

201128114B

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～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 福 田 尚 司

平成24 (2012) 年 3 月

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～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 福 田 尚 司

平成24（2012）年3月

# 目 次

I. 班員構成名簿-----	1
----------------	---

## II. 総合研究報告

「リンパ浮腫治療への break through を目指して」に関する研究-----	3
研究代表者 福田尚司	

III. 資料 平成22年度 総括研究報告-----	29
----------------------------	----

# I . 班員構成名簿

区分	氏名	所属	役職名
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 心臓血管外科	医長
研究分担者	浜崎 辰夫	独立行政法人 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	室長
	記村 貴之	独立行政法人 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	研究員
研究協力者	木村 壮介	独立行政法人 国立国際医療研究センター	院長
	保坂 茂	独立行政法人 国立国際医療研究センター 心臓血管外科	医長
	溝上 哲也	独立行政法人 国立国際医療研究センター 国際保健医療研究部	部長
	窪田 和雄	独立行政法人 国立国際医療研究センター 放射線科	医長
	秋田 作夢	独立行政法人 国立国際医療研究センター 心臓血管外科	医員
	藤岡 俊一郎	独立行政法人 国立国際医療研究センター 心臓血管外科	医師

## Ⅱ. 総合研究報告書

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 平成22年度～23年度 総合研究報告書

### 「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

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

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室長

#### 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 cilostazol 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、皮膚毛細血管血流、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

##### 【臨床研究の目的】

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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>。現在、その数は数十万人とされている。

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 cilostazol が効果的であったという報告<sup>3)</sup>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 phosphodiesterase) 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、cilostazol 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。

#### 【基礎研究の目的】

cilostazol は PDE3 を選択的に阻害することにより抗血小板作用、血管拡張作用を発揮すると考えられており、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<sup>4)</sup>。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<sup>4)、5)</sup>。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<sup>4)</sup>。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 cilostazol 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<sup>3)</sup>、cilostazol 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、cilostazol 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。

## 2. 方法

### 【臨床研究の方法】

#### 2.1 研究期間

2010年4月から2年間

#### 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%、cilostazol 群の改善率を50%、 $\alpha$  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 cilostazol 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 사용되는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、と言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20cm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、リンパ管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

イアスピリン 100 mg/day)、cilostazol (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、片側肢浮腫患者においては健側肢  
の同レベル皮下組織面積を基に計算さ  
れ、両側肢浮腫患者においては刑事的  
変化にて評価する。

### 2.9.4 皮膚毛細血管流障害の評価

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。

### 【基礎研究の方法】

### 2.11 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。また同様に付属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  $1.5 \times 10^4$  個播種し、その翌日に cilostazol (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 cilostazol 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、cilostazol 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、 $37^\circ\text{C}$  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。

またリンパ管内皮細胞の増殖について細胞増殖試薬である WST-1 (Roche) を用いて評価した。96 ウェルプレートにリンパ管内皮細胞を1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$  個播種し、48 時間培養した。WST-1 試薬を添加して2 時間反応させ、マイクロプレートリーダーで  $450\text{nm}$  における吸光度を測定した。

## 2.12 細胞の遊走能

上記の成人由来の正常ヒトリンパ管内皮細胞を、 $10\text{cm}$  の dish に播種し、ほぼコンフルエントになるまで培養した。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。 $9\text{mm}$  幅のセルスクレイパーで細胞を直線状に剥がし、同時に cilostazol を  $1$ ,  $10$ ,  $30 \mu\text{M}$  となるように添加した。コントロールとして cilostazol の溶媒である DMSO のみを添加したものをを用いた。48 時間培養した後、細胞を顕微鏡で観察し、残った細胞シートの間隔を測定し、移動距離を算出した。

## 2.13 cilostazol 投与中の kCYC<sup>+/-</sup>トランスジェニックマウスの生存率

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 kCYC<sup>+/-</sup> 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<sup>6)</sup>。このリンパ流障害マウスに対して、0.1% cilostazol 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、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。

## 2.14 トランスジェニックマウス皮膚の免疫染色

0.1% cilostazol 含有飼料を投与した kCYC<sup>+/-</sup> トランスジェニックマウスから

耳介と背部の皮膚を採取した。3.5%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋を行った。リンパ管内皮細胞のマーカである podoplanin (LifeSpan Biosciences) と血管内皮細胞のマーカである CD31(BD)の抗体で二重染色を行った。

#### 2.15 トランスジェニックマウスのリンパ管輸送能

0.1% cilostazol 含有飼料を4週間投与した kCYC<sup>+/+</sup>トランスジェニックマウスに対して、後脚にエバンスブルー色素を皮下注射した。10分後に両側の膝窩リンパ節を採取し、リンパ節に流入した色素をホルムアミドで溶出させ、マイクロプレートリーダーで色素を定量した。コントロールとして cilostazol 非含有飼料で飼育した野生型マウスと kCYC<sup>+/+</sup>トランスジェニックマウスを用いた。

#### 2.16 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<sup>7)</sup>。これを術後リンパ浮腫のモデルとして、手術同日より cilostazol 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。

#### 2.17 尾のリンパ管の免疫染色

上記の尾のリンパ浮腫モデルにおいて、cilostazol 含有群、非含有群それぞれのマウスより手術後7日目に尾の皮膚を採取し、上記と同様にホルマリン固定、パラフィン包埋を行なって抗LYVE-1抗体(Abcam)で免疫染色を施行した。

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。

### 3. 結果

#### 【臨床研究の結果】

40人の四肢浮腫の患者を診察し、診断基準に合致した20名のリンパ浮腫患者を今研究にエントリーした。観察期間中、cilostazol 群において1名に進行癌が発見されたため研究から逸脱した。また、aspirin 群において患者の都合により1名が研究から逸脱した。

比較的重症のリンパ浮腫と診断され、今研究に参加した20人中3人が原発性と診断された。(患者背景において、2群間の有意差を認めないが、aspirin 群に比べ cilostazol 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 による腓骨近位端から 10 cm 遠位側における皮下面積については、両側下腿浮腫患者を表 4 に、上肢浮腫患者を表 5 に示し、片側下腿浮腫患者の結果を図 1 に示す。

両側下腿浮腫患者では、aspirin 群の 1 名において改善を認めた。(表 4)

上肢浮腫の患者では、皮下面積の変化においてはあまり変化を認めなかった。(表 5)

片側肢の浮腫を有する患者において、CT における治療前後の皮下組織面積の変化を図 1-1~3 に示す。完全寛解を健常側肢の皮下面積を基準にプラス 10% までと仮定すると、aspirin 群では完全寛解を認めないが(図 1-2)、cilostazol 群において片側肢浮腫患者 5 例中 4 例が完全寛解を示した。(図 1-1、-3)

## 【基礎研究の結果】

### 3.1 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 cilostazol 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、cilostazol 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)。cilostazol 30  $\mu$ 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 cilostazol 10  $\mu$ M の群では 7、9 日目

で有意に細胞数の増加がみられた ( $P<0.05$ )。cilostazol 1  $\mu$ 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 cilostazol 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 cilostazol 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 cilostazol 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 cilostazol 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。(図 2)

次に細胞増殖試薬である WST-1 を用いてリンパ管内皮細胞の増殖を評価した。また cilostazol は cAMP の増加を介して protein kinase A (PKA) を活性化することで薬理作用を発揮することがが知

られている。そこで PKA 阻害薬が cilostazol の細胞増殖効果に影響を与えるかも併せて評価した (図 3)。cilostazol 30 $\mu$ M の存在下でリンパ管内皮細胞の増殖がみられた ( $P < 0.01$ )。これは前述の結果と同様の傾向であった。また PKA 阻害薬のみの刺激では細胞増殖に影響はみられなかったが、cilostazol と PKA 阻害薬の存在下で培養すると増殖の部分的な抑制がみられた ( $P < 0.02$ )。このことから cilostazol の細胞増殖促進効果は、少なくとも一部では PKA を介した経路が関与していることが示唆された。

### 3.2 細胞の遊走能

培養リンパ管内皮細胞をセルスクレイパーで剥がした後、cilostazol の存在下で 72 時間培養し、細胞の移動距離を計測して遊走能を評価した (図 4)。cilostazol 1, 10 $\mu$ M ではコントロールと比較して有意差はみられなかったが、30 $\mu$ M では細胞の移動距離が有意に長かった ( $P < 0.03$ )。このことから高濃度の cilostazol はリンパ管内皮細胞の遊走を促進する可能性が示唆された。

### 3.3 cilostazol 投与中の kCYC<sup>+/+</sup>トランスジェニックマウスの生存率

4 ~ 5 週齢のトランスジェニック (Tg) マウスに対して cilostazol 含有または非含有飼料を投与し (それぞれ 21 匹ずつ)、経時的な生存率を図 5 に示した。実験用飼料を投与開始後、cilostazol 非投与群の Tg マウスでは 2 週、6 週でそれぞれ 2 匹死亡がみられ

たが、cilostazol 投与群では 10 週の段階で 1 匹の死亡が確認された。統計学的な差は得られなかったものの、cilostazol 投与が生存率の改善に寄与することが示唆された。なお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。

### 3.4 kCYC<sup>+/+</sup>マウスにおけるリンパ管新生

Cilostazol を投与したマウスより耳の皮膚を採取し、抗 podoplanin 抗体と抗 CD31 抗体で蛍光二重染色を行った (図 6)。コントロールとして cilostazol 非投与群の同腹マウスを用いた。cilostazol 非投与群では少数の拡張したリンパ管が観察された。これに対して cilostazol 投与群では拡張したリンパ管の近傍に細いリンパ管が多数見出された。これらの観察結果から cilostazol によりリンパ管新生が促進されたことが示唆された。

### 3.5 kCYC マウスにおけるリンパ管輸送

マウスの後脚足底に注射した色素はリンパ管に回収され、膝窩リンパ節に流入する。この膝窩リンパ節に移行した色素の量を計測して、リンパ管の輸送能を評価した。cilostazol 非投与の WT マウスと cilostazol 非投与の Tg マウスを比較すると、有意に Tg マウスの色素量が少なかった。これは Tg マウスにおいてリンパ管輸送能が傷害されているのを反映していると考えられる。次に Tg マウスで cilostazol 投与群と非投与群を比較すると、cilostazol 投与群

で有意に色素の量が多かった。これは **cilostazol** によりリンパ管輸送能が改善されることが示された。(図7)

### 3.6 マウス尾におけるリンパ浮腫モデル

マウスの尾の皮膚を全周性に剥離することで術後リンパ浮腫モデルを作成した。手術した部位より遠位の皮膚に浮腫が生じ、10日くらいでピークとなった。術後9日目の代表的な写真を図8に示した。

**cilostazol** 投与群5匹と非投与群9匹について、腫脹した尾の直径を経時的に計測した(図9)。各群の直径の平均を算出してグラフを作成し、標準誤差をエラーバーで示した。統計学的な有意差は得られなかったものの、**cilostazol** 投与群では非投与群と比較して尾の直径が減少し、浮腫が軽減する傾向がみられた。また浮腫が最大値を呈するまでの期間が、**cilostazol** 非投与群では7日間であるのに対して投与群では9日間と、投与群の方が浮腫が進行する期間が長い傾向がみられた。

### 3.7 尾のリンパ浮腫におけるリンパ管拡張

尾のリンパ浮腫モデルを作成後に **cilostazol** を投与したマウスより、尾の皮膚を採取した。抗LYVE-1抗体で染色した(図10)。**cilostazol** 非投与群では真皮のリンパ管は拡張していた。これは尾のモデルにおいてリンパ管の機能障害によってリンパ浮腫をきたしている状態として矛盾しないと考えられた。一方、**cilostazol** 投与群において

はリンパ管の拡張はみられなかった。

## 4. 考察

### 【臨床研究の考察】

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。

今回の報告では、診察患者総数40名中、リンパ浮腫と確定診断した20名に対し研究参加の同意を得た今のところ、この20名についての検討であるため、絶対的な結論は導き出せないが、しかし、いくつかの興味深い結果を得た。

診断において興味深かった点は、下腿に浮腫が強い場合であっても必ずしもリンパシンチグラフィではリンパ流のうっ滞を求めない場合を認めたことである。リンパ流のうっ滞をリンパ浮腫の原因と規定すると、シンチグラフィの診断における有用性および重要性が理解された。

40人の四肢に浮腫を訴える患者中、シンチにて明らかにリンパ流のうっ滞を認めた患者は20名(50%)、この20名のリンパ浮腫患者中、あらゆる手段において原因が同定できず、原発性と診断した患者数が3名(15%)であった。

表4、5および図1に示すように、今研究でリンパ浮腫と診断された研究に参加し完遂した患者18名で、**cilostazol** 群では10人中7人が、**aspirin** 群では8人中5人が、浮腫に対する一定の改善効果を示している。更



に、図1-1および1-3に示すように、片側浮腫患者において、cilostazol群では6名中4名に完全寛解を認めた（完全寛解率67%）。完全寛解した4名のうち、2名が原発性、1名が女性付属器癌の、他の1名が膝関節置換術の術後であった。発症原因のいかんにかかわらず、今治療法の有効性が示唆された。

2009年に出版されたリンパ浮腫治療のConsensus document<sup>8)</sup>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。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、片側浮腫リンパ浮腫患者の67%に完全寛解をもたらしたという事実は、大きな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。表2にあるように、浮腫によって皮膚が過伸展され生じる疼痛は今治療により改善を認めた。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。

また、cilostazol群の下腿浮腫患者において、完全寛解群4名と非完全寛解群5名の比較では、その平均リンパ浮腫罹患期間に差を認めた（完全寛解群9か月 vs 非完全寛解群57か月）。リンパ浮腫治療では、早期診断および早期治療が重要であることを示唆する結果であった。

#### 【基礎研究の考察】

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cilostazolの効果は限定的である一方、VEGFを除いた培地ではcilostazol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cilostazolの効果に限定的であったのは、VEGFの細胞増殖効果と比較してcilostazol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、cilostazol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、cilostazol 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。また細胞の遊走能が cilostazol の存在下で促進されることが示された。細胞増殖と併せて *in vitro* で cilostazol はリンパ管新生の促進に寄与することが示唆された。また cilostazol は phosphodiesterase の阻害薬であり、薬理作用は protein kinase A の活性化を介して様々な薬理作用を有することが知られている。本研究においては PKA 阻害薬を添加することで cilostazol の増殖促進効果は部分的に阻害される傾向がみられた。完全に阻害されないのが阻害薬の濃度や機能によるものであるのか、あるいは他の経路も増殖に関与しているのかについてはさらなる研究が必要と考えられる。

kCYC<sup>+/+</sup>マウスでは全身のリンパ管の障害のためリンパ浮腫および胸水貯留により短命となることが知られている。cilostazol 投与群において生存率の若干の改善傾向がみられた。このマウスに cilostazol を投与して免疫染色を行ったところリンパ管の増加がみられ、色素を注射してリンパ管機能をみたところリンパ管輸送が改善されたことが示された。このことよりリンパ浮腫をきたすトランスジェニックマウスにおいて cilostazol がリンパ管の増加とリンパ管機能の改善に寄与した可能性が示唆された。

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。cilostazol 投与群のマウスではピーク時の尾の腫脹が軽度であったほか、腫脹が改善に転じるまでの期間がやや短いことが観察された。また尾の皮膚に免疫染色を行ったところ cilostazol 投与群においてはリンパ管の拡張が軽減されている像が観察され、リンパ浮腫が改善していることが示唆された。

## 5. 結語

本研究の臨床部分は、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。また、その機序を明らかにするための、基礎研究を伴っている。

リンパ浮腫に対する治療において、cilostazol の内服と電動式波動型末梢循環促進装置の使用を組み合わせた治療は、自宅において高齢者でも実行可能で有効性の高い治療法であると考えられた。

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。これはリンパ浮腫罹患期間および罹患肢数（両側か片側か）に強く影響を受けているため、

より早期の治療介入が重要と考えられた。

基礎研究部分においては、ヒトリンパ管内皮の培養細胞を用いた *in vivo* の実験系で、cilostazol は細胞の増殖を促進するとともに遊走を促進する効果がみられた。また、リンパ流障害を有するトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* の系において、cilostazol は生存率をわずかに改善し、リンパ管の増加とリンパ管機能の改善がみられた。さらに尾のリンパ浮腫モデルマウスにおいて、cilostazol は浮腫を軽減する傾向が認められた。これらの結果より、cilostazol はリンパ管障害の条件下でリンパ管新生を促進することでリンパ管輸送を改善することが示唆され、リンパ浮腫の有効な治療薬の選択肢となりうると考えられた。

最後に、今研究に対しご協力をいただいた方々、特に臨床研究支援室、放射線科および看護部の方々に厚く御礼申し上げます。

## 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) プレタール錠 50mg・100mg、散 20%

インタビューフォーム、大塚製薬

5) 高橋貞夫ほか : 脈管学, 32 (7), 651-655, 1992

6) 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.

7) Jin D, et al. Adrenomedullin induces lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphoedema. *Cardiovasc Res*. 2008 Dec 1;80(3):339-45.

8) 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

臨床研究データに関しては、特許申請に伴い、2012年5月の時点で結果の公表は行っていない。

基礎研究データに関しては、2011年、「The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology」にて口演にて発表した。

## 9. 知的財産の出願・登録

2012年5月特許出願。

## 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)	10	8
男性数(人)	1	1
平均年齢	70.6	69.4
BMI	27.1	28
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(月)	51.8	45.2
蜂窩織炎の既往がある患者数(人)	5	5
原発性リンパ浮腫患者数(人)	2	1
癌手術の既往がある患者数(人)	7	4
人工関節手術の既往がある患者数(人)	3	1
静脈血栓症の既往がある患者数(人)	0	3

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
疼痛スケール(治療前)	14.2	22.6	NS
疼痛スケール(1ヶ月後)	4.4	15.3	NS
疼痛スケール(6ヶ月後)	3.8	5.1	NS
T テスト	p=0.31	p=0.10	—

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
皮膚かん流圧	65.5	65.9	NS
皮膚かん流圧(1ヶ月後)	71.3	72.5	NS
皮膚かん流圧(6ヶ月後)	73.0	70.0	NS
T テスト	NS	NS	—

NS; no significant difference