

表 4 両下肢浮腫患者における皮下面積の変化

シロスタゾール群		治療前	治療1カ月後	治療6カ月後
1	右	28.24	27.75	28.81
	左	28.91	26.34	27.65
2	右	63.36	64.82	60.54
	左	64	70.28	62.24
3	右	51.95	51.04	54.99
	左	43.84	44.12	45.93

アスピリン群		治療前	治療1カ月後	治療6カ月後
1	右	55.04	26.86	27.35
	左	41.38	28.74	28.73
2	右	50.96	55.28	51.52
	左	54.48	61.68	52.23
3	右		31.9	36.97
	左	39.25	39.34	37.43

単位は全て cm^2

表 5 上肢浮腫患者における皮下面積の変化

シロスタゾール群		治療前	治療1カ月後	治療6カ月後
1		33.61	31.9	32.72

単位は cm^2

図1-1 皮下組織面積の変化（シロスタゾール群における片側浮腫全患者）

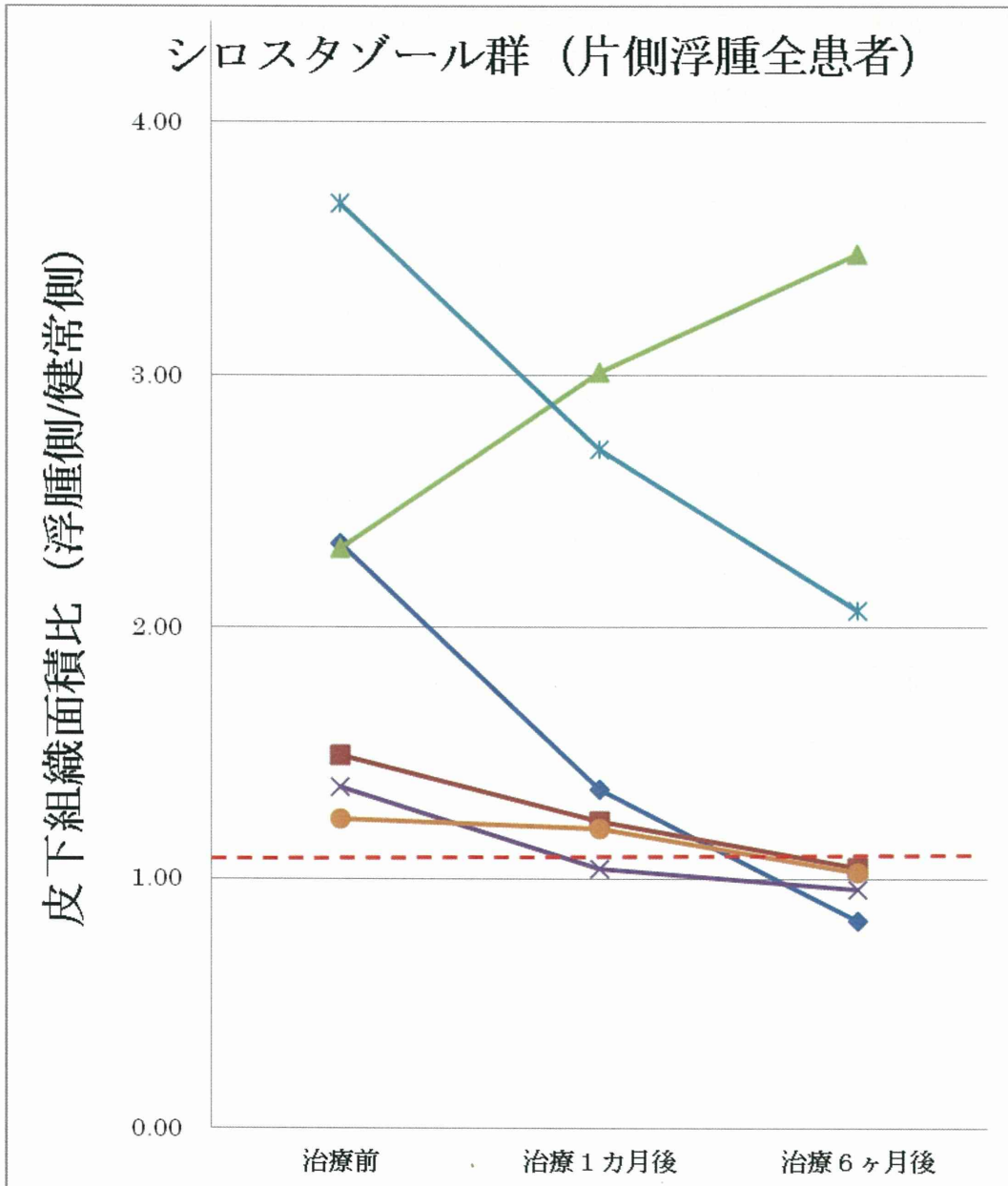


