

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（H22-難治-一般-154）分担研究報告書

「リンパ浮腫治療への breakthrough を目指して」に関する研究

研究代表者 福田尚司 国立国際医療研究センター 心臓血管外科医長

研究分担者 福田尚司 国立国際医療研究センター 心臓血管外科医長

研究要旨

リンパ浮腫に罹患し、QOLが低下している患者は原発および2次性を合わせると10万人近い。厚生労働省の難病研究班の報告にあるように、現在までに有効な治療法が確立されていない。現実的には、医師サイドも半ばあきらめ状態である。私たちは現在までに、この疾患に対し比較的積極的に対応してきたが、この経験の中で、抗血小板療法としてシロスタゾールを投与したリンパ浮腫患者に、症状の寛解が見られた症例を経験した。これは、PDE₃(cGMP-inhibited phosphodiesterase)阻害作用による、リンパ管内皮細胞活性化効果の影響が関与していると推測している。この推測を検証すべく、今研究の実施を計画した。

研究は臨床研究と基礎研究パートに分かれる。前者では、後述する倫理的配慮を充分に行いながら、理学所見、皮膚毛細血流、CTおよびシンチグラフィにて治療効果を判定する。また、後者では、動物実験規定に則り、ヒトリンパ管内皮細胞、トランスジェニックリンパ浮腫マウスおよびマウスリンパ浮腫モデルを用い、今仮説の検証および作用機序の同定を行う。

1. 目的

リンパ浮腫は100年以上におよぶ治療法開発の経緯があるが、現在に至ってさえも有効な治療法がない。

原発性リンパ浮腫の原因は未解明で、その患者は5千人¹⁾と推定されている。一方、癌外科の進歩に伴い、癌手術症例数は増加してきている。このため、癌術後患者におけるリンパ浮腫が増加し、2004年、上山は上肢リンパ浮腫患者は5

万人、下肢リンパ浮腫患者は7万人と推定している²⁾。

治療法は弾性ストッキングの着用や、リンパドレナージのためのマッサージ、時に、リンパ管・細静脈吻合術が行われるが、いまだ根治的に有効な治療法は確立されていない。

症例報告ではリンパ浮腫にシロスタゾールが効果的であったという報告³⁾が見られ、同薬剤のPDE₃阻害作用による内

皮細胞活性化効果が期待される。当科でも、同薬剤が2次性リンパ浮腫患者の症状緩和に、効果を示す症例を経験した。これは、同薬剤の持つ、抗血小板作用ばかりではなく、PDE₃(cGMP-inhibited phosphodi- esterase)阻害作用による、内皮細胞活性化効果の影響と推測できる。リンパ浮腫が改善する機序について、分子レベルで明らかにすることが可能であれば、臨床的に、より効率的で有用なリンパ浮腫の治療法の確立が可能になる。

今研究では、原発性および2次性リンパ浮腫患者を対象に、シロスタゾールを投与し、その効果を検討する。また、細胞および動物実験において、その作用機序を明らかにし、作用増強因子についても検討する。

2. 方法

2.1 研究期間

2010年4月から2年間

ただし、研究終了前に治療の有効性が明らかになった場合、研究は中止され、全ての患者に今研究対象治療を行う可能性がある。

2.2 対象

国立国際医療研究センターにおいてリンパ浮腫と診断された患者を対象に登録目標患者数50名とする。

現在、治療に関するデータが全く存在しないため、少ないが自身の経験から、対象群の改善率を多く見積もり10%、シロスタゾール群の改善率を50%、 α エラー0.05、パワー0.8として

Chi-square 検定を行った場合、2群においてそれぞれ25例ずつを要する。
(Yates 補正施行)

2.3 選択基準

国立国際医療研究センターに通院可能あるいは入院治療を受けるリンパ浮腫患者また、下記の条件を満たす患者。

- (1) 継続して薬剤の投与が可能である
- (2) 年齢20歳以上の日本人
- (3) 研究内容やリスクを理解できる

2.4 除外基準

- (1) 担癌状態の患者
- (2) 著しい出血傾向を伴う患者
- (3) 頻脈性不整脈あるいは高度の狭心症患者
- (4) 既に aspirin あるいはシロスタゾールを内服している患者
- (5) その他、主治医が不適格と判断した患者

2.5 同意取得に関する事項

2.5.1 臨床研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針の遵守および動物実験に関する倫理指針

本研究はヘルシンキ宣言(2008年ソウル改訂)の趣旨、臨床研究に関する倫理指針(平成15年7月30日発布、平成16年12月28日全部改正、平成20年7月31日全部改正、厚生労働省)および疫学研究に関する倫理指針(平

成 14 年 6 月 17 日 発 布、 平 成 16 年 12 月 28 日 全 部 改 正、 平 成 17 年 6 月 29 日 一 部 改 正、 平 成 19 年 8 月 16 日 全 部 改 正、 平 成 20 年 12 月 1 日 一 部 改 正) に 基 づ いて 実 施 する。 本 研 究 で 使 用 さ れ る 研 究 実 施 計 画 書 お よ び 同 意 説 明 書、 同 意 書 は、 国 立 国 際 医 療 セ ン ター 倫 理 委 員 会 に よ り 承 認 さ れ た も の で あ る。

