たな疾患モデル候補トランスジェニック動物が作成されたため、有用性を検討する。結果は診断・創薬開発、予防等に直結すると考えられる。長期展望として10年内に各リンパ管疾患特異的モデル動物を作成し、戦略的に治療法を開発することを見込む。

委託業務③先天性リンパ管疾患治療開発への応用の項目「各疾患由来初代培養株の作成」「疾患関連候補遺伝子の機能解析」は当疾患の研究における生物学的研究の基盤をなすものであり、最終的に新たな治療へ発展させるためのシーズを発掘することが目的である。

B. 研究方法

稀少疾患である対象疾患の検体を得る機会は少ない。本研究チームではすでに形成しているネットワークにて検体採取機会（生検もしくは切除術）を効率よく得ることが出来る。

得られた組織は連結可能匿名化の上、国立成育医療研究センターおよび慶應義塾大学医学部に運ばれ初代培養細胞樹立を行い、その後の研究に利用する。細胞増殖限界が存在するため、得られた細胞は場合によ

て不死化する事も考慮する。また検体数の上限を設けず、得られる機会を全て利用することとする。

一方、これまでに得られたリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞（HL-LEC）の遺伝子発現プロファイルより17の疾患関連候補遺伝子が挙がっておりその機能解析を行う。本年はそのなかでも代表的な転写因子である遺伝子Xについて機能解析を行う。リンパ管腫由来リンパ管内皮細胞の不死化細胞においてshRNAを用いて発現を抑えるモデルを作成する。また市販の不死化リンパ管内皮細胞に遺伝子Xを導入し、強制発現モデルを作成する。

またその他の候補遺伝子の発現確認、特異抗体の選定等を順次行っていく。

リンパ管腫患者由来細胞の大規模遺伝子発現スクリーニング

正常リンパ管内皮細胞 (N=6) リンパ管腫由来細胞及び不死化細胞 (N=15)

（倫理面への配慮）

この研究は既に診断治療目的で採取された「人体から採取された試料等」を用いるが、研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し十分な理解（インフォームドコンセント）を得た上で実施されるものであり、その「保存、利用」や「人権擁護」については厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」に準拠しており、すでに研究計画は

各研究施設の倫理審査にて承認を得ている。

また本研究の一部は遺伝子解析研究であるが、これは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）等の規定に基づいて計画され、研究計画は倫理委員会の議を経て承認されている。研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し十分な理解（インフォームドコンセント）を得た上で実施される。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないように配慮が充分になされ、対象（患者およびコントロール）となる個人の人権擁護が充分になされている。

また動物実験研究も行われるが、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に則った研究であり、動物の苦痛の除去に十分に配慮された適正なものとして各施設において厳正に審査の上承認されている。

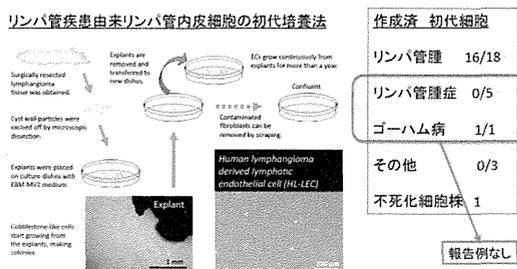
上記のごとく現計画では倫理問題に抵触する研究は含まれないと考えられるが、研究計画は施行後も各研究施設の倫理審査委員会により、定期的な監査・モニタリングがおこなわれる。

C. 研究結果

先天性リンパ管疾患病変の生検及び切除術より余剰組織を用いて初代培養細胞株の作成を行った。平成 26 年度前半には新たな組織検体を得られず、その後続くべき研究に影響を与えたが、後半にはリンパ管腫（嚢胞性リンパ管奇形）3 例、ゴーハム病 1 例の組織検体を得ることが出来た。これらよりそれぞれリンパ管内

皮細胞、線維芽細胞を得ることができた。

1 各疾患由来初代培養株の作成



研究ソースとして症例毎に採取、初代培養細胞株作成を続ける

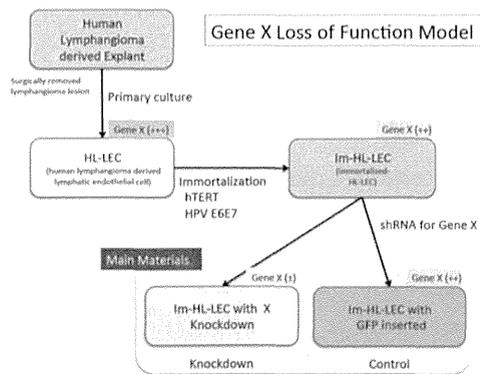
3 疾患関連候補遺伝子の機能解析と治療への応用

リンパ管腫由来全株で共通して正常細胞と異なる発現→17遺伝子
(未発表につき遺伝子名は記載しません)