図1-2 皮下組織面積の変化（アスピリン群における片側浮腫全患者）

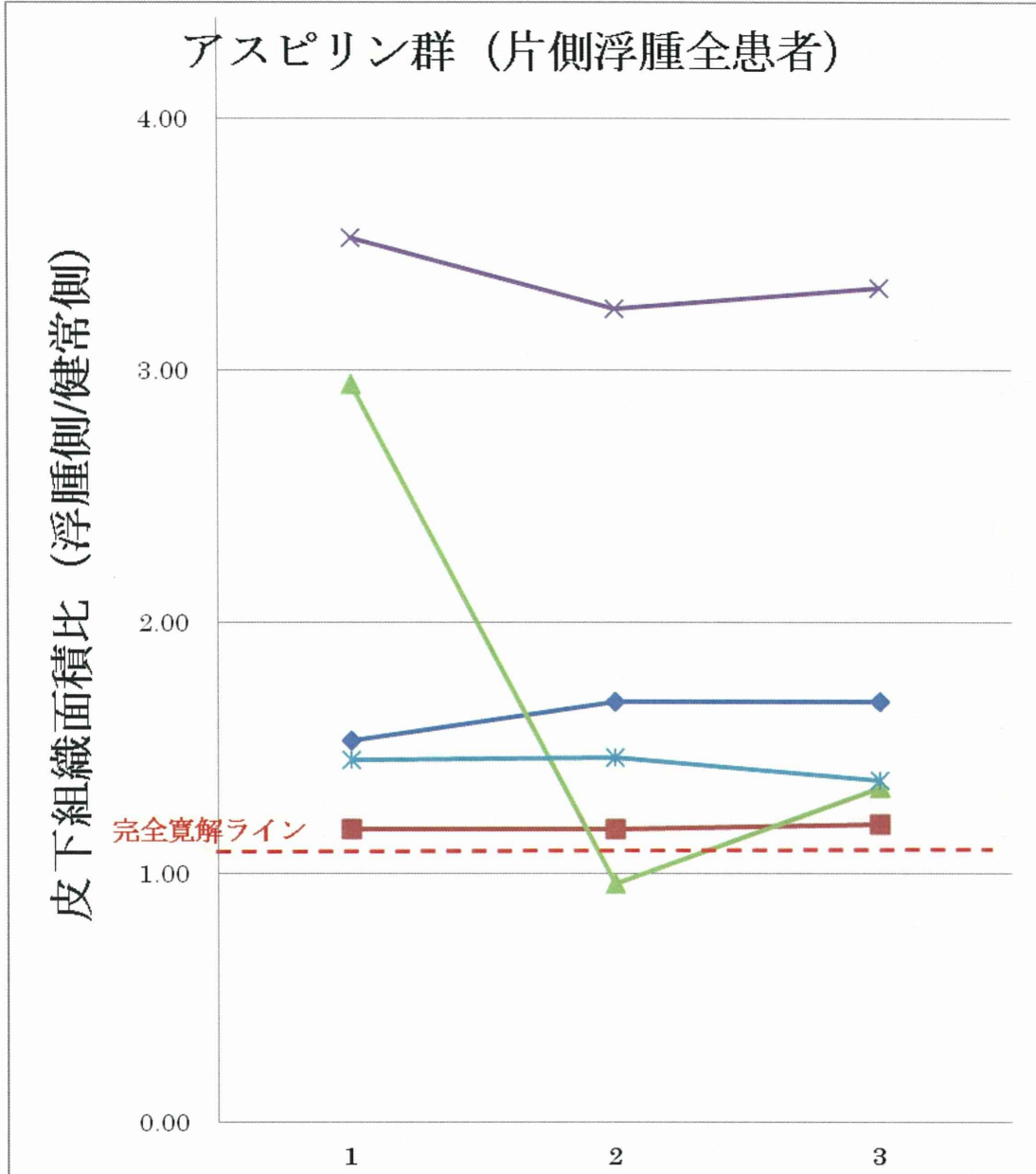


図1-3 皮下組織面積の変化（シロスタゾール群における片側浮腫完全寛解全患者）

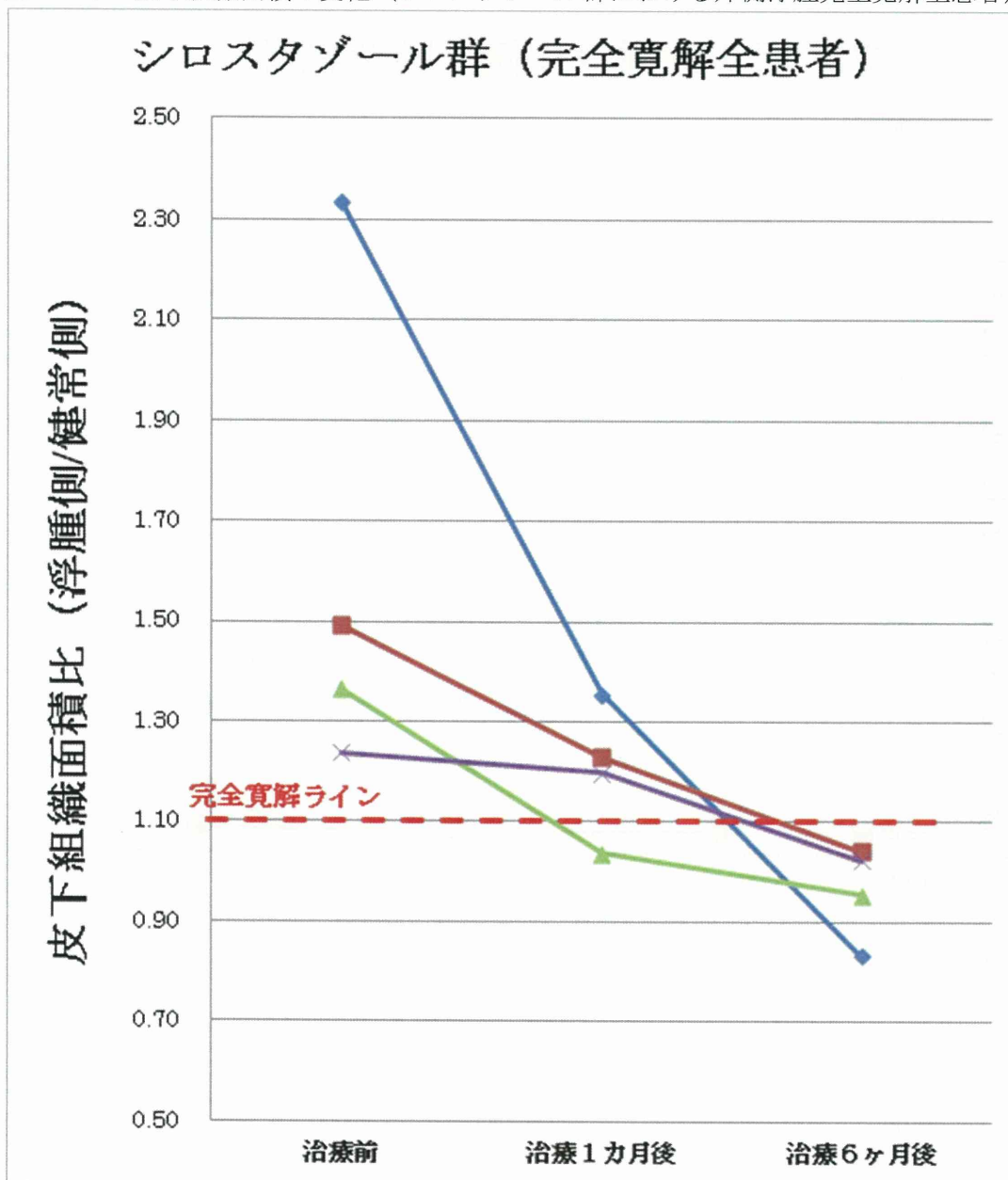
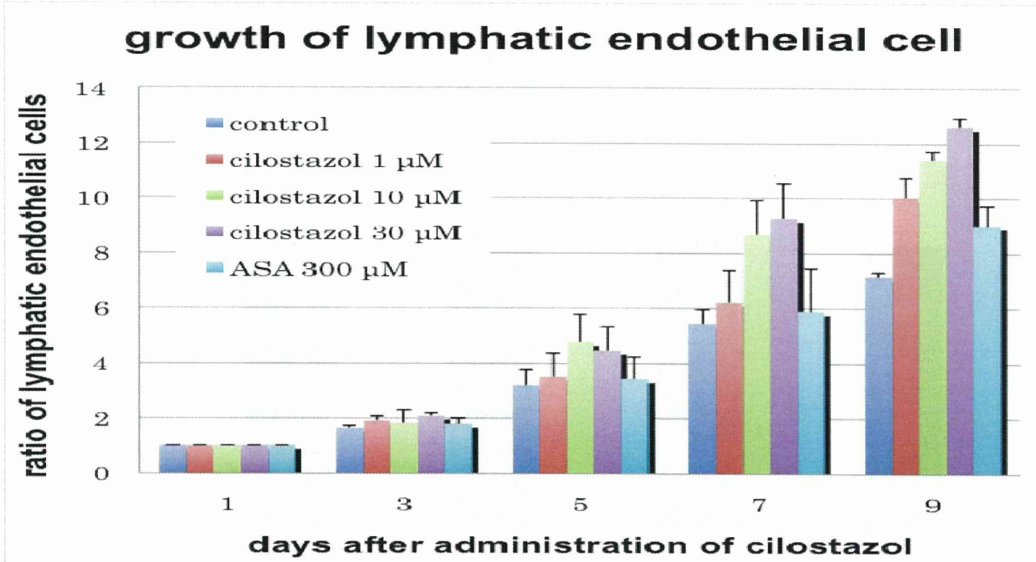
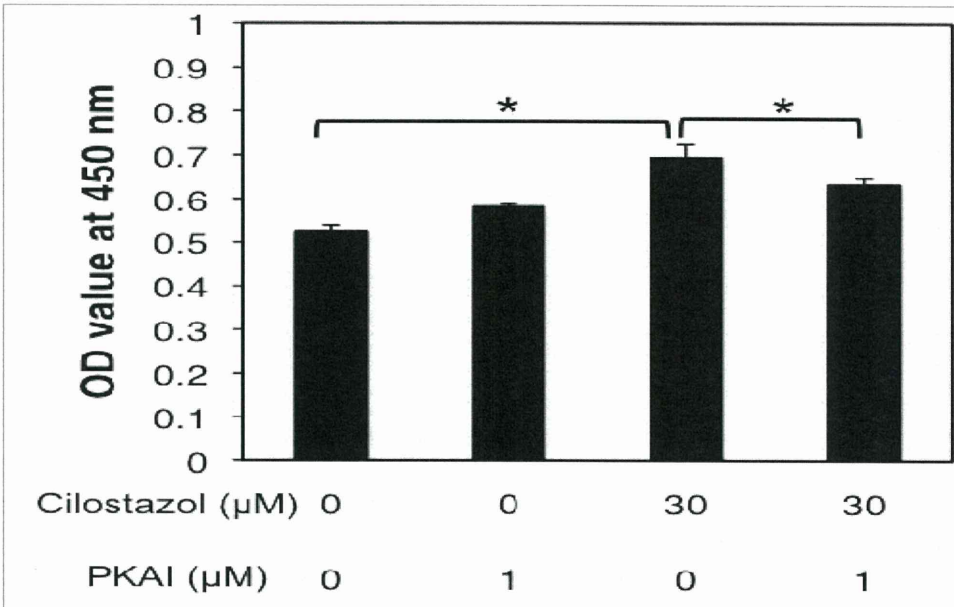


図2 リンパ管内皮細胞の増殖



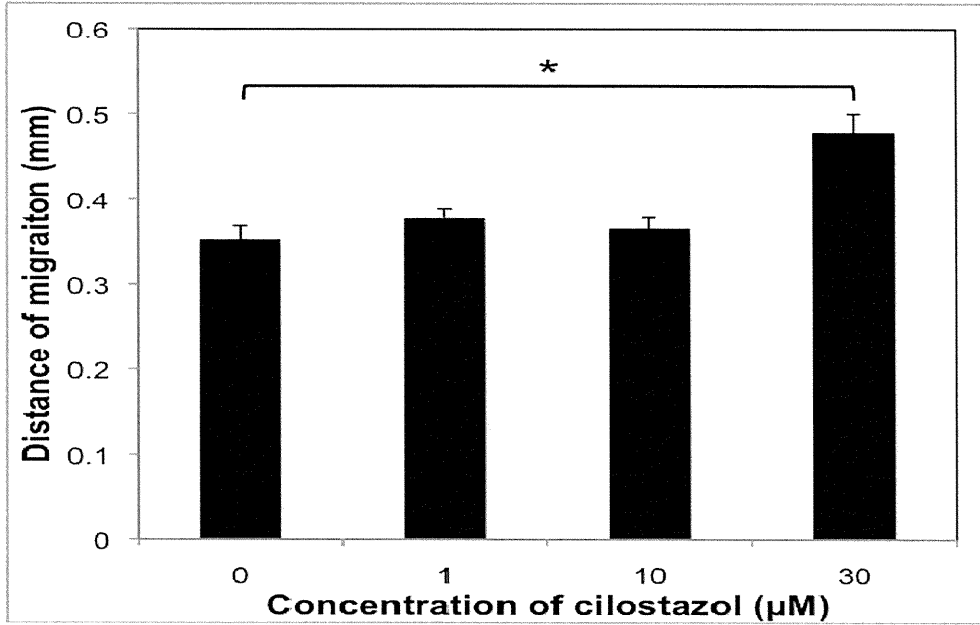
リンパ管内皮細胞のシロスタゾール投与後の経時的変化。シロスタゾールの濃度が 1μ M、 10μ M、 30μ M と増すにつれて細胞数の増加がみられた。

図3



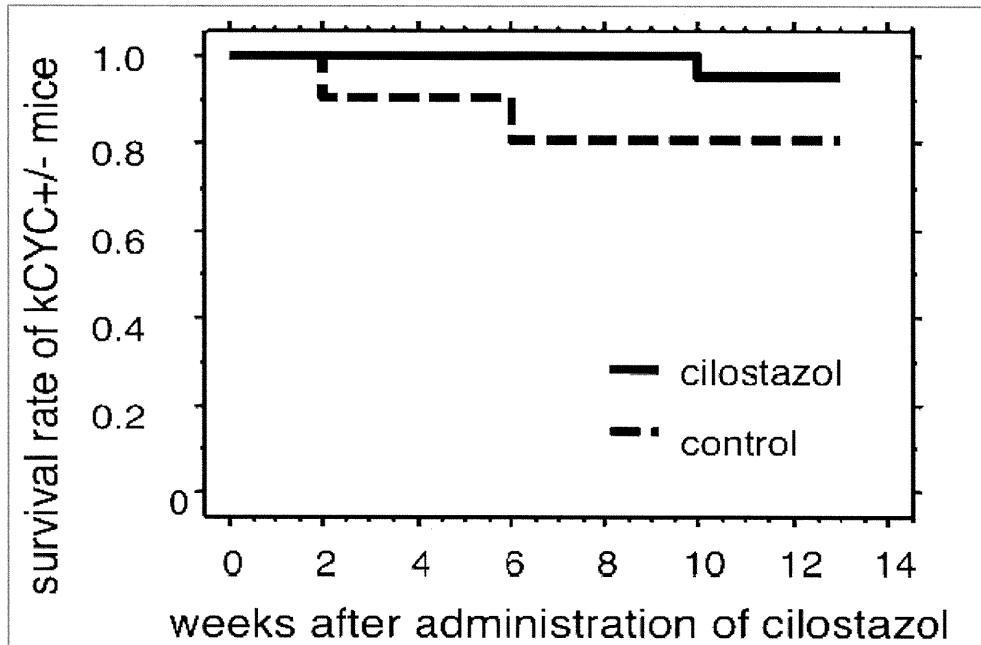
cilostazol または PKA 阻害薬の存在下におけるリンパ管内皮細胞の増殖能 (WST-1 assay)。 30μ M で細胞の増加がみられたが、PKA inhibitor の投与により増加は抑制された。

図 4



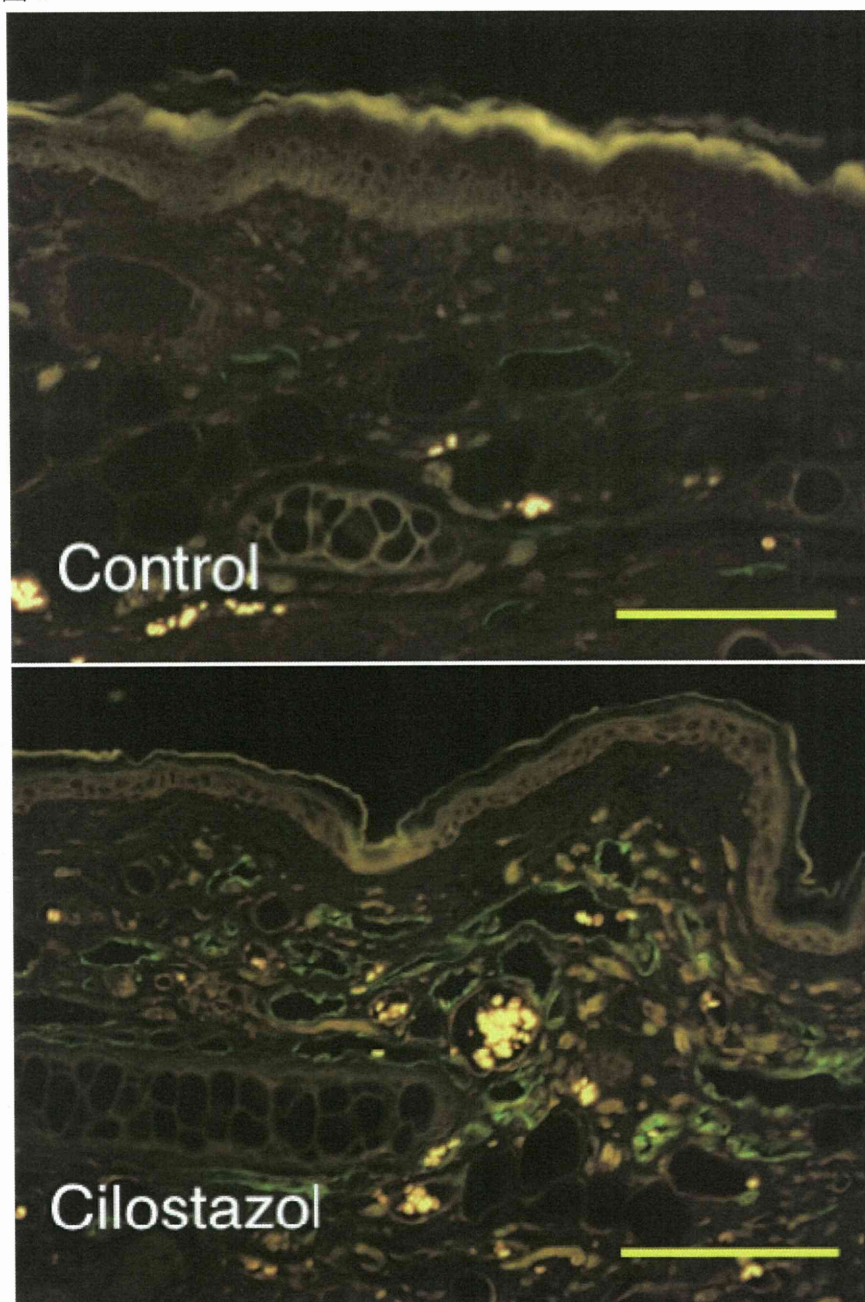
cilostazol 存在下におけるリンパ管内皮細胞の遊走能。30μM において遊走が促進された。

図 5



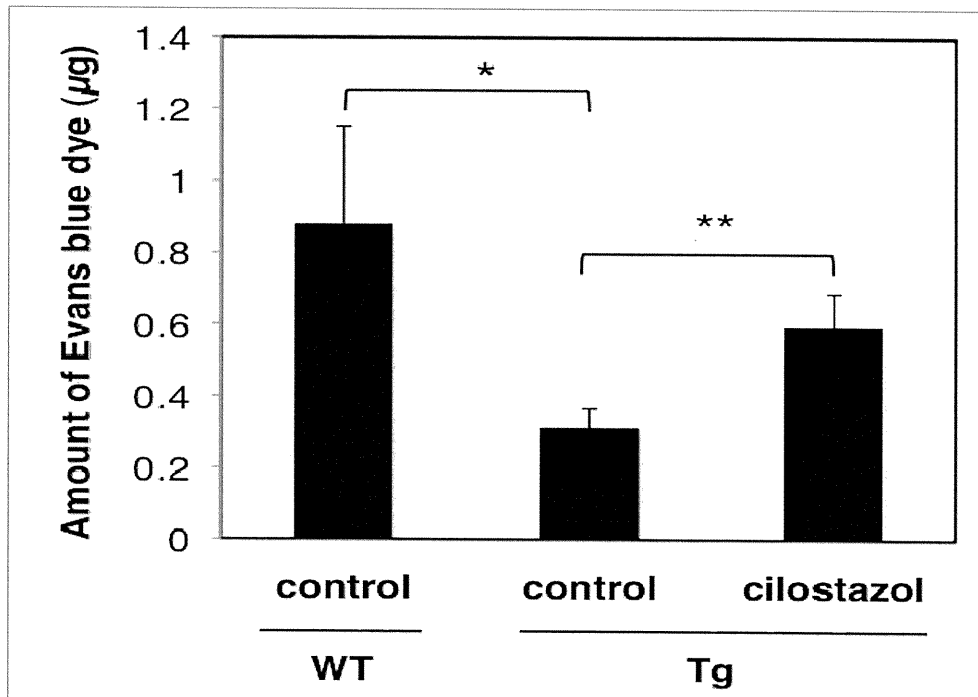
kCYC+/- トランスジェニックマウスの生存率。Cilostazol 投与群において生存率の改善がわずかにみられた。

図 6



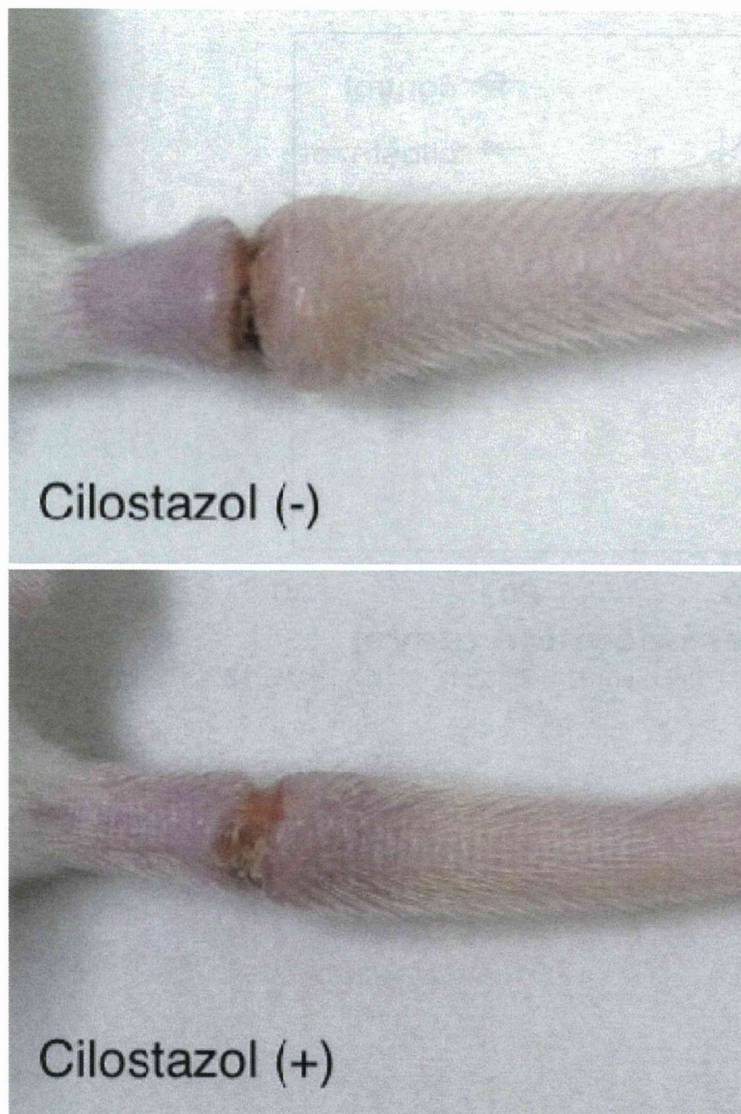
マウス耳の皮膚に対して抗 podoplanin 抗体（緑）、抗 CD31 抗体（橙）で免疫染色を行った。Cilostazol 群において、拡張したリンパ管の近傍に細いリンパ管が多数観察された。Bar は 100 μ m。

図 7



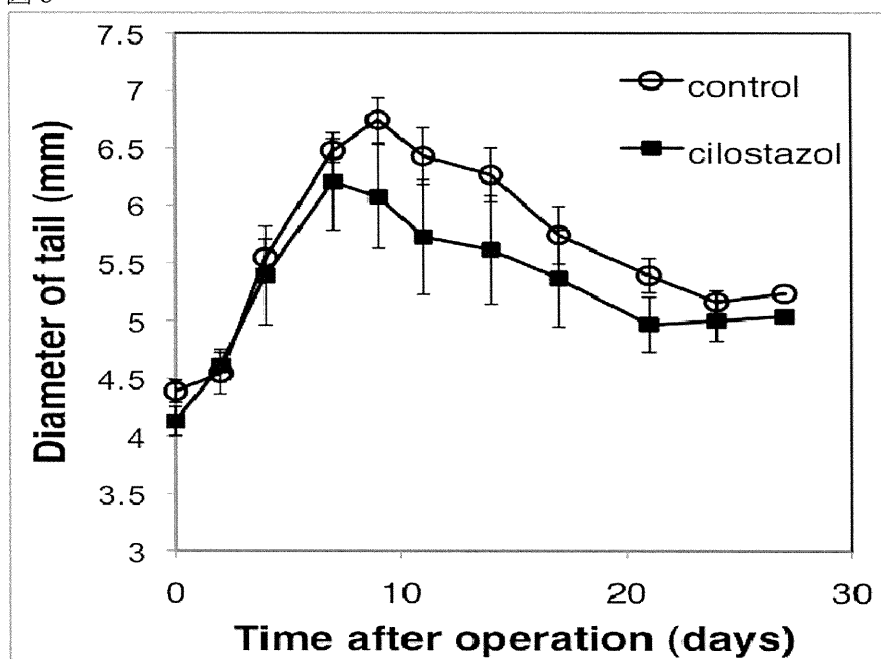
膝窩リンパ節に流入した Evans blue の定量。WT と比較して Tg マウスでは移行する色素の量が低下していた。Tg の Cilostazol 投与群では非投与群と比較して色素量の増加がみられた。

図 8



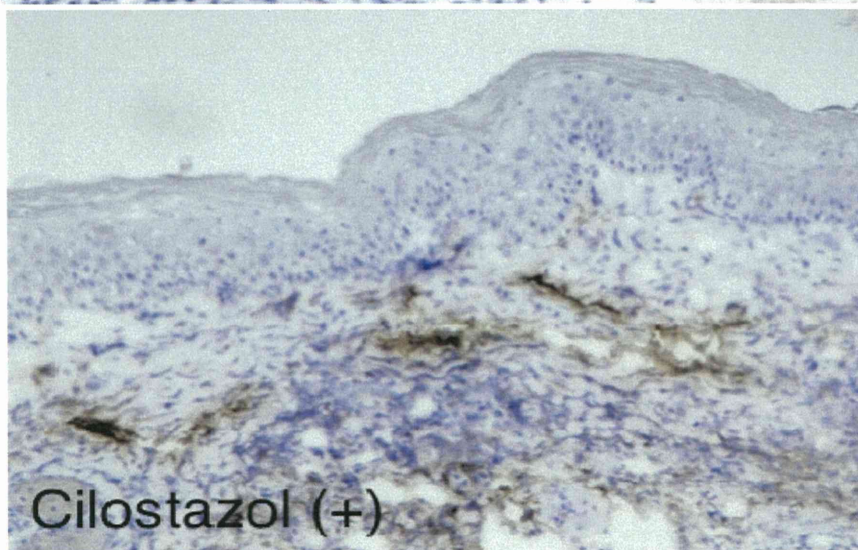
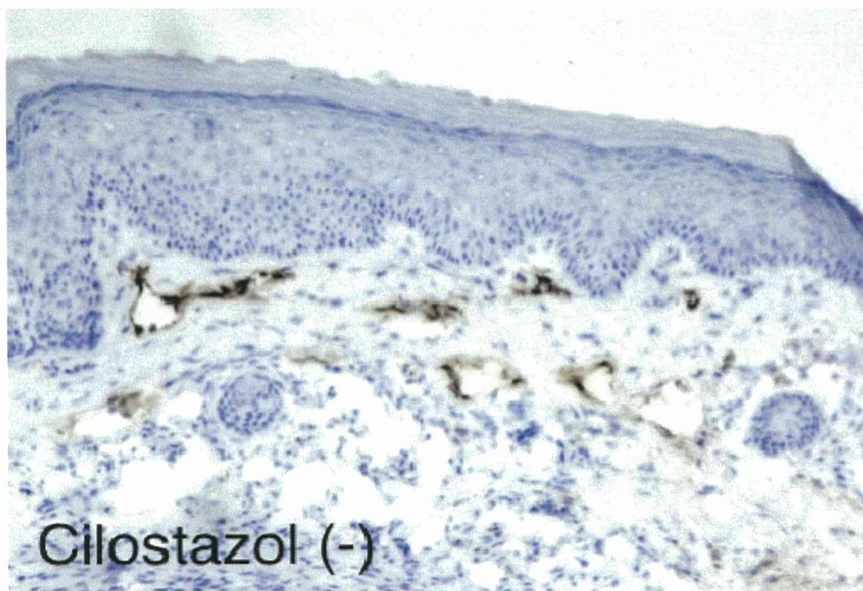
マウス尾のリンパ浮腫モデル。尾の皮膚を一定幅で全周性に剥離し、手術後 9 日目の写真を示した。

図9



マウスの尾の直径の経時的変化。Cilostazol 投与群において尾の直径が減少する傾向がみられた。

図10



尾の皮膚に対して抗 LYVE-1 抗体で免疫染色を施行した。Cilostazol 非投与群においてリンパ管の拡張がみられたが、投与群では拡張がみられなかった。

Ⅲ. 資 料
平成22年度総括研究報告書

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)総括研究報告書

「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、 PDF_3 (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

【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 PDF_3 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、 PDE_3 (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。

【基礎研究の目的】

シロスタゾールは cGMP-inhibited phospho- diesterase (PDE_3) 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⁴⁾。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^{4), 5)}。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⁴⁾。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。

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

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、患者が通常の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)、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。

【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 1.5×10^4 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。

2.12 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。

2.13 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⁶⁾。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。

2.14 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⁷⁾。これを術後リンパ浮腫のモデルとして、手術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。

3. 結果

【臨床研究の結果】

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、アスピリン群に比べ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。

【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(表5)。シロスタゾール30 μ 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 μ 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 μ 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。

3.2 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(表 6 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。

3.3 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表 7 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。

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、経時的な生存率を表 8 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 シロスタゾール - → +) では、シロスタゾール非投与期間に 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。

3.4 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。(表 9)

4. 考察

【臨床研究の考察】

本研究は、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