2.5.2 被験者への同意説明および同意書の取得

担当医師は研究に先立ち、必ず被験者に対し本研究の背景、目的、予想される利益と危険性について十分に口頭および文書で説明を行う。

特に、使用される 2 薬剤がリンパ浮腫に適応がない点、また、その効果についても証明されておらず、全く効果の無い可能性も否定はできない、といった不利益があることを伝える。しかし、同 2 薬剤は既に世界中で使用されているもので、その副作用は通常の薬剤のそれと同等で、許容範囲内と考えられ、また、確立された治療法の存在しない今疾患において、症状が軽減され、あるいは、根治されたならば、その利益は前述の不利益を大きく上回る可能性があることも同時に伝える。また、今研究により引き起こされたと考えられる有害事象に対しては、主任研究者があらかじめ契約した、第 3 者機関である保険会社による研究保険から、その保障が行われることを伝える。

説明後、被験者が説明内容をよく理解したことを確認した上で、本研究への参加についての同意を文書で得る。

さらに被験者はいつでも自由意志により本研究の参加を撤回できることを知らせておく。

2.5.3 被験者のプライバシーの保護

本研究に際して、被験者のプライバシーは十分に保護される。

2.6 研究デザイン

研究の内容を説明し、同意の得られた患者を登録する。

以下のデータを、患者が起床して最低 6 時間以上経過、かつ、その間、患者が通常的生活活動を行った場合に限りデータ収集する。

- ① 面談により症状を聴取、両下腿（上腿）径（脛骨あるいは尺骨中樞端から 20 cm 遠位側の部位）を測定する。
- ② 同部位において皮膚毛細血管血流を測定する。
- ③ 単純 CT を施行し、同部位の皮下組織の厚さと面積を測定する。
- ④ また、造影 CT にて深部静脈血栓症、下大静脈血栓症、静脈瘤、動脈瘤、骨盤内占拠物などの有無を確認し、リンパ浮腫の診断を確定する。
- ⑤ リンパ浮腫が強く疑われた患者に対し、リンパ管シンチグラフィを施行し、確定診断を得、また、下腿における単位面積当たりの RI 集積濃度を測定し、リンパ液うっ滞の重症度の指標とする。

リンパ浮腫の診断方法は、四肢に腫脹の訴えを持ち、腎機能および心機能

障害、低アルブミン血症、深部静脈血栓症が否定された患者で、リンパシンチグラフィの結果がリンパ流のうっ滞を示すもの、とする。

リンパ浮腫と診断された患者を2群に分け、それぞれの患者群に aspirin (バィアスピリン 100 mg/day)、シロスタゾール (プレタール 200 mg/day) を無作為に割り付ける。両群とも、研究参加者は全て開始当初1ヶ月間のみは電動式波動型末梢循環促進装置を使用する。

前述の①から⑤のデータを、治療開始から1ヶ月後および6ヶ月後の時点で繰り返し収集する。

2群間におけるデータ解析を行い、薬剤の優位性を明らかにする。また、効果増強因子についても検討する。

研究計画の公表、薬剤の無作為割り付けなどは、大学病院医療情報ネットワークを介して行うものとする。この際の割り付け因子は、BMI(body mass index)、腎機能障害の有無、心機能障害の有無、の3項目とする。

2.7 評価項目

2.7.1 主要評価項目

痛み、CTにける下腿（上腿）皮下組織面積、皮膚毛細血管血流、リンパ管シンチグラフィによるリンパ浮腫の程度

2.7.2 副次評価項目

痛み以外の自覚症状の改善の有無
色素沈着、皮膚潰瘍の改善

2.8 統計解析

解析は今研究に参加している医療統計専門家によって行われる。

治療群および対象群において、痛み、下腿（上腿）皮下組織面積、皮膚毛細血管血流、リンパ液うっ滞の程度における有意差の有無を検討する。

2.9 調査項目

2.9.1 患者背景

(1) 患者背景：

年齢、性別、身長、体重、既往、リンパ浮腫の罹患期間

(2) 危険因子：

癌手術の有無、日常生活様式（立位や歩行の時間や距離など）

栄養状態、腎機能障害の有無、糖尿病の有無

ステロイド剤使用の有無

2.9.2 痛みの評価

VAS (visual analogue scale)による
検者は盲検化

2.9.3 下腿（上腿）における皮下組織の断面積測定評価

起床から6時間以上経過し、通常の日常生活を送っている環境下で、CTを用い測定する。

CTにおける皮下組織面積測定は、盲検化された第3者検者により行われる。皮下面積測定部位は、腓骨（尺骨）近位端から10cmおよび20cm遠位側にて行われる。（CT; Aquilion ONE, TOSHIBA, Japan. Software; ZIO-STATION2, AMIN, Japan）その比較

は、健側肢の同レベル皮下組織面積を基に計算される。

2.9.4 皮膚毛細血流障害の評価

浮腫による皮膚の過伸展によって起こる皮膚血流障害の指標とし、皮膚かん流圧(SPP; skin perfusion pressure)を用い計測する。(SensiLase™, PAD3000, VASAMED Inc, U. S.)