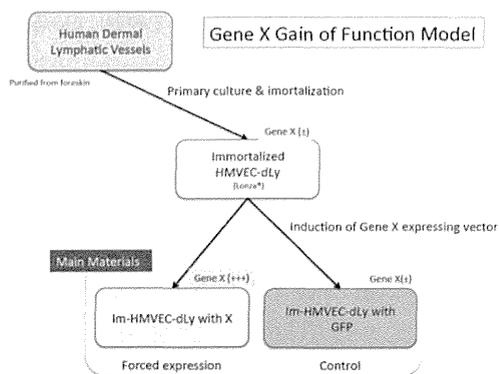
正常リンパ管内皮細胞株への遺伝子導入、及びノックダウンによる*in vitro*解析を開始

疾患発病との関連を示唆する転写因子を解析中。治療ターゲットとなりうるポイントを検討している。

平成 26 年度までに得られたリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞（Human lymphangioma derived lymphatic endothelial cell, HL-LEC）株の遺伝子発現解析より疾患関連候補遺伝子 17 個が挙げられていたが、それらにつき検討を開始した。もっとも有力視している遺伝子 X は HL-LEC において共通して発現レベルの高い転写因子であるが、HL-LEC の不死化細胞（Im-HL-LEC）において shRNA により遺伝子発現を抑えた細胞モデルを作成した。



一方、正常リンパ管内皮細胞 (Normal LEC) の不死化細胞 (Immortalized HMVEC-dLy, Lonza) に遺伝子 X を強制発現するモデルを作成中である。すでに Lentivirus を用いての遺伝子導入がなされ、細胞の安定増殖を待って、解析を開始する段階になっている。



これらの Gain of function と Loss of function モデルを用いて遺伝子 X のリンパ管内皮細胞における機能を解析していく。

またその他の候補遺伝子については発現の検証、特異抗体の評価を開始しており、順次解析を進め始めている。

D. 考察

いずれも難治性である本研究の対象疾患の治療改善のためには、病態の理解が必須であるが、稀少疾患であることもその発展の障害となっている。本研究では疾患由来の組織を効率よく収集して、外科的切除検体より疾患由来細胞株を作成することが重要なステップとなる。分担研究者らは、本研究班結成前よりこの課題に取り組んできた。その結果、疾患由来リンパ管内皮細胞株を樹立する方法が確立された。今年新たにゴーハム病より得られた組織から線維芽細胞株が得られたことは大きな成果と考えられる。

これまでに得られたリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞 (HL-LEC) より遺伝子発現プロファイルがマイクロアレイを用いて検索され、正常リンパ管内皮との比較の結果 17 遺伝子が明らかに発現レベルが異なることが分かっており、疾患との関連が強く疑われる。本年はそのなかでも代表的な転写因子である遺伝子 X について機能解析が開始された。shRNA を用いて発現を抑えるモデルが作成され、また強制発現させるモデルを作成中であり、今後解析が行われる。この遺伝子が発症のメカニズムと関連があることがわかれば、治療ターゲットとして新たに方策を考えていきたい。その他にも既に挙げられた候補遺伝子は順次検討していく。いずれかが診断マーカーとして、又治療ターゲットとして意義のある遺伝子であることを強く見込んでいる。

E. 結論

リンパ管疾患由来初代培養細胞株作成においては、当初予定より得られるリンパ管疾患の組織検体数が少なかったが、平成 26 年度後半より臨床検体を元に細胞株が作成された。特に非常に稀なゴーム病より得られた組織及び細胞は今後の検討に特に重要であると考えられる。

ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞を用いて疾患関連候補遺伝子の機能解析が開始された。1 番手として有力な転写因子である遺伝子 X につき、機能解析細胞モデルが作成された。また順にその他の有力な遺伝子のスクリーニングを開始している。いずれの遺伝子も疾患と何らかの関連があると考えられており、今後、診断におけるマーカーや治療のターゲットとしての可能性を調べていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) 藤野明浩, 高橋信博, 石濱秀雄, 藤村匠, 加藤源俊, 富田紘史, 渕本康史, 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 46(2): 105-110, 2014
- 2) 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 46(6):635-638, 2014.
- 3) 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 46(11):1181-1186, 2014.

2.学会発表

- 1) 高橋正貴, 藤野明浩, 黒田達夫, 他. 難治性リンパ管腫症 (lymphangiomatosis) 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, 京都)
- 2) 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 9-11, 長崎)
- 3) 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)
- 4) 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, 横浜)
- 5) 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 25 日, 広島)
- 6) 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)

3.その他

☆講演

- 1) 藤野明浩. リンパ管腫・血管腫. 第30回日本小児外科学会卒後教育セミナー (2014年5月11日, 大阪)

- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告

③ 先天性リンパ管疾患治療開発への応用

- ★ 疾患特異的 iPS 細胞の作成
- ★ リンパ管腫由来細胞に対する薬剤効果の解析

担当責任者

梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所再生医療センター センター長

藤野 明浩

慶應義塾大学医学部外科学（小児） 講師

研究要旨

【研究目的】

先天性リンパ管疾患は、原因不明で有効な治療法が存在しない稀少な難治性疾患が多く、患者 QOL に非常に大きな支障を来す。委託業務③先天性リンパ管疾患治療開発への応用の項目「疾患特異的 iPS 細胞の作成」「リンパ管腫由来細胞に対する薬剤効果の解析」は対象疾患に対する薬物治療の道を開くために必須の研究である。

【研究進捗状況】

「疾患特異的 iPS 細胞の作成」は本年度はその材料となる各リンパ管疾患由来細胞が年度前半に確立されなかったため、遅れている。特にリンパ管腫症とゴーハム病につき iPS 細胞の有用性があると考えられる。

「リンパ管腫由来細胞に対する薬剤効果の解析」についてはリンパ管腫（嚢胞性リンパ管奇形）に対する治療薬である OK-432、漢方薬を中心に現時点で有効可能性の報告がある薬剤についてリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞を用いて検討を行っている。

【結論】

疾患特異的 iPS 細胞樹立の作業は材料となる検体不足のためまだ開始されていない。リンパ管疾患に対する薬物効果の検討は培養細胞を用いて開始された。OK-432 を中心として作用機序と共に有効な薬剤、使用法の検討が開始された。データを積み重ねて、他方で進んでいる疾患モデル動物が作成された後、in vivo 実験へ移行していく。

研究協力者

高橋正貴

国立成育医療研究センター外科医員

同センター生殖・細胞医療研究部共同研究員

加藤源俊

慶應義塾大学医学部外科学（小児）助教

A. 研究目的

先天性リンパ管疾患は、原因不明で有効な治療法が存在しない稀少な難治性疾患が多く、患者 QOL に非常に大きな支障を来す。しばしば鑑別診断が困難であり、小児関連各科が診療に難渋する。様々なリンパ管疾患が混同され診断・治療を困難にしている面もみられ、これらを整理し関連各科共通の診断基準・診療ガイドラインを作成する事は今後この領域の疾患の医療の質を高める上で避けることはできない。国際的にもそういう大規模な試みは過去に認められず意義が大きい。

当分担研究は、5年来厚生労働科研費難治性疾患克服研究事業で進められてきた難治性疾患研究（平成 21-23 年度難治性疾患等克服研究事業「日本におけるリンパ管腫患者（特に重症患者の長期経過）の実態調査及び治療指針の作成に関する研究」藤野班、平成 24-25 年度「小児期からの消化器系希少難治性疾患群の包括的調査研究とシームレスなガイドライン作成」田口班、平成 24-25 年度「リンパ管腫症の全国症例数把握及び診断・治療法の開発に関する研究班」小関班）を再編したもののひとつに相

当する。

当研究計画の3年間の業務項目は、大きく以下の4点で示される。

- ①総括
- ②先天性リンパ管疾患診断技術の改良
- ③先天性リンパ管疾患治療開発への応用
- ④臨床データ収集・管理、情報の発信

研究対象の疾患の克服においては基礎研究成果の診断・治療への応用が必須である。リンパ管の基礎研究は急速に発展しているが、当対象疾患の臨床寄りの基礎研究は少ない。その中で本研究班の研究責任・分担者は本研究班結成以前より対象疾患の基礎研究を進めてきた。その成果として既にリンパ管疾患検体収集、疾患別初代培養細胞作成のシステムが確立されており、これらを利用して病理組織検体による診断マーカーの探索、各種初代培養細胞作成、疾患別 iPS 細胞を用いた生物学的検討や疾患関連遺伝子解析、ゲノム解析による原因遺伝子探索を進める。各研究計画の倫理審査は既に終了している。

結果は診断・創薬開発、予防等に直結すると考えられる。長期展望として10年以内に各リンパ管疾患特異的モデル動物を作成し、戦略的に治療法を開発することを見込む。

委託業務③先天性リンパ管疾患治療開発への応用の項目「各疾患由来初代培養株の作成」「疾患関連候補遺伝子の機能解析」は当疾患の研究における生物学的研究の基盤をなすものであり、最終的に新たな治療へ発展させるためのシーズを発掘することが目的である。

B. 研究方法

稀少疾患である対象疾患の検体を得る機会は少ない。本研究チームではすでに形成しているネットワークにて検体採取機会（生検もしくは切除術）を効率よく得ることが出来る。得られた組織は連結可能匿名化の上、初代培養細胞の作成を行う。これは国立成育医療研究センターおよび慶應義塾大学医学部で行う。