2.9.5 リンパ管うっ滞の程度評価

リンパ管シンチグラフィを用い、治療前後において RI の集積濃度を比較することにより、リンパ流のうっ滞の程度測定する。

2.9.6 リンパ管以外の原因の検索

CT により行う。(深部静脈血栓症、下大静脈血栓症、静脈瘤、動脈瘤、骨盤内占拠物などの否定。)

血液検査により低アルブミン状態や腎不全状態の有無を確認する。

胸部レントゲン写真や心臓超音波検査から心源性浮腫を否定する。

2.10 費用・資金

必要経費に関する資金は厚生労働省科学研究費(平成 22-難治-一般-154)から支払われる。

今研究における薬剤による有害事象に対しては、その保障を研究保険でまかなうものとし、保険料は研究費から支出する。

3. 結果

2011年2月時点の結果であるた

め、患者数14名、6か月の観察期間満了者は2名のみであるため、ここでは14名の結果のうち1ヶ月後の結果のみを提示する。

患者背景において、2群間の有意差を認めないが、アスピリン群に比ベシロスタゾール群でややリンパ浮腫罹患期間が長い傾向を認めた。(表1)

患側肢の疼痛評価をVASにより示す。両群間における有意差は認めないが、両群とも治療後の疼痛が軽減する傾向を認めた。(表2)

また、患側肢における皮膚かん流圧測定では、両群および治療前後で差を認めなかった。(表3)

CT における治療前後の皮下組織面積の変化を表4に示す。

4. 考察

今研究は、1次性および2次性リンパ浮腫に対する、治療効果、つまり、患肢の容積減少を主要評価項目としたランダム化比較試験である。

ここでの報告は、試験開始から8か月までのデータを基に作成された中間報告であるため、絶対的な結論は今のところ導き出せない。しかし、いくつかの興味深い結果を得た。

まず、表4に示すように、今研究でリンパ浮腫と診断された患者で、研究参加後4週を超えた患者13人においては、シロスタゾール群では7人中5人が、アスピリン群では6人中3人が、浮腫に対する一定の改善効果を示している。2009年に出版されたリンパ浮腫治療の Consensus document⁴⁾で

は、複合治療の有効性が述べられている。今研究の治療プロトコールでは、当初の1か月間は内服および電動式波動型末梢循環促進装置の使用を行い、その後内服のみの治療に移行する。つまり、当初1か月間の治療効果は薬剤並びに電動式波動型末梢循環促進装置によるものと考えられる。ただし、両群間の差は薬剤によるものと推測できる。

類難治性疾患と捉えられ、世界中でその治療に難渋している疾患のひとつであるリンパ浮腫に対し、治療対象患者の半数以上に一定の改善効果が認められたという事実は、少なからずインパクトを感じざるを得ない。

リンパ浮腫の主要症状のひとつである疼痛を、VASを用いて評価した。治療前に浮腫による疼痛を訴えていた

10人において、治療1か月後では8人にVAS上の改善を認めた。皮下組織面積の変化が無い症例でも、VAS上の改善を認める場合があった。同症例ではSPPの増加を認めた。皮下組織面積の変化は認めないが、浮腫による皮膚の伸展刺激が緩和され、VASの改善につながり、また、皮膚に緊満性が緩和されたためSPPが増加したと考えることも可能である。

データには示さないが、リンパ浮腫の発症時期は、原因と考えられる外科的治療後、しばらく経過してからの発症が多くみられた。その期間は、数カ月から数年の場合も認められた。

いずれにしても、予定登録患者数である50名の全データが待たれる。

5. 結語

今研究は、1次性および2次性リンパ浮腫に対する、治療効果、つまり、患肢の容積減少を主要評価項目としたランダム化比較試験である。

今回、予定登録患者数50名のところ、14名分のデータを基にした中間報告を行った。

リンパ浮腫に対する治療において、一定の効果が期待できる可能性が示唆された。

今回の治療に対し、良好な効果を認めた症例以外に、効果不十分な、治療に対する抵抗性を持つと考えられる症例の存在が認められた。

6. 参考文献

- 1) 厚生労働省難病研究班(2009): 難病研究班報告 原発性リンパ浮腫
- 2) 上山武史(2004): リンパ浮腫治療に対する社会認識の現状と今後の課題、リンパ浮腫診療の実際—現状と展望、文光堂、130.
- 3) 増澤幹男ら(2001): フィラリア症による慢性リンパ浮腫と重症リンパ漏、日本皮膚科学会雑誌:111(2), 179-83
- 4) The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema: 2009 consensus document of the International Society of Lymphology. Lymphology. 2009;42:51-60.

7. 健康危険情報

なし

8. 研究発表

なし

9. 知的財産の出願・登録

なし

10. 表

表 1 患者背景

	シロスタゾール 群	アスピリン群
患者数(人)	8	6
男性数(人)	1	1
BMI	24.2	26.2
腎不全患者数(人)	0	0
心不全患者数(人)	0	0
リンパ浮腫罹患期間(年)	6.5	4.3
蜂窩織炎の既往がある患者数(人)	3	4
関連手術の既往がある患者数(人)	7	4

BMI; body mass index

表 2 疼痛の評価 (VAS)

	シロスタゾール	アスピリン	T テスト
平均 VAS(治療前)	20.0	19.5	NS
平均 VAS(治療後1か月)	7.3	8.2	NS
T テスト	p=0.26	p=0.14	—

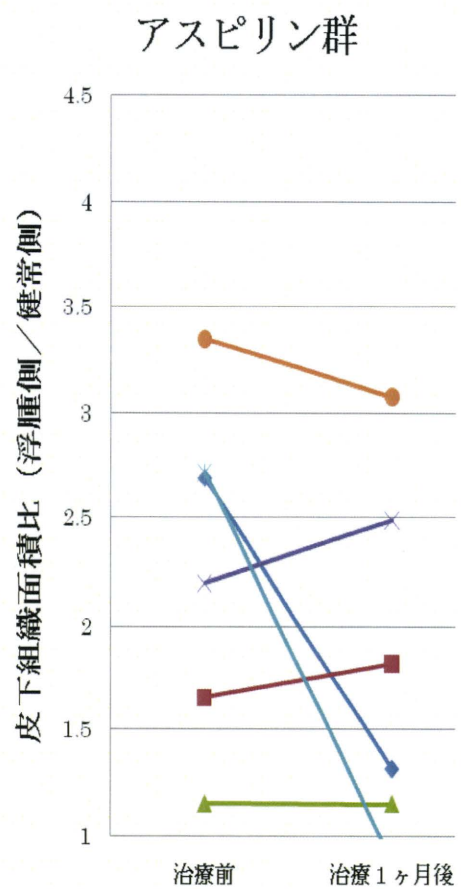
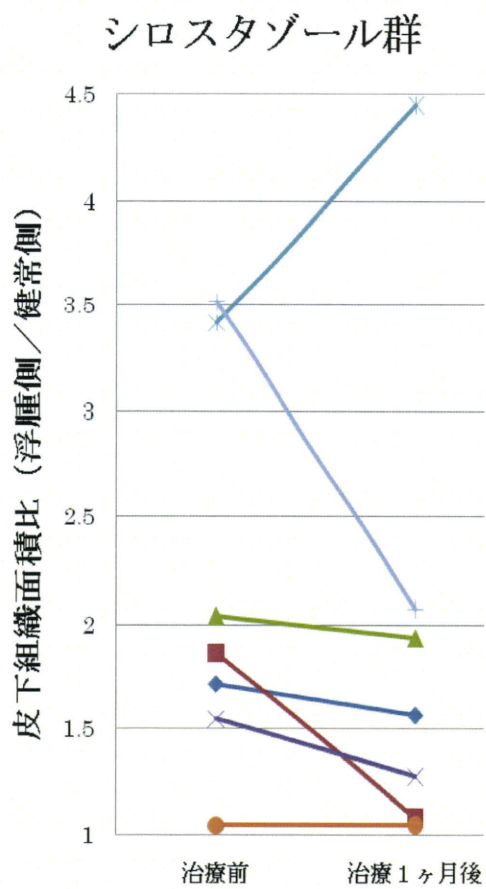
NS; no significant difference

表 3 皮膚かん流圧 (SPP)

	シロスタゾール	アスピリン	T テスト
平均 SPP(治療前)	72.8	65.4	NS
平均 SPP(治療後1か月)	72.3	72.0	NS
T テスト	NS	NS	—

NS; no significant difference

表4 皮下組織面積の変化



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） （H22-難治-一般-154）分担研究報告書

「リンパ浮腫治療へのbreakthroughを目指して」に関する研究

研究代表者 福田尚司 国立国際医療研究センター 心臓血管外科医長
研究分担者 記村貴之 国立国際医療研究センター研究所 細胞組織再生医学研究部
研究分担者 浜崎辰夫 国立国際医療研究センター研究所 細胞組織再生医学研究部

研究要旨

[背景・目的] シロスタゾールは抗血小板作用、血管拡張作用を有する薬剤として知られているが、リンパ管に対する作用はこれまでに報告がない。我々の予備的臨床データによるとリンパ浮腫患者に投与した場合一定の効果がみられたことからリンパ管内皮細胞において薬理作用を有することが推定された。従ってシロスタゾールのリンパ管新生およびリンパ浮腫の病態改善に対する効果を明らかにする目的で研究を行った。[方法] ヒトリンパ管内皮の培養細胞をシロスタゾール存在下で培養し、細胞増殖に対する影響を検討した。また培養細胞を細胞外マトリックス上で培養し、管腔形成を評価した。さらにリンパ流障害をもつトランスジェニックマウスに対しシロスタゾール含有飼料を投与し、体重変化および生存率をみた。また野生型マウスの尾のリンパ浮腫モデルを作成し、シロスタゾール飼料を投与して浮腫の程度を経時的に評価した。[結果] リンパ管内皮細胞において、シロスタゾール添加により濃度依存的な細胞増殖効果がみられた。またシロスタゾール飼料を与えたトランスジェニックマウスでは明らかな体重の変化はみられなかったが死亡数が減少する傾向が認められた。更に尾のリンパ浮腫モデルマウスではシロスタゾール飼料を投与した群で浮腫の程度が軽減する傾向がみられた。[結論] シロスタゾールはリンパ管内皮細胞の増殖促進作用を有しており、リンパ浮腫を改善する傾向が認められた。

A. 研究目的

シロスタゾールは cGMP-inhibited phospho- diesterase (PDE₃) を選択的に阻害することで抗血小板作用、血管拡張作用を有する薬剤であり、慢性動脈閉塞症の治療や脳梗塞の再発予防に使用されている (1)。In vitro あるいは in vivo の実験により、血小板に対しては凝集抑制作用、血管平滑筋に対しては弛緩作用および増殖抑制作用を有することが報告されている (1, 2)。また血管内皮細胞の傷害に対し防御作用をもつという報告もある (1)。しかしこれまでにリンパ管にどのような影響を及ぼすかについては明らかにされていない。

リンパ浮腫の患者に対してシロスタゾールを投与することで症状の改善がみられた

という症例報告があり(3)、シロスタゾールがリンパ管に作用しリンパ浮腫の改善に寄与したことが推察された。本研究ではヒトリンパ管内皮の培養細胞とマウスのリンパ浮腫モデルを用いて、シロスタゾールのリンパ管内皮細胞に対する作用とそのメカニズム、さらにリンパ浮腫に及ぼす影響について解明することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. 細胞の増殖能

細胞培養は正常ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞（成人および新生児由来、いずれも Lonza）と微小血管内皮細胞培養キット（Lonza）を用いた。細胞培養キットに付属

する血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)を添加した群と非添加群に条件を分けて細胞培養を行った。また同様に付随する線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor, FGF)についても添加群と非添加群で培養条件の検討を行った。6 ウェルプレートにリンパ管内皮細胞を1 ウェルあたり 1.5×10^4 個播種し、その翌日にシロスタゾール(Wako) を最終濃度 $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, または $30 \mu\text{M}$ となるように添加した。またシロスタゾールのコントロールとして抗血小板薬の acetylsalicylic acid (ASA, Sigma)を $300 \mu\text{M}$ となるように添加した群、シロスタゾールの溶解液として用いた dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) のみ添加した群でも同様の培地条件で培養し、薬剤添加後 1、3、5、7、9 日目に細胞の計数を行った。細胞数の計測は、培養細胞に 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma) を1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 加え、 37°C で2分間インキュベートして細胞を剥離し、phosphate buffered saline (PBS) に懸濁し、Coulter Counter Z2 (BECKMAN COULTER) を用いて行った。

2. 細胞の管腔形成能

上記の成人由来の正常ヒトリンパ管内皮細胞を、マトリゲルマトリックスコート(日本ベクトン・ディッキンソン) 24 ウェルプレートに 2×10^5 個で播種して培養した。培地としては上記の微小血管内皮細胞培養キットから VEGF を除去したものをを用いた。細胞の播種と同時にシロスタゾールを $3 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ となるように添加して 24 時間後に細胞を顕微鏡で観察した。コントロールとしてシロスタゾールの溶媒である DMSO のみを添加したものをを用いた。

3. k-cyclin+/-トランスジェニックマウスにおけるシロスタゾールの効果

カポジ肉腫において発現している、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの遺伝子である k-cyclin を導入した k-cyclin+/- トランスジェニックマウス (Tg) では全身のリンパ管の走行異常がみられ、寿命が短くなることが報告されている (4)。このリンパ流障害

マウスに対して、0.1%シロスタゾールを含有する飼料あるいはコントロール飼料(いずれもオリエンタル酵母)を投与し、経時的な体重の変化と生存率を計測した。コントロールとして野生型 FVB/N マウス (WT) に対してもシロスタゾール含有飼料と非含有飼料の 2 群に対して体重の変化と生存率を計測した。マウスはいずれも生後 4-5 週齢のものをを用いた。

4. マウス尾のリンパ浮腫モデル

FVB/N の野生型マウスに対し、sevoflurane による全身麻酔下で、メスを用いて尾の基部の皮膚を 5mm 幅で全周性に剥離した。皮膚の剥離により皮膚のリンパ管が障害され、剥離部より遠位側に浮腫を生じることが報告されている (5)。これを術後リンパ浮腫のモデルとして、手術同日よりシロスタゾール含有飼料または非含有飼料の投与を行った。浮腫を生じた尾を経時的に写真撮影し、最大径の推移を測定した。

なお、全ての動物実験は、国立国際医療研究センター動物実験規程に従って、同センター動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 細胞の増殖能

成人由来のヒトリンパ管内皮細胞を播種した翌日にシロスタゾールまたは ASA を培地に添加し、その翌日を day1 として細胞数を計測した。VEGF を除去し、シロスタゾールまたは ASA を添加した培地で細胞培養を行い、経時的に細胞数を計測した。それぞれの群で薬剤添加後 1 日(day1)の細胞数を 1 として細胞数の平均値を用いてグラフを作製した (Fig.1)。シロスタゾール $30 \mu\text{M}$ の群では 3、5、7、9 日目で DMSO のみのコントロールと比較して有意に細胞数の増加がみられた ($P < 0.05$)。またシロスタゾール $10 \mu\text{M}$ の群では 7、9 日目で有意に細胞数の増加がみられた ($P < 0.05$)。シロスタゾール $1 \mu\text{M}$ の群では 9 日目でコントロールと比較し

て有意に細胞数の増加がみられた ($P<0.05$)。ASA 添加群では若干の増加傾向がみられたが、統計学的な有意差は得られなかった。それぞれの薬剤の濃度、日数についてそれぞれ3サンプルずつの独立した2回の実験を行った。誤差は標準偏差を用いた。

培地の条件を VEGF の有無と FGF の有無で 4 群に分けて細胞数を計測したところ、VEGF・FGF いずれも含む培地では細胞の増殖がみられ、またシロスタゾール投与により若干の細胞数の増加がみられた。また VEGF のみ含む培地でも同様にシロスタゾールの濃度により細胞数は若干増加した。VEGF・FGF いずれも除去した培地ではほとんど細胞の増殖がみられなかった。

新生児由来のリンパ管内皮細胞についても同様の培地の条件と薬剤添加の条件で細胞培養を行い、細胞数の計測を行った。VEGF・FGF 投与群と FGF を除去した群ではいずれもシロスタゾール投与による明らかな細胞数の変化はみられなかった。VEGF 除去群ではシロスタゾールの濃度依存的に細胞数の増加傾向がみられたが、その増加の程度は成人由来の細胞と比較すると小さな変化であった。

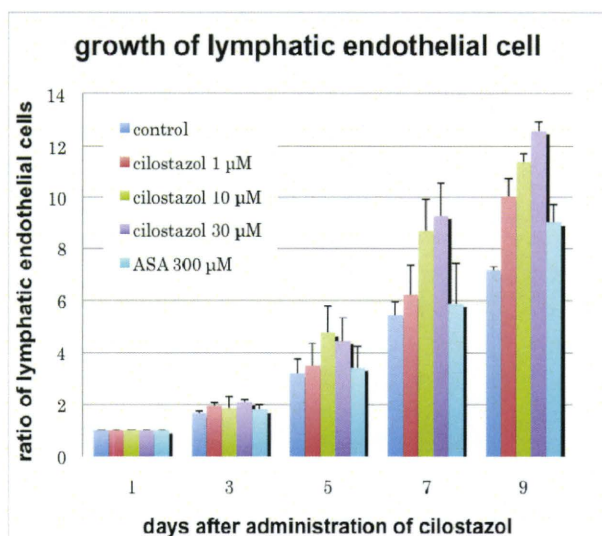


Fig.1 リンパ管内皮細胞のシロスタゾール投与後の経時的変化。シロスタゾールの濃度が $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $30\mu\text{M}$ と増すにつれて細胞数の増加がみられた。

2. 細胞の管腔形成能

ヒトリンパ管内皮細胞をマトリゲル上に播種しシロスタゾールを最終濃度 $3\mu\text{M}$ 、 $30\mu\text{M}$ となるように添加して 24 時間後に細胞を観察した(Fig.2 a-c)。シロスタゾール投与の有無にかかわらずいずれの群でも管腔形成はみられが、無添加群と比してシロスタゾール投与群では個々の管腔がやや小さく、数が多い傾向が認められた。



Fig.2a DMSO



Fig. 2b シロスタゾール $3\mu\text{M}$

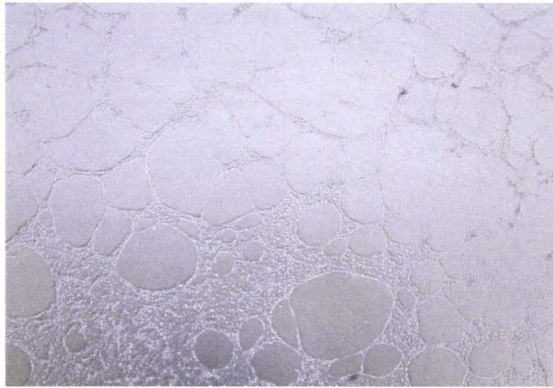


Fig. 2c シロスタゾール 30 μ M

3. k-cyclin+/-トランスジェニックマウスにおけるシロスタゾールの効果

Tg マウス、WT マウスに対して、それぞれシロスタゾール含有飼料または非含有飼料を投与し、体重を経時的に測定した。観察期間中に生存していた各群 6~8 匹のマウスについて、投与開始時の体重を 1 として体重の変化を Fig.3 に示した。体重の変化について、各群において明らかな差はみられなかった。

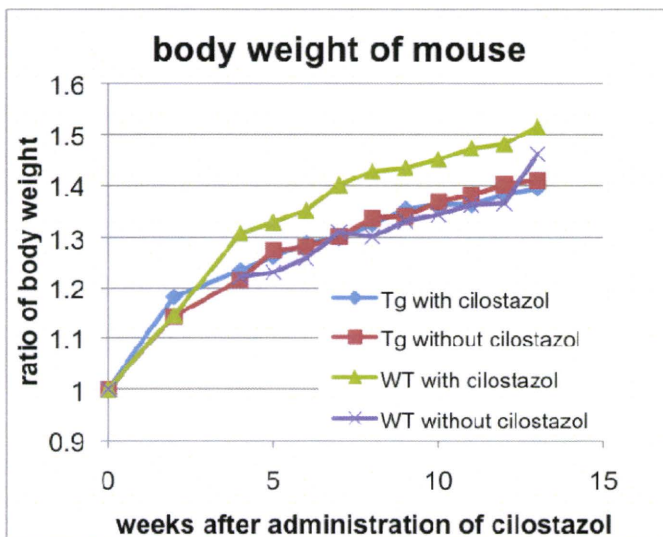


Fig.3 シロスタゾール投与後のマウスの体重の変化。Tg と WT、シロスタゾールの有無で明らかな差はみられなかった。

また 4~5 週齢の Tg マウス(それぞれ 10 匹ずつ)、WT マウス(シロスタゾール投与群、非投与群がそれぞれ 7 匹、5 匹)に対してシロスタゾール含有または非含有飼料を投与し、経時的な生存率を Fig.4 に示した。実験用飼料を投与開始後、シロスタゾール投与群の Tg マウスでは 16 週の段階で 1 匹の死亡が確認されたが、シロスタゾール非投与群では 2 週、6 週とより早期の死亡がみられた。Tg マウスに対し初めの 4 週間はシロスタゾール非投与で 4 週間以降はシロスタゾールを投与した群 (Tg cilostazol - \rightarrow +) では、シロスタゾール非投与期間中に 1 体死亡し、その後 16 週に 1 体の死亡が確認された。野生型マウスでは観察期間中に死亡したものはなかった。統計学的な差は得られなかったものの、シロスタゾール投与が生存率の改善に寄与することが示唆された。

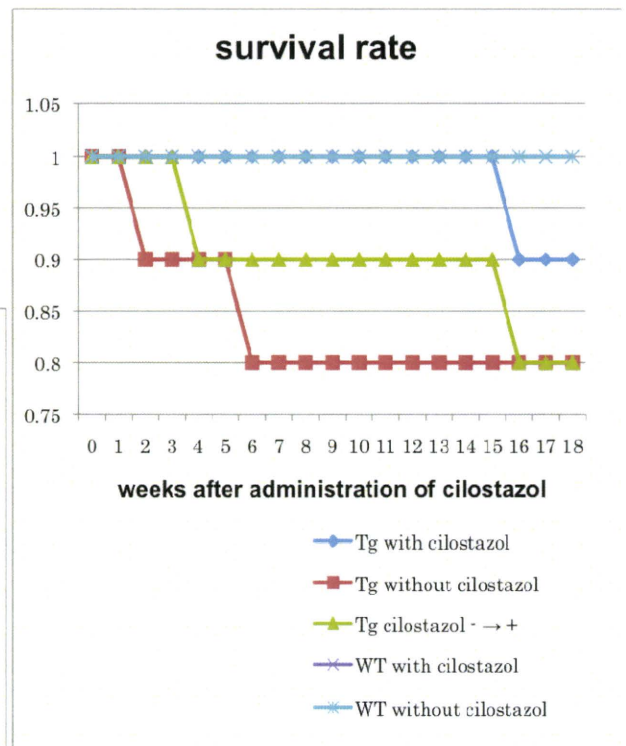
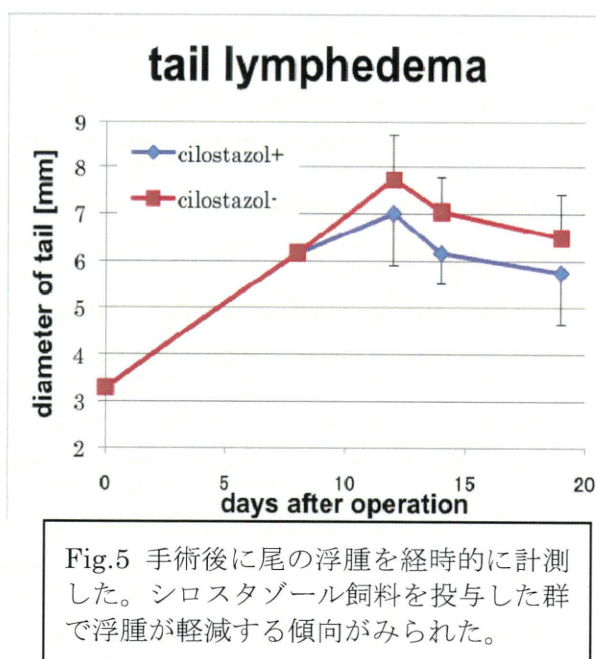


Fig.4 シロスタゾール投与後のマウスの生存率の変化。シロスタゾール投与群での死亡が少ない

4. マウス尾におけるリンパ浮腫モデル

マウスの尾に術後リンパ浮腫モデルを作成し、シロスタゾール投与群と非投与群それぞれ4匹ずつについて、腫脹した尾の直径を経時的に計測した。各群の直径の平均を算出してグラフを作成し、標準偏差をエラーバーで示した。いずれの群においても、手術後12日目に尾の直径は最大となり、その後緩やかに直径は減少した。統計学的な有意差は得られなかったものの、12日目以降はシロスタゾール投与群では非投与群と比較して尾の直径が減少し、腫脹が軽減する傾向がみられた。



D. 考察

ヒトリンパ管内皮細胞の増殖能についての培養条件の検討より、VEGF の存在下ではシロスタゾールの効果は限定的である一方、VEGF を除いた培地ではシロスタゾールによる有意な増殖促進効果が確認された。VEGF はリンパ管内皮細胞に発現した VEGFR3 を介して細胞の増殖に寄与することが知られている。本研究において VEGF の存在下でシロスタゾールの効果が限定的であったのは、VEGF の細胞増殖効果と比較してシロスタゾールの効果が相対的に小

さいためであったと推察される。また VEGF、FGF を除いた培地で培養したところ、シロスタゾールの濃度非依存的な細胞の増殖はみられず細胞は1週間以内に死滅した。このことから FGF、VEGF のうち少なくとも一方は細胞の増殖・生存に必要であり、シロスタゾールはこれらの増殖因子を代替することはできないが、これらの増殖因子の存在下で相加的に細胞増殖に寄与するものと考えられる。今後はシロスタゾールの細胞増殖促進作用が phosphodiesterase の阻害に由来するものであるのかについて、シロスタゾールの阻害薬を用いてさらに検討を行う。健康成人男子にシロスタゾールを100mg 経口投与した場合の最大血中濃度は約 $2\mu\text{M}$ とされており (1)、本実験の結果からは $1\mu\text{M}$ でも細胞増殖効果が示されており、現在医薬品として用いられている用量でも細胞増殖効果をもたらす濃度に達しうると考えられる。細胞外マトリックスを用いた管腔形成では、シロスタゾール処理群と非処理群では明確な変化は認められなかった。しかし今後、画像解析ソフトウェアなどを用いて詳細な検討を行うことで、違いが認められる可能性がある。また免疫組織染色、電子顕微鏡でリンパ管の構造についても評価を行う。またそれとともに細胞の遊走能についても併せて評価を行う予定である。

k-cyclin^{+/+}-マウスでは全身のリンパ管の障害のため浮腫を来すと考えられている。そこで体重を浮腫のエンドポイントとして用いたが、トランスジェニックマウスと野生型で有意な差は得られなかった。生存率についてはシロスタゾール投与群において改善の傾向がみられたためサンプル数を増やしてその傾向を明らかにすることが課題と考えられる。

一方、トランスジェニックマウスは遺伝的(先天的)な要因によりリンパ管異常を生じていることから、術後のリンパ浮腫をより反映したモデルとして野生型マウスの尾のリンパ浮腫モデルを用いた。この実験系では1~2週間で浮腫のピークに達したのち、徐々に浮腫が改善する。シロスタゾール投与群のマウスではピークに達した時期は同等であったがピーク時の腫脹の軽減がみられた。今回の観察期間では浮腫の改

善が促進されるかについての結論は出せないが、サンプル数を増やしてシロスタゾールの効果をさらに検証することが必要であると思われる。

E. 結論

ヒトリンパ管内皮の培養細胞を用いた実験系で、シロスタゾールは細胞の増殖を促進する効果を有することが確認された。また、リンパ流障害を有するトランスジェニックマウスに対して、シロスタゾールは生存率を改善する可能性があると考えられる。さらに尾のリンパ浮腫モデルマウスにおいて、シロスタゾールは浮腫を軽減する傾向が認められた。

F. 参考文献

1. プレタール錠 50mg・100mg、散 20% インタビューフォーム、大塚製薬
2. 高橋貞夫ほか：脈管学, 32(7), 651-655, 1992
3. 増澤幹男ら、フィラリア症による慢性リンパ浮腫と重症リンパ漏、日本皮膚科学会雑誌:111(2), 179-83
4. Sugaya M, et al. Lymphatic dysfunction in transgenic mice expressing KSHV k-cyclin under the control of the VEGFR-3 promoter. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2356-63.
5. Jin D, et al. Adrenomedullin induces lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphoedema. *Cardiovasc Res*. 2008 Dec 1;80(3):339-45.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産の出願・登録

なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
リンパ浮腫治療への **breakthrough** を目指して

平成22年度 総括・分担研究報告書
発行 平成23年3月

厚生労働省 難治性疾患克服研究事業
リンパ浮腫治療への **breakthrough** を目指して
研究代表者 福田尚司

独立行政法人 国立国際医療研究センター BTOLE 事務局
〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1
TEL:03-3207-7181(代表)