★ 疾患特異的iPS細胞の作成

得られた各疾患由来細胞は選択の上、iPS細胞化する。疾患の特徴からリンパ管腫（嚢胞性リンパ管奇形）より、リンパ管腫症とゴーハム病につきiPS細胞の有用性があると考えられる。これらの疾患はまだ病因解明の糸口すらない状態であるが、病変由来のiPS細胞に疾患特徴があるのであれば有用な材料となる。

★ リンパ管腫由来細胞に対する薬剤効果の解析

現在までに得られているヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞、同不死化細胞、市販の皮膚由来リンパ管内皮細胞等を用いて、OK-432、ブレオマイシン、プロプラノロール、ステロイド、インターフェロン、ジルデナフィル、シロリムス、サリドマイド、また漢方薬の越婢加朮湯、黄耆建中湯等の煎じ薬の *in vitro*での直接効果を検討する。

（倫理面への配慮）

この研究は既に診断治療目的で採取された「人体から採取された試料等」を用いるが、研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し充分な理解（インフォームドコンセ

ント）を得た上で実施されるものであり、その「保存、利用」や「人権擁護」については厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」に準拠しており、すでに研究計画は各研究施設の倫理審査にて承認を得ている。

また本研究の一部は遺伝子解析研究であるが、これは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）等の規定に基づいて計画され、研究計画は倫理委員会の議を経て承認されている。研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し充分な理解（インフォームドコンセント）を得た上で実施される。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないように配慮が充分になされ、対象（患者およびコントロール）となる個人の人権擁護が充分になされている。

また動物実験研究も行われるが、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に則った研究であり、動物の苦痛の除去に十分に配慮された適正なものとして各施設において厳正に審査の上承認されている。

上記のごとく現計画では倫理問題に抵触する研究は含まれないと考えられるが、研究計画は施行後も各研究施設の倫理審査委員会により、定期的な監査・モニタリングがおこなわれる。

C. 研究結果

★ 疾患特異的 iPS 細胞の作成」は本年度はその材料となる各リンパ管疾患由来細胞が年度前半に確立されなかったため、本年度は材料がなく開始出来なかった

が、今後行っていく。

★ リンパ管腫由来細胞に対する薬剤効果の解析

特に OK-432 については本邦開発薬であり、詳細に検討したが、OK-432 は内皮細胞にエンドサイトーシスにより数時間で取り込まれ処理されることが明らかとなった、また細胞増殖には影響を与えるため今まで知られていなかった内皮細胞への直接障害作用があると考えられた。

他に、ブレオマイシン、シロリムスは細胞増殖への影響（抑制効果）があり、臨床的にも有効である可能性が示された。

漢方薬（越婢加朮湯、黄耆建中湯）の煎じ薬（decoction）は細胞への直接作用はほとんど検討されたことがない。そのため研究自体も手探りであるが、もともと利尿作用を示す薬であるため、内皮細胞シートの透過性への影響を中心に現在検討を続けている。

D. 考察

疾患由来 iPS 細胞樹立は難治性稀少疾患であるリンパ管腫症・ゴーラム病において非常に有用であると考えられる。本年度は良い検体を得られなかったため、作業は開始していないが、来年度以降の重要な課題として残る。

リンパ管腫由来細胞に対する薬剤効果の解析は現時点で使用されている薬剤の効果発現機序の検討によりより効率的な使用法を導き出すことと、現在効果についてコンセンサスが得られていない薬剤についてまずは *in vitro* での効果を確認

することを目的としており、漢方薬を含めいくつかの薬剤はリンパ管内皮細胞に対して直接効果を示すことが分かった。結果をまとめて論文化すると共に、同時に進行している動物モデル作成の後には直ちに *in vivo* 実験へ移りたい。

E. 結論

疾患特異的 iPS 細胞樹立の作業は材料となる検体不足のためまだ開始されていない。リンパ管疾患に対する薬物効果の検討は培養細胞を用いて開始された。OK-432 を中心として作用機序と共に有効な薬剤、使用法の検討が開始された。データを積み重ねて、他方で進んでいる疾患モデル動物が作成された後、*in vivo* 実験へ移行していく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤野明浩, 高橋信博, 石濱秀雄, 藤村匠, 加藤源俊, 富田紘史, 瀧本康史, 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 46(2): 105-110, 2014
- 2) 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 46(6):635-638, 2014.
- 3) 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 46(11):1181-1186, 2014.

2.学会発表

- 1) 高橋正貴, 藤野明浩, 黒田達夫, 他. 難治性リンパ管腫症 (lymphangiomatosis) 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, 京都)
- 2) 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 9-11, 長崎)
- 3) 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)
- 4) 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, 横浜)
- 5) 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 25 日, 広島)
- 6) 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)

3.その他

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし