

- nation treatment with clarithromycin and dexamethasone. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 62: 182–189.
14. Saraya, T., K. Nakata, K. Nakagaki, N. Motoi, K. Iihara, Y. Fujioka, T. Oka, D. Kurai, H. Wada, H. Ishii, H. Taguchi, S. Kamiya, and H. Goto. 2011. Identification of a mechanism for lung inflammation caused by *Mycoplasma pneumoniae* using a novel mouse model. *Results in Immunology* 1: 76–87.
 15. Wu, Q., R.J. Martin, J.G. Rimo, R. Breed, R.M. Torres, and H.W. Chu. 2007. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes and Infection* 9: 78–86.
 16. Michelow, I.C., K. Katz, G.H. McCracken, and R.D. Hardy. 2007. Systemic cytokine profile in children with community-acquired pneumonia. *Pediatric Pulmonology* 42: 640–645.
 17. Pridgeon, C., L. Bugeon, L. Donnelly, U. Straschil, S.J. Tudhope, P. Fenwick, J.R. Lamb, P.J. Barnes, and M.J. Dallman. 2011. Regulation of IL-17 in chronic inflammation in the human lung. *Clinical Science* 120: 515–524.
 18. Vanaudenaerde, B.M., S.E. Verleden, R. De, S.I. Vos, A. Vleeschauwer, R. Willems-Widyastuti, D.E. Van Geenen, L.J. Raemdonck, E.K. Dupont, and I. Meys Verbeke. 2011. Innate and adaptive interleukin-17-producing lymphocytes in chronic inflammatory lung disorders. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183: 977–986.
 19. Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453: 1051–1057.
 20. Mills, K.H. 2008. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European Journal of Immunology* 38: 2636–2649.
 21. Shen, N., J. Wang, M. Zhao, F. Pei, and B. He. 2011. Anti-interleukin-17 antibodies attenuate airway inflammation in tobacco-smoke-exposed mice. *Inhal Toxicol* 23: 212–218.
 22. Chmura, K., X. Bai, M. Nakamura, P. Kandasamy, M. McGibney, K. Kuronuma, H. Mitsuzawa, D.R. Voelker, and E.D. Chan. 2008. Induction of IL-8 by *Mycoplasma pneumoniae* membrane in BEAS-2B cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 295: L220–L230.
 23. Sohn, M.H., K.E. Lee, S.Y. Choi, B.C. Kwon, M.W. Chang, and K.E. Kim. 2005. Effect of *Mycoplasma pneumoniae* lysate on interleukin-8 gene expression in human respiratory epithelial cells. *Chest* 128: 322–326.
 24. Ferretti, S., O. Bonneau, G.R. Dubois, C.E. Jones, and A. Trifilieff. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *The Journal of Immunology* 170: 2106–2112.
 25. Hartupce, J., C. Liu, M. Novotny, X. Li, and T. Hamilton. 2007. IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *The Journal of Immunology* 179: 4135–4141.
 26. Chu, H.W., R. Breed, J.G. Rimo, R.J. Harbeck, M.R. Sills, and R.J. Martin. 2006. Repeated respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infections in mice: effect of host genetic background. *Microbes and Infection* 8: 1764–1772.
 27. Fonseca-Aten, M., A.M. Ríos, A. Mejias, S. Chávez-Bueno, K. Katz, A.M. Gomez, G.H. McCracken Jr., and R.D. Hardy. 2005. *Mycoplasma pneumoniae* induces host-dependent pulmonary inflammation and airway obstruction in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 32: 201–210.
 28. Salvatore, C.M., M. Fonseca-Aten, K. Katz-Gaynor, A.M. Gomez, A. Mejias, C. Somers, S. Chavez-Bueno, G.H. McCracken, and R.D. Hardy. 2007. Respiratory tract infection with *Mycoplasma pneumoniae* in interleukin-12 knockout mice results in improved bacterial clearance and reduced pulmonary inflammation. *Infection and Immunity* 75: 236–242.
 29. Salvatore, C.M., M. Fonseca-Aten, K. Katz-Gaynor, A.M. Gomez, and R.D. Hardy. 2008. Intranasal interleukin-12 therapy inhibits *Mycoplasma pneumoniae* clearance and sustains airway obstruction in murine pneumonia. *Infection and Immunity* 76: 732–738.

疾患と検査値の推移

肺胞蛋白症と GM-CSF 自己抗体

中 田 光

検 査 と 技 術

第 41 卷 第 13 号 別刷

2013 年 12 月 1 日 発行

医学書院

肺胞蛋白症と GM-CSF 自己抗体

な 中 田 光*
か た こう

* 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
〒951-8520 新潟県新潟市中央区旭町通一番町 754

はじめに

GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) 自己抗体が市販のイムノグロブリン製剤中に普遍的に検出されることを最初に報告したのは、Svenson ら¹⁾である。彼らは、GM-CSF 自己抗体は中和抗体であり、GM-CSF との avidity (親和性) は 10~50 pM と著しく高いと述べている。また、イムノグロブリン製剤は、数千人もの健常プール血清から精製するため、健常者のなかでたまたま GM-CSF 自己抗体をもつ人がいたために、全体として陽性になったのであろうと述べている。

しかし、GM-CSF と GM-CSF 自己抗体の複合体を解離させる方法を用いて健常血清中の自己抗体濃度を測ると、微量ながら全ての検体に存在することが明らかとなった²⁾。その後、筆者は、この方法をさまざまなサイトカインに応用したところ、健常ヒト血清中には、IL (interleukin)-4, 5, 6, 8, 10, 12 や TNF- α (tumor necrosis factor- α), VEGF- α (vascular endothelial growth factor- α), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), IFN- γ (interferon- γ) などに対する自己抗体が存在することを確認した³⁾。

健常血中に普遍的に存在するサイトカイン自己抗体の意義は不明であるが、それらの過剰産生は、さまざまな疾患や病態を呈することが知られている。G-CSF に対する自己抗体の過剰産生は、Felty 症候群において、好中球の減少をきたす⁴⁾。また、エリスロポエチンに対する自己抗体

は真性赤芽球癆の一因と考えられている⁵⁾。また、播種性 MAC (*Mycobacterium avium* complex) 症の一部の患者に IFN- γ に対する自己抗体が過剰に存在していることは有名である⁶⁾。サイトカイン自己抗体の過剰産生が病因となりうることがわかったのは、特発性肺胞蛋白症 (pulmonary alveolar proteinosis, PAP) の血液および肺に存在する GM-CSF 自己抗体が最初である^{7,8)}。PAP は 1958 年に Rosen らによって記載され、わが国では 1960 年に岡らによって紹介された稀少肺疾患である。PAP は、サーファクタントの生成または分解過程に障害があり、肺胞腔内を主として末梢気腔内にサーファクタント由来物質である好酸性顆粒状物質の異常貯留をきたす疾患の総称である。わが国の PAP は人口百万対 6.2 人と推定される⁹⁾。

GM-CSF 自己抗体は、GM-CSF あるいは IL-3 依存的に増殖する TF-1 細胞の GM-CSF 存在下での増殖を濃度依存的に抑制するが、IL-3 存在下での増殖は抑制しない⁸⁾。また、この自己抗体の GM-CSF に対する avidity を測定したところ、 20.0 ± 7.5 pM と著しく高いことを確認した¹⁰⁾。サーファクタント中の高濃度の GM-CSF 自己抗体が II 型上皮細胞が産生する GM-CSF と結合・中和することで、その生物活性を完全に中和するのが、本疾患の病因であると唱え、各国の研究者の賛同を得て、2005 年大阪で行われた国際肺胞蛋白症会議で、従来の特発性 PAP を自己免疫性 PAP と呼ぶことが提唱され、現在ではこ

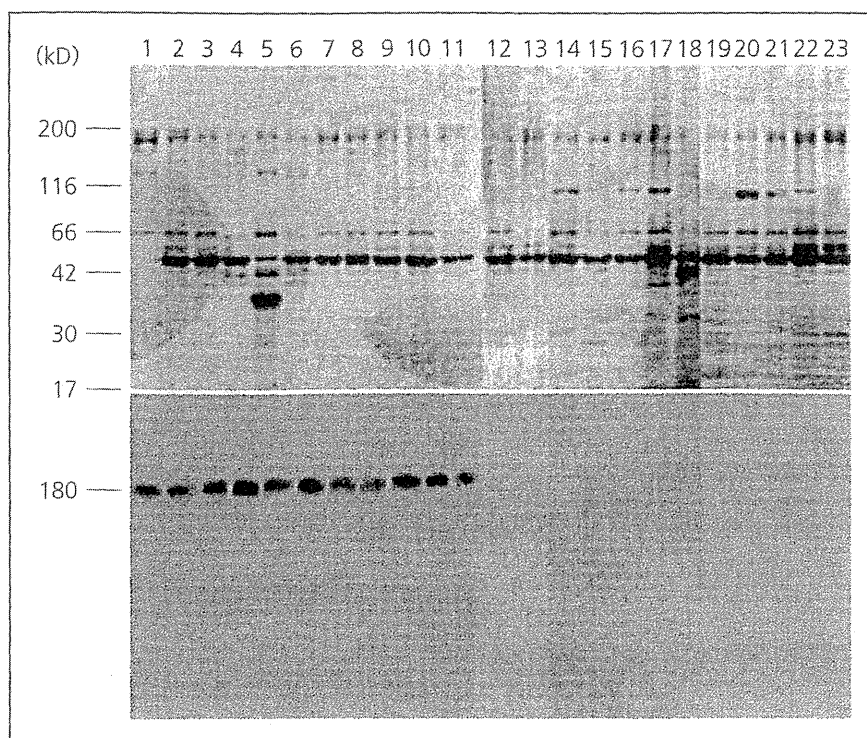


図1 ^{125}I -GM-CSF をプローブとした気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF 自己抗体の Far Western 法による検出
 左から、1~11：自己免疫性 PAP，12~13：続発性 PAP，14~18：健常者，
 19~23：他の肺疾患。（文献8より転載）

の呼称が一般的となっている。

その後、米国シンシナティ小児病院の Sakagami ら¹¹⁾は、血漿交換を受けた自己免疫性 PAP の血漿から GM-CSF 自己抗体を精製し、シクロホスファミド+CD20 抗体で conditioning したカニクイザルに輸注することにより、PAP の動物モデルを作製することに成功し、本自己抗体が病因であることを証明した。

GM-CSF 自己抗体の定性的検出

筆者は、1999年に自己免疫性 PAP 患者の血清および気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF 自己抗体の検出法を開発し、特許申請した(特許 4372904号)¹²⁾。

Far Western 法は、自己抗体分子を特異的に、かつ感度よく検出するのに適している。患者の血清あるいは気管支肺胞洗浄液中の蛋白を非還元状態でアクリルアミドゲル電気泳動し、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写し、放射性ヨードラベルされた GM-CSF と反応させ、オートラジオグラフィーにより検出したのが図1である⁸⁾。11例の自己免疫性 PAP の気管支肺胞洗

浄液では、もれなく 180 kD のところに単一のバンドが観察されるが、2例の続発性 PAP、5例の他の肺疾患、5例の健常気管支肺胞洗浄液中には、このバンドはなく、この方法により特異的に GM-CSF 自己抗体が検出することができることが確認された。健常血清にも微量の自己抗体は存在するので、精製して、Far Western 法でバンドを検出することは可能である。

感度のよい半定量的な方法として開発されたのが、ラテックスビーズ(latex beads)凝集法である(図2)^{12,13)}。この方法は、かつて尿妊娠反応などに汎用された。latex beads に GM-CSF を架橋したものと、希釈血清を反応させて、抗原抗体反応によるビーズの凝集を観察するもので、通常、自己免疫性 PAP の血清では、512倍以上の抗体価をもつ。欠点は、高価な GM-CSF をビーズに架橋して用いるため、コストがかかることである。

GM-CSF 自己抗体がもつ強い中和能を測定するバイオアッセイ法もある。これは、GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞に 1 ng/m の GM-CSF と希釈した自己免疫性 PAP 血清を添加すると、GM-CSF 自己抗体の濃度依存的に

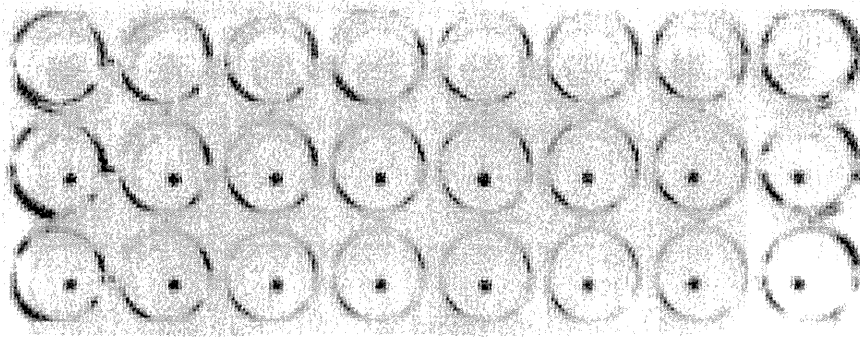


図2 ラテックスビーズ凝集法による GM-CSF 自己抗体価の測定：300 倍希釈した血清と GM-CSF 結合ラテックスビーズの反応結果
 上段：自己免疫性 PAP 患者の血清，中段：他の肺疾患患者の血清，
 下段：健常者血清。 (文献 12 より転載)

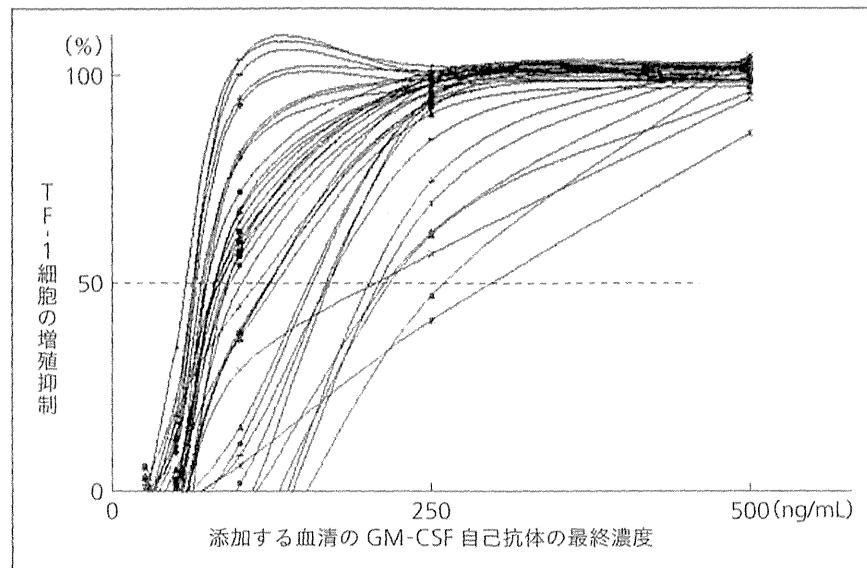


図3 41 人の患者血清による 0.5 ng/mL の GM-CSF 存在下における TF-1 細胞の増殖抑制 (文献 14 より転載)

TF-1 細胞の増殖が抑制されることを利用したものである(図3)^{8,14)}。96 穴プレートの各ウエル内の生細胞数を MTT アッセイを用いて測定すると、自己免疫性 PAP 血清の GM-CSF 自己抗体の中和能は IC₅₀ 値が 7.5 mol/mol GM-CSF と推定された。

GM-CSF 自己抗体の定量法と抗体の性状

血清あるいは気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF 自己抗体を正確に定量するには、GM-CSF をコートした 96 穴プレートと、標準抗体として、ヒト型モノクローナル GM-CSF 抗体が必要である。標準抗体として ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) を血清診断に用いるようになった 2000~2002 年まで、筆者らは、プールし

た自己免疫性 PAP 患者血清から、組換えヒト GM-CSF をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーによって精製されたポリクローナル抗体を用いていた¹³⁾。

しかし、自己抗体を 100% の純度で精製することが困難であること、自己抗体を溶出する際に強酸バッファーを用いるので、一部の活性化が失われると思われること、プール血清とはいえ、標準品を再現性よく得ることが困難であることから、標準ヒト型モノクローナル抗体が待望されていた。

イーベック社との共同開発によって、自己免疫性 PAP 患者血清の末梢血単核球を EB (Epstein-Barr) ウイルスにより transform し、クローン化された B 細胞から抽出された IgG (immunoglobulin G) 型抗体遺伝子を CHO (chinese hamster ovary) 細胞に導入し、生産させた組換え蛋白を得ること

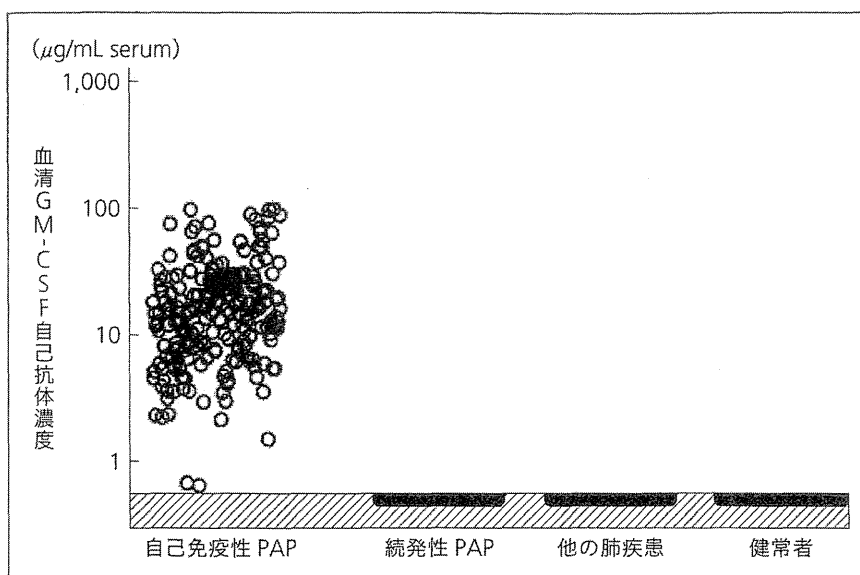


図4 自己免疫性 PAP223 例の血清 GM-CSF 自己抗体濃度
 コントロール血清は、続発性 PAP24 例、他の肺疾患 24 例、健常者 14 例由来
 で、いずれも 0.5 μg/mL 未満であった。(文献9より転載)

に成功した。大腸菌由来組換え GM-CSF をコートした 96 穴プレートの縦方向 8 ウェルに、それぞれ 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0 ng/mL の標準モノクローナル自己抗体を入れ、他のウェルには、3,000 倍希釈した血清あるいは、10 倍希釈した気管支肺胞洗浄液を入れる。40 分間室温で反応させた後、ペルオキシダーゼが標識された抗ヒト Fc 二次抗体を用いて、GM-CSF と結合した自己抗体を検出定量する。直線回帰で標準直線を引いた場合、自己免疫性 PAP 血清のカットオフ値は、0.5 μg/mL であった^{9,15)}。

自己免疫性 PAP223 例の血清 IgG 型 GM-CSF 自己抗体濃度の中央値は、15.29 μg/mL であり、範囲は 7.96~26.76 μg/mL であった(図4)⁹⁾。健常者 23 人のうち、陽性は 12 人であり、範囲は 0.3~0.5 μg/mL であった¹⁶⁾。一方、IgM (immunoglobulin M) 型 GM-CSF 自己抗体は、患者 71 人中 57 人に検出され、中央値 1.1 μg/mL であった。健常者 25 人の IgM 型 GM-CSF 自己抗体は、5 人に検出され、中央値 0.4 μg/mL であった。IgM 型 GM-CSF 自己抗体の GM-CSF との avidity は、10.9±9.0 nM と IgG 型 GM-CSF 自己抗体の 100 分の 1 程度と弱く、また、ほとんど中和能がないことから、IgM 型 GM-CSF 自己抗体は、病因としては役割をもたないと考えられる¹⁶⁾。

GM-CSF 自己抗体測定の有用性

自己免疫性 PAP の血清 GM-CSF 自己抗体濃度は、動脈血酸素分圧を指標とする重症度と関連しない。この重症度は、KL-6 や CEA (carcino-embryonic antigen) とよく相関することから、GM-CSF 自己抗体の濃度以外の性質、エピトープ、結合能、中和能などが重症度に関係しているのではないと思われる。最近、筆者らは、軽鎖比(κ/λ 比)が重症度と逆相関していることを見いだした¹⁷⁾。すなわち、重症者ほど、λ 鎖が優位になる。特定の λ 鎖のパラトープが GM-CSF 上のエピトープと強く結合している可能性が考えられる。そのような λ 鎖のパラトープをもつ B 細胞クローンが選択的に増幅している可能性がないか、今後の検討課題である。

しかしながら、自己免疫性 PAP に限ると、血清 GM-CSF 自己抗体濃度の測定は、他の肺疾患との鑑別に有用である。カットオフ値を 0.5 mg/mL に設定したとき、感度、特異度ともに 100% である。PAP は、100% の症例で、高分解能 CT 上スリガラス陰影を呈し¹⁸⁾、比較的診断は容易であるが、逆にスリガラス陰影を呈する肺疾患はカリニ肺炎、癌性リンパ管症、間質性肺炎、薬剤性肺炎など多く、鑑別に迷うことが多い。

高分解能 CT 上、スリガラス陰影があり、血清 GM-CSF 自己抗体が 0.5 μg/mL 以上であれば、

肺生検や気管支肺胞洗浄を実施し、PAPに特徴的な所見が得られれば、自己免疫性PAPの診断は確定する。血清自己抗体濃度を測定することで、確診に至る可能性を高め、無用な侵襲的な検査を減らすことができるであろう。

高分解能CT上、スリガラス陰影があり、肺生検や気管支肺胞洗浄でPAPに特徴的な所見があるが、血清GM-CSF自己抗体が陰性の場合はどうするか。PAPの約10%は、そのような患者であって、多くの場合、骨髄異形成症候群などのような血液疾患を基礎疾患にもつ続発性PAPである。非常にまれにGM-CSF受容体 α 鎖あるいは β 鎖に異常がある遺伝性PAPがある^{19,20)}。

GM-CSF自己抗体は、まれに慢性感染症や自己免疫疾患にも検出されることがあるが、最近、Rosenら²¹⁾は、103人のcryptococcal meningitisの血漿中を調べたところ、7人でGM-CSF中和抗体が検出され、そのうち、2人は経過中PAPを発症したと報告している。Meagerら²²⁾は、425人の自己免疫疾患/慢性感染症の患者血清を調べたところ、41人でGM-CSF自己抗体が検出されたと述べている。しかしながら、中和抗体は、このうち3人に検出されたにすぎなかった。

病勢を判定するマーカーとして血清GM-CSF自己抗体が注目されているのは、クローン病である。Hanら²³⁾は、GM-CSF自己抗体は、クローン病の血清で上昇しており、回腸病変のある患者、罹患期間の長い患者、狭窄・穿孔がある患者で高くなると報告している。

文 献

- 1) Svenson M, Hansen MB, Ross C, et al : Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood* 91 : 2054-2061, 1998
- 2) Uchida K, Nakata K, Suzuki T, et al : Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthysubjects. *Blood* 113 : 2547-2556, 2009
- 3) Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, et al : Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. *FEBS Lett* 581 : 2017-2021, 2007
- 4) Hellmich B, Csernok E, Schatz H, et al : Autoantibodies against granulocyte colony-stimulating factor in Felty's syndrome and neutropenic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 46 : 2384-2391, 2002
- 5) Casadevall N : Antibodies against rHuEPO : native and recombinant. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 5 : 42-47, 2002
- 6) Browne SK, Burbelo PD, Chetchotisakd P, et al : Adult-onset immunodeficiency in Thailand and Taiwan. *N Engl J Med* 367 : 725-734, 2012
- 7) Tanaka N, Watanabe J, Kitamura T, et al : Lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis express a factor which neutralizes granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *FEBS Lett* 442 : 246-250, 1999
- 8) Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, et al : Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 190 : 875-880, 1999
- 9) Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, et al : Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 177 : 752-762, 2008
- 10) Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, et al : High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 103 : 1089-1098, 2004
- 11) Sakagami T, Uchida K, Suzuki T, et al : Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 361 : 2679-2681, 2009
- 12) Kitamura T, Uchida K, Tanaka N, et al : Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 162 : 658-662, 2000
- 13) Schoch OD, Schanz U, Koller M, et al : BAL findings in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with GM-CSF. *Thorax* 57 : 277-280, 2002
- 14) Urano S, Kaneko C, Nei T, et al : A cell-free assay to estimate the neutralizing capacity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies. *J Immunol Methods* 360 : 141-148, 2010
- 15) Trapnell BC, Nakata K, Kavuru M : Pulmonary Alveolar Proteinosis. Mason RJ, Broaddus VC, Martin TR, et al(ed) : Murray & Nadel's Textbook of Respiratory. Medicine Saunders Elsevier, pp1496-1515, 2010
- 16) Nei T, Urano S, Motoi N, et al : IgM-type GM-CSF autoantibody is etiologically a bystander but associated with IgG-type autoantibody production in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302 : L959-L964, 2012
- 17) Nei T, Urano S, Motoi N, et al : Light chain (κ/λ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol* (in press)
- 18) Ishii H, Trapnell BC, Tazawa R, et al : Comparative study of high-resolution CT findings between autoimmune and secondary pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 136 : 1348-1355, 2009
- 19) Suzuki T, Sakagami T, Young LR, et al : Hereditary

- pulmonary alveolar proteinosis : pathogenesis, presentation, diagnosis, and therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 182 : 1292-1304, 2010
- 20) Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, et al : Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J Med Genet* 48 : 205-209, 2011
- 21) Rosen LB, Freeman AF, Yang LM, et al : Anti-GM-CSF autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. *J Immunol* 190 : 3959-3966, 2013
- 22) Meager A, Wadhwa M, Bird C, et al : Spontaneously occurring neutralizing antibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with autoimmune disease. *Immunology* 97 : 526-

- 532, 1999
- 23) Han X, Uchida K, Jurickova I, et al : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies in murine ileitis and progressive ileal Crohn's disease. *Gastroenterology* 136 : 1261-1271, 2009

参考文献

- 1) 田澤立之, 中田光 : 肺胞蛋白症 基礎から臨床まで. *呼と循* 57 : 1147-1154, 2009
- 2) 田澤立之, 中田光 : 肺胞蛋白症. *日胸臨* 69 : 734-740, 2010
- 3) 中田光, 根井貴仁, 中垣和英 : 特殊病態 自己抗体の分子進化と肺胞蛋白症. *綜合臨* 60 : 2494-2499, 2011

INFORMATION

千里ライフサイエンス国際シンポジウム E6

2014 Senri Life Science International Symposium on "Innate Immunity, Cytokines, and Immune Regulation"

日時 : 2014年1月31日(金) 10:00~17:00

場所 : 千里ライフサイエンスセンタービル
5階ライフホール
大阪府豊中市新千里東町 1-4-2 : 地下鉄御堂筋線/
北大阪急行千里中央下車

コーディネーター :

審良静男(大阪大学免疫学フロンティア研究センター
拠点長教授)

坂口志文(大阪大学免疫学フロンティア研究センター
教授)

主催 : 公益財団法人千里ライフサイエンス振興財団
プログラム :

Opening address

Tadamitsu Kishimoto (President of Senri Life Science
Foundation)

"The non-canonical Inflammasome Pathway"

Vishva M. Dixit (Genentech Inc., USA)

"Regnase-1, a ribonuclease essential for the regulation of
immune responses"

Shizuo Akira (Osaka University)

"Dendritic cell diversification in immune regulation"

Kenneth Murphy (Washington University School of
Medicine, USA)

"Commensal control of tissue immunity"

Yasmine Belkaid (NIAID, NIH, USA)

"Memory T cells"

Marc K. Jenkins (University of Minnesota Medical

School, USA)

"Control of immune responses by regulatory T cells"

Shimon Sakaguchi (Osaka University)

"The immune response in tuberculosis: from mouse models
to human disease"

Anne O' Garra (MRC National Institute for Medical Re-
search, UK)

"A new era for the therapy of autoimmune inflammatory
diseases"

Tadamitsu Kishimoto (Osaka University)

Closing remarks

Shizuo Akira (Osaka University)

使用言語 : 英語

定員 : 200名

参加費 : 無料

申込要領 : 氏名, 勤務先, 所属, 〒所在地, 電話番号, E-
mail アドレスを明記のうえ, E-mail で下記あてにお申し
込みください. 件名は「千里ライフサイエンス国際シン
ポジウム E6」としてください.

締切 : 定員になり次第締め切らせていただきます.

申込先 : 公益財団法人千里ライフサイエンス振興財団
国際シンポジウム E6 係

E-mail : sng@senri-life.or.jp

Tel : 06-6873-2001

URL : <http://www.senri-life.or.jp>

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町 1-4-2

千里ライフサイエンスセンタービル 20 階

解 説 臨 床

LAMの分子標的療法

中田 光

要 旨 LAMは若年女性が罹患し、呼吸不全が進行する難病である。70%が気胸を経験し、36%が在宅酸素療法を受けている。1990年代後半に発症機序が解明されて以来、分子標的薬のシロリムスが治療薬として有望視され、2003～2005年に米国で第I/II相試験が行われ、肺機能の改善が示唆された。2006～2010年に第III相試験として行われたMILES試験では、シロリムスはLAMの進行を防ぎ、病勢を安定させることが確認された。筆者らは、医師主導治験を実施し、このデータとMILES試験の結果をもとにファイザー株式会社とライセンスアウト先企業のノーベルファーマ社と協力し、薬事承認を目指している。シロリムスは、欧米を中心に腎移植後の拒絶反応予防薬として15年以上の歴史があるが、副作用も多く報告されている。特にLAM患者においてはシロリムス肺臓炎の合併が懸念される。そのため、2012年9月より全国9施設においてLAM患者65例を対象に2年間シロリムスを投与し、安全性を確認する第II相オープン試験を開始した。

中田 光：LAMの分子標的療法，呼吸32(3)：233-237，2013

キーワード：リンパ脈管筋腫症 シロリムス 分子標的治療薬 医師主導治験

I. LAMの病態と疫学

リンパ脈管筋腫症(LAM)は、妊娠可能な女性が発症する進行性嚢胞性肺疾患である¹⁾。LAMには多臓器に過誤腫が増殖する常染色体優性の腫瘍抑制遺伝子症候群である結節性硬化症(TSC)に合併するもの(TSC-LAM¹⁾)、体細胞TSC遺伝子の突然変異による孤発性LAMがある。TSC-LAM患者の30～40%に肺嚢胞性変化があると考えられており、15,000人当たり1人の女性がTSC-LAMを有すると推定される。孤発性LAMの有病率は女性100万人当たり約5例と考えられる。

LAMは進行性労作性呼吸困難を発症するのが最も一般である。由来不明の平滑筋様細胞(LAM細胞)による肺

間質のびまん性浸潤および肺実質の嚢胞性破壊のため、月に1秒量7～9cc、努力性肺活量5ccの割合で肺機能が低下する²⁾³⁾。移植肺にも再発が認められることから、遠隔部位からのLAM細胞の転移が少なくとも1つの発症機序であろう。2008年の厚生労働省特定疾患研究班の調査では、発症後15年の生存率が68%と進行は比較的緩やかであるが、気胸(患者の約70%)や乳糜胸(約30%)が合併し、約36%の患者が在宅酸素療法を受けているなど、QOLに大きな問題がある⁴⁾。また、TSC関連LAM(TSC-LAM)患者の約70～80%⁵⁾および孤発性LAM患者の50%⁶⁾に腎血管筋脂肪腫(AML)が認められる。これは脂肪、平滑筋および血管を含む珍しい過誤腫で、肺に認められるLAM細胞の由来の1つである可能性がある。

II. シロリムス療法の根拠

前世紀の終わりまでに孤発性LAMもTSC関連LAMも原因遺伝子が明らかにされた。それは、2種類の腫瘍抑

Molecular targeting therapy for LAM
新潟大学医学総合病院生命科学医療センター
Koh Nakata
Bioscience Medical Research Center, Niigata University Medical & Dental Hospital, Niigata 951-8520, Japan

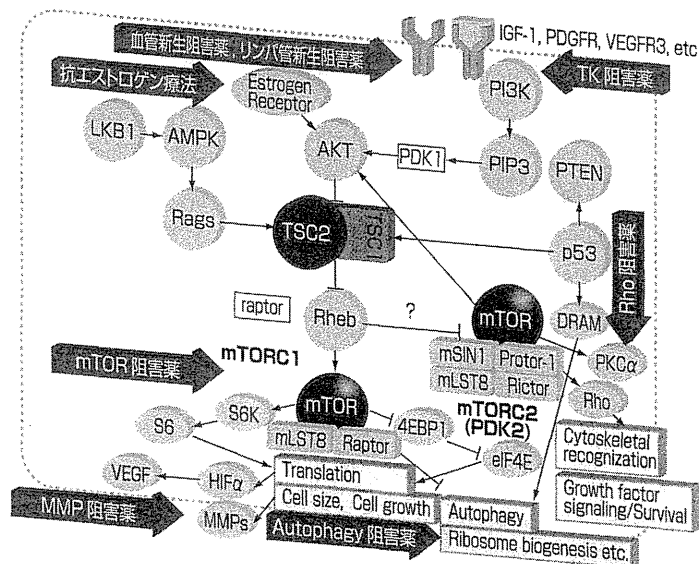


図1 LAM細胞の異常シグナルと薬物療法の標的部位
(井上義一ほか, 日本胸部臨床: 2011より引用)

制遺伝子, 即ち第9染色体上のハマルチン遺伝子(*TSC1*)座(9q34)および第16染色体上のツベリン遺伝子(*TSC2*)座(16p13.3)のどちらか一方に突然変異が起こることが原因である^{7)~10)}。*TSC*遺伝子の2本ともに決定的な突然変異があると, その遺伝子がコードしているツベリンまたはハマルチンの欠陥や欠乏を来す。ツベリン, ハマルチンは複合体を形成し, 細胞の成長, 生存を調節しているため, 細胞の異常増殖や過成長を起こすのである。

ツベリン/ハマルチンの複合体は, Rhebと呼ばれる中間Gタンパク質を介して, Akt経路のキナーゼmTOR(哺乳動物におけるシロリムスの標的)の主要な調節因子として機能する¹¹⁾¹²⁾。正常なツベリン/ハマルチン複合体は, Rhebを不活性非リン酸化状態(Rheb GDP)に維持する。Aktによるツベリンリン酸化はツベリン/ハマルチン複合体のGAP活性を不活性化し, 解離を引き起こす。その結果Rheb-GTPが増え, mTORを介してS6までの下流標的および開始因子抑制剤である4E結合タンパク質(4E-BP1)が活性化される。したがって, ツベリン/ハマルチン複合体異常は, S6Kおよび4E-BP1をリン酸化し, さらにリン酸化pS6KはS6をリン酸化し, リン酸化4E-BP1はeIF4Eを放出し, それらはともに翻訳機能を活性化し, 細胞増殖を促進する¹³⁾。シロリムスはFK-506結合タンパク質12(FKBP-12)に結合し, mTORを阻害する。実際, シロリムスは結節性硬化症モデルマウスに投与すると細胞の大きさの異常を元に戻したり, また, 結節性硬化症モデルラットならびにマウスに投与すると癌の成長を遅らせることが明らかになっている(図1)。

Ⅲ. シロリムスによるLAMの治療戦略

シロリムスやエベロリムスなどのmTOR阻害薬が登場するまで, あるいは, 現在でもLAMの治療に使われているのは, 主にエストロゲンのレベル低下または作用抑制を目的としたプロゲステロンおよびリュープロンを用いた経験的ホルモン療法である。しかし, 治験で明確にエビデンスが示されたわけではない。腹部血管脂肪腫を有するLAM患者を対象に, EBMに基づく臨床試験が行われたのは, 2003~2006年のシロリムスの第I/II相試験(CAST試験)が最初である¹⁴⁾。この試験では, シロリムスを6カ月以上投与された患者におけるAMLの大きさをMRIで評価した。6カ月で平均15%(n=9), 12カ月で35%(n=2)と, 月平均で約2.5%退縮した。予想外だったのは, 治験開始時に肺機能異常(1秒量が予測量の80%未満)があり, 投与期間が6カ月以上であったLAM患者7例における1秒量が, 平均154±139ccも改善し, また, 努力性肺活量も平均561±307cc改善したことである。全肺気量の有意変化を伴うことなく, 残気量が予測量で平均47%も減少した。有害事象として, 患者の約半数に口腔内潰瘍形成が認められたが, 用量減量または休業日設定で対処可能であった。約3分の1に血清中脂質濃度上昇が認められた。重篤有害事象(入院を要した有害事象)4例のうち1例が飲食困難な口腔内潰瘍形成, 1例がシロリムス投与中に治癒した市中肺炎, 下痢症2例であった。シロリムス肺臓炎に一致するような肺浸潤影は認められなかつ

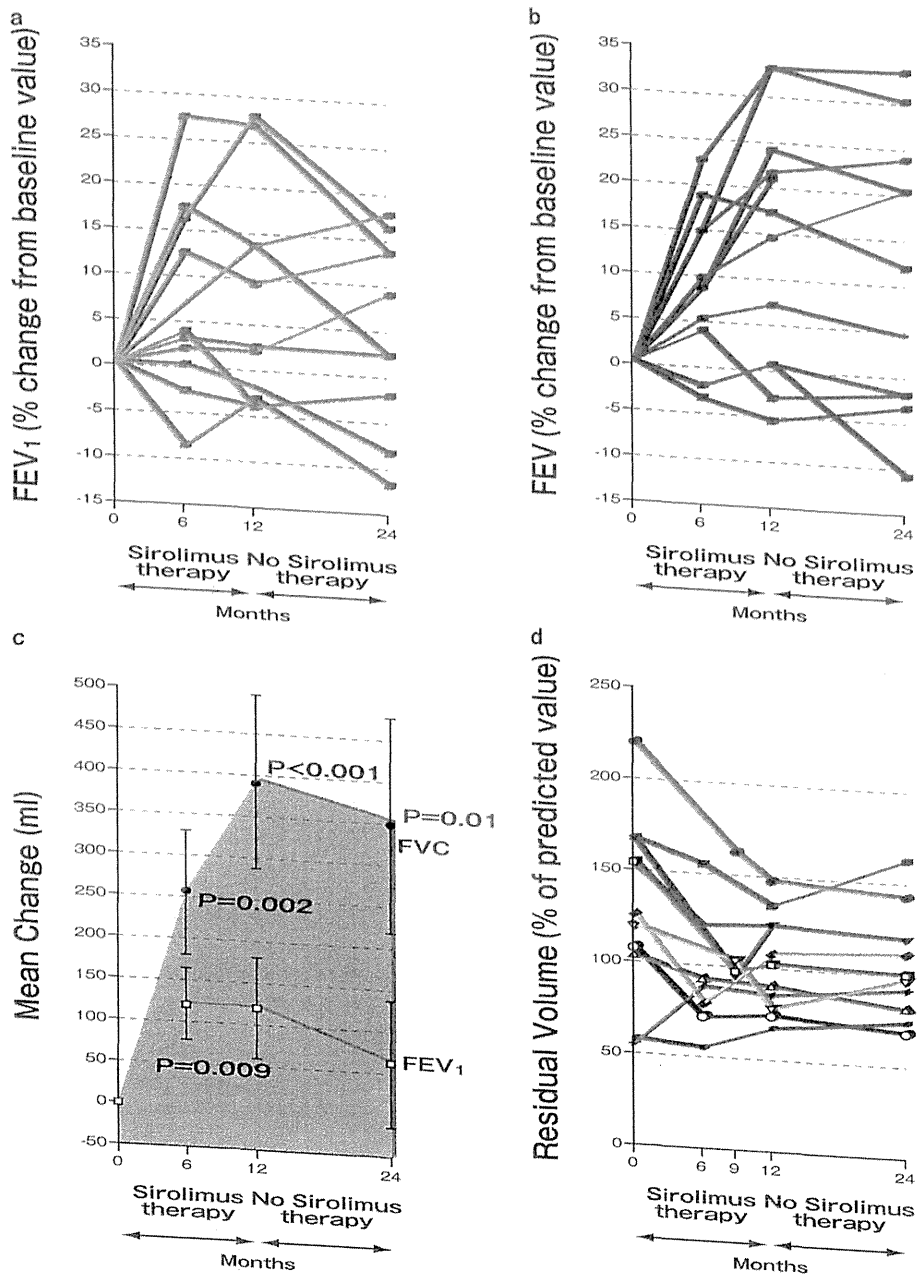


図2 LAM 患者の肺機能検査値の推移

CAST 試験における 11 例の a) 1 秒量の変化, b) 努力性肺活量の変化, c) 1 秒量と努力性肺活量の平均値の推移, d) 残気量の変化 (Bissler JJ, et al¹⁴⁾. *N Engl J Med* 358 : 2008 より引用)

た(図2)。

CAST 試験の結果は、LAM における肺機能低下に対してシロリムスの効果が期待できることを示していたが、患者数が限られていたため、100 例規模で有効性と安全性を検証するプラセボ対照試験が計画された。この試験は、2003 年に NIH の資金を得てシンシナティ大学の Bruce Trapnell, Frank McCormack 両教授らにより結成され

た肺稀少疾患コンソーシアムの 1 プロジェクトとして、2006 年より、日米加 11 施設が参加する第Ⅲ相国際共同試験が開始された¹⁵⁾。米国フロリダにあるデータ技術コーディネイティングセンター(DTCC)が EDC システムを各施設に配信し、被験者は実薬と偽薬に割り振られ、データと有害事象は、DTCC に集められて解析された。わが国からは、新潟大学医歯学総合病院と近畿中央胸部疾患セン

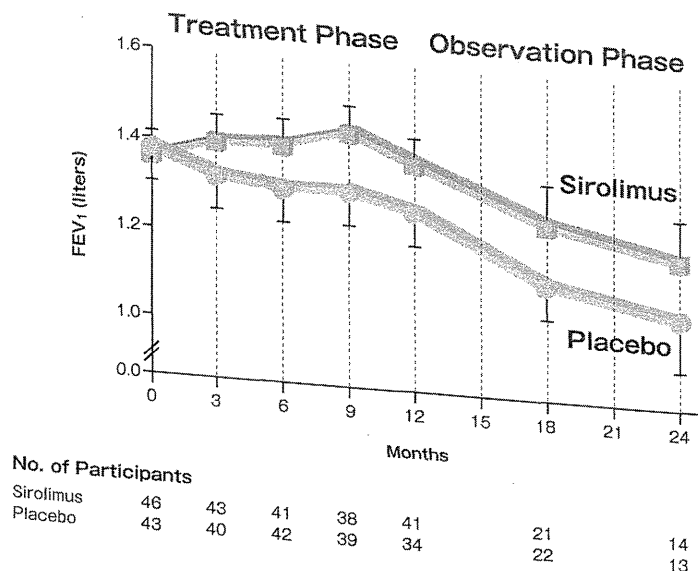


図3 ベースラインからの治療期および追跡観察期の平均1秒量の推移

(McCormack FX, et al¹⁵). *N Engl J Med* 364:2011より引用)

ターが参加した。血中濃度測定により、用量調節しつつ、シロリムスを1年間連日服用したときの1秒量の改善を主要評価項目として、2009年8月までに111例がエントリーされ、2010年8月に終了、最終解析が行われた。新潟大学と近畿中央胸部疾患センターでも2008年5月に開始され、2009年8月までに28例が登録され、24例が1年間の服薬を完遂した。有害事象は2010年2月までに新潟と近畿で299件確認されたが、入院を要するものが3件あり、いずれも治験薬を一時中止し、治療により回復した。2010年9月に終了し、適格とされた89例が解析の対象となり、2010年12月に解析結果が報告された。主要評価項目である投薬期間中の1カ月間の1秒量の傾き(変化量)は、実薬46例が $1 \pm 2 \text{ ml}$ の増加、偽薬43例では $12 \pm 20 \text{ ml}$ の減少であり、両群の有意差は $p < 0.001$ であった(図3)。

結果として、12カ月の実薬群の1秒量の増加は、平均 19 ml であり、努力性肺活量の増加は、 97 ml であった。有害事象は、実薬群が偽薬群に比べて有意に多かったが、入院を要する重篤有害事象は、実薬群が23例に対して、偽薬群24例であり、有意差がなかった。以上のことから、LAMに対してシロリムスは、肺機能の悪化を緩和し、進行を阻止する効果があり、また、著しい副作用がないことを示唆していた(図4)。

IV. LAMに対するシロリムスの安全性確立のための医師主導治験

MILES試験の成功を受けて2011年春、米国ファイザー

社では、FDAへの薬事承認申請を検討したが、同薬の物質特許有効期間が殆ど残されていないことから、LAMに対する適用拡大をFDAに申請しないことを決めた(現在検討中である)。代わりにわが国では高度医療申請を計画していた新潟大学、順天堂大学、近畿中央胸部疾患センターなど9施設への治験薬の無償供与とノーベルファーマ社へのライセンスアウトを決めた。ファイザー社が承認申請をしないことを決めたことから、高度医療申請も未承認薬検討会への上程も不可能となり、2011年7月9施設は医師主導治験を実施することを決めた。このデータを評価資料として、2013年8月にノーベルファーマ社が6カ月目のデータをもとに薬事承認申請を行い、研究期間中に承認を得る予定である。2012年9月より、治験は開始され、既に目標症例の97%を登録した。また、シロリムスは副作用が多く報告されているので、本治験でシロリムスのLAM患者への長期投与の影響を明らかにし、同時に全国のLAM化学療法の出発病院創りを目指している。

V. おわりに

LAM患者のQOLの向上を目指して、シロリムスがわが国で実用化される目処が立ったのは、まことに喜ばしいことである。しかし、2006年のMILES試験参加決定からいままでの6年以上の道のりを考えると、あまりにも回り道をしたという忸怩たる思いもある。国は難病新法制定に向けてようやく動きはじめたが、稀少難病の治療薬開発

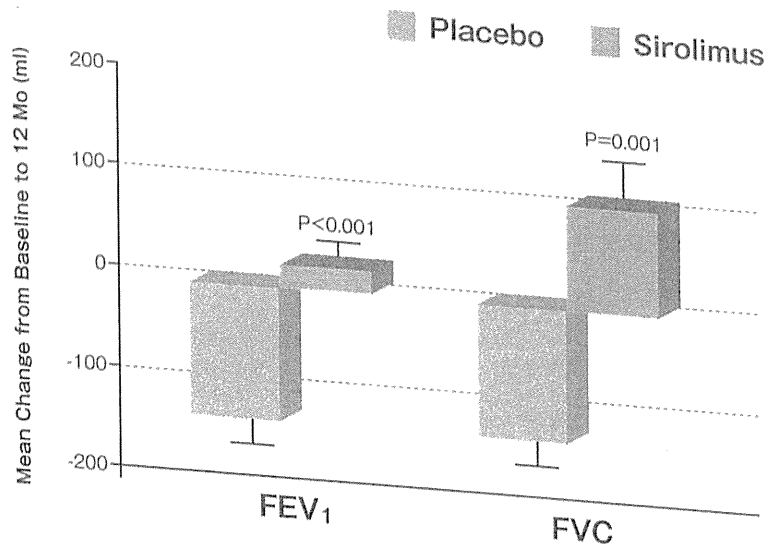
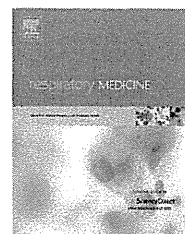
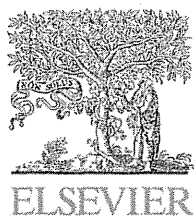


図4 治療期12カ月後の1秒量と努力性肺活量の平均(±SE)変化量 (McCormack FX, et al¹⁵⁾, *N Engl J Med* 364:2011より引用)

については、製薬企業がキャスティングボードを握っているという現状に変わりはない。利益の少ない稀少疾患の新薬開発に製薬企業をどのように向かわせるかという具体的なビジョンが必要であろう。

文 献

- Sullivan EJ. Lymphangioleiomyomatosis: A review. *Chest* 114:1689—1703, 1998
- Gomez M, Sampson J, Whittemore V. In: The tuberous sclerosis complex, Third ed, Oxford University Press, Oxford, England: 1999
- Johnson SR, Tattersfield AE. Decline in lung function in lymphangioleiomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 160:628—633, 1999
- 林田美江 藤本圭作 久保恵嗣ほか. 肺リンパ管筋腫症に関する全国疫学調査追跡調査および第2回全国横断調査. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業呼吸不全に関する調査研究: 37—41, 2008
- Bissler JJ, Kingswood JC. Renal Angiomyolipomata. *Kidney Int* 66:924—934, 2004
- Bernstein SM, Newell JD Jr, Adamczyk D, Mortensen R, King TE Jr, Lynch DA. How common are renal angiomyolipomas in patients with pulmonary lymphangioleiomyomatosis? *Am J Respir Crit Care Med* 152:2138—2143, 1995
- van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Kwiatkowski DJ, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 277(5327):805—808, 1997
- Consortium, E.C.T.S. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. *Cell* 75:1305—1315, 1993
- Ito N, Rubin GM. Gigas, a Drosophila homolog of tuberous sclerosis gene product-2, regulates the cell cycle. *Cell* 96:529—539, 1999
- Potter CJ, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 105:357—368, 2001
- Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, Breuer S, Thomas G, Hafen E. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nat Cell Biol* 5:559—565, 2003
- Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 5(6):578—581, 2003
- Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK, Yeung RS, Walker CL, Noonan D, Kwiatkowski DJ, Chou MM, Panettieri RA Jr, Krymskaya VP. Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM). *J Biol Chem* 277:30958—30967, 2002
- Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chunk G, Leonard JM, Schmthorst VJ, Laor T, Brody AS, Bean J, Salisbury S, Frank DN. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 358:140—151, 2008
- McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Blantly ML, et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 364:1595—1606, 2011



Prevalence and clinical features of lymphedema in patients with lymphangioliomyomatosis

Yoshito Hoshika^{a,f,*}, Takako Hamamoto^b, Kayoko Sato^c,
Hikaru Eto^d, Sachiko Kuriyama^a, Kaku Yoshimi^a,
Shin-ichiro Iwakami^e, Kazuhisa Takahashi^a, Kuniaki Seyama^{a,f}

^aDivision of Respiratory Medicine, Juntendo University Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8421, Japan

^bTokyo Vascular Clinic, Goto College of Medical Arts and Sciences, Shinjuku Kokusai Bldg. Anex 6F, 6-6-3 Nishi-Shinjuku, Shinjuku-Ku, Tokyo 160-0023, Japan

^cLymphedema Institute, Goto College of Medical Arts and Sciences, Shinjuku Kokusai Bldg. Anex 6F, 6-6-3 Nishi-Shinjuku, Shinjuku-Ku, Tokyo 160-0023, Japan

^dDepartment of Dermatology, St. Luke's International Hospital, 9-1 Akashi-cho, Chuo-Ku, Tokyo 104-8560, Japan

^eDepartment of Respiratory Medicine, Juntendo University Shizuoka Hospital, 1129 Nagaoka, Izunokuni-shi, Shizuoka 410-2295, Japan

^fThe Study Group of Pneumothorax and Cystic Lung Diseases, 4-8-1 Seta, Setagaya-Ku, Tokyo 158-0095, Japan

Received 4 February 2013; accepted 28 April 2013

Available online 18 May 2013

KEYWORDS

Complex
decongestive
physiotherapy;
Fat-restricted diet;
Gonadotropin-
releasing hormone;
Lymphedema;
Lymphangio-
leiomyomas;
Lymphoscintigraphy

Summary

Background: Lymphangioliomyomatosis (LAM) is a rare cystic lung disease predominantly affecting young women. Some of these patients develop lymphedema of the lower extremities and buttocks; however, neither the exact frequency of LAM-associated lymphedema nor the clinical features of such patients is well delineated.

Objectives: To document the frequency, features, and treatment of LAM-associated lymphedema.
Methods: We reviewed all medical records of patients listed in the Juntendo University LAM registry for the 30 years preceding August 2010.

Results: Of 228 patients registered with a diagnosis of LAM, eight (3.5%) had LAM-associated lymphedema of the lower extremities. All were females with sporadic LAM, and their mean age when diagnosed was 32.5 years (range 23–44). Lymphedema of the lower extremities was the chief or a

* Corresponding author. Division of Respiratory Medicine, Juntendo University Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8421, Japan. Tel.: +81 3 5802 1063; fax: +81 3 5802 1617.
E-mail address: yhoshika@juntendo.ac.jp (Y. Hoshika).

prominent presenting feature in five of these LAM patients. CT scans showed that all eight patients had enlarged lymph nodes (lymphangioliomyomas) in the retroperitoneum and/or pelvic cavity. Yet, cystic destruction of the lungs was mild in four patients, moderate in two and severe only in two. Seven of these patients were treated by administering a fat-restricted diet and complex decongestive physiotherapy, and four received a gonadotropin-releasing hormone analog. With this combined protocol, all eight patients benefitted from complete relief or good control of the lymphedema.

Conclusions: Lymphedema is a rare complication of LAM and may be associated with axial lymphatic involvement or dysfunction rather than severe cystic lung destruction. The combined multimodal treatments used here effectively resolved or controlled LAM-associated lymphedema.
© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The neoplastic disease lymphangioliomyomatosis (LAM) predominantly affects the lungs of young women but also occurs along the axial lymphatic systems, including lymph nodes in the mediastinum, retroperitoneum, pelvic cavity, and thoracic ducts. This rare disease is characterized by the proliferation of LAM cells (smooth muscle-like cells) and LAM-associated lymphangiogenesis. LAM cells are considered to be transformed by abnormalities of either the *TSC1* or *TSC2* tumor suppressor gene.^{1,2}

The clinical manifestations of LAM include exertional dyspnea, spontaneous pneumothorax, hemoptysis, chylous pleural effusion, and symptoms associated with extrapulmonary involvement.³ The representative extrapulmonary problems are chylous ascites and lymphangioliomyomas (of axial lymph nodes and lymphatics) in the retroperitoneum and pelvic cavity. Lymphangioliomyomas usually do not exhibit symptoms. However, some LAM patients may feel unexplained pain or distension and also lymphedema of the lower extremities and buttocks.

Lymphedema is the result of protein-rich interstitial volume overload, secondary to lymph drainage failure in the face of normal capillary filtration.⁴ This state occurs when there is an inherent defect within the lymph-carrying conduits, termed "primary lymphedema," or damage arises, termed "secondary lymphedema" (e.g., pressure from tumors, scar tissue after radiation, surgical removal of lymph nodes, etc.). Because lymphedema is often difficult to cure, the result may be such psychological sequelae as frustration, distress, depression and anxiety.^{5,6} For many of these patients, the quality of life becomes impaired.

Since the exact frequency of LAM-associated lymphedema and clinical features of LAM patients whose condition is complicated by lymphedema are not well delineated, we retrospectively reviewed our LAM registry. The purpose was to understand and alleviate the troubling outcome of this disease.

Methods

Identification of patients with LAM-associated lymphedema

As of August 2010, we retrospectively reviewed medical records of patients with LAM who visited the Department of

Respiratory Medicine, Juntendo University Hospital, and were recorded in the Juntendo LAM registry since 1980. We found LAM-associated lymphedema of the lower extremities in eight (3.5%) of 228 LAM patients. We then analyzed followup notations from their medical records: that is, age at the diagnosis of LAM, symptoms, radiological findings on scans from the chest to pelvic cavity based on either computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI), and treatment for LAM and LAM-associated lymphedema. Lymphedema was diagnosed from physical examination, imaging (lymphoscintigraphy, MRI, CT and/or ultrasonography) and exclusion of other diseases that cause edema in the lower extremities.

Grading of cystic lung destruction

The severity of cystic lung destruction due to LAM was assessed visually according to the modified Goddard scoring system.⁷ Six images were selected (bilateral lung field in the upper, middle, and lower axial lung slices) and analyzed. Each image was classified as normal (score 0), $\leq 5\%$ affected (score 0.5), $\leq 25\%$ affected (score 1), $\leq 50\%$ affected (score 2), $\leq 75\%$ affected (score 3), $> 75\%$ affected (score 4), giving a minimum score of 0 and maximum of 4. An average score of all images was considered as a representative value of the severity of cystic destruction (mild, score < 1 ; moderate, 1–2.5; and severe, > 2.5).

Classification of lymphedema

The severity of lymphedema was determined from classifications of the International Society of Lymphology⁸ and is summarized briefly as follows. Stage 0 refers to a latent or sub-clinical condition in which swelling is not evident despite impaired lymph transport. Stage I represents an early period of the condition when the accumulated fluid is relatively high in protein content but subsides with limb elevation. Pitting may occur in stage I lymphedema. Stage II signifies that limb elevation alone rarely reduces tissue swelling, and pitting is manifested routinely. Stage III encompasses lymphostatic elephantiasis without pitting but includes trophic skin changes.⁸

Complex decongestive physiotherapy (CDP)

We performed complex decongestive physiotherapy (CDP), which is a two-phase noninvasive therapeutic regimen,

according to the study reported by Ko et al.⁹ Briefly, the first phase treatment consists of manual lymph massage (MLM), compression therapy (multilayered inelastic compression bandaging/elastic stocking), remedial exercises, and skin care. The phase two treatment focuses on continuous self-care at home by means of daytime elastic stocking compression, MLM, and continued exercises. Since some LAM patients had advanced lung involvement or were complicated with chylous pleural effusion, chylous ascites, or both, some components of the first phase treatment were needed to be modified (the intensity and duration of MLM, type and material of bandaging, degree of compression applied by elastic garments, etc.) or customized (exclusion of compression therapy and remedial exercise), depending on the patient's clinical condition.

Results

Prevalence and clinical features of LAM-associated lymphedema

We reviewed medical records of 228 patients with LAM (203 with sporadic LAM and 25 with TSC-LAM) who visited our hospital from 1980 to August 2010. Among them, eight female patients (3.5%) were identified as having LAM-

associated with lymphedema in the lower extremities and buttocks (Table 1). All 8 LAM patients were sporadic LAM. In contrast, none of TSC-LAM in our cohort complicated LAM-associated lymphedema in the lower extremities and buttock. One TSC-LAM patient with lymphedema in the lower extremities was excluded since it was due to the surgical resection of intrapelvic tumor (uterine anigosarcoma).¹⁰ The patients' mean age at the diagnosis of LAM was 32.5 years (range 23–42), and their mean age at the onset of lymphedema was 33.4 years (range 23–42).

Notably, lymphedema of the lower extremities was an important determinant or confirming factor in the diagnosis of LAM for five patients; the remaining three patients had lymphedema transiently or occasionally during their disease course. Usually, the lymphedema occurred in the lower limbs (seven of eight patients) with the left leg more frequently involved than the right, and two patients had these swellings in bilateral lower extremities. Patient #6 (JUL216, 42-years-old) had lymphedema of her left thigh with a skin color change that induced her to seek a medical evaluation and eventually led to the diagnosis of LAM (Fig. 1). Two patients {patient #4 (JUL181) and patient #5 (JUL213)} had lymphedema in the buttocks as well as lower extremities. Patient #7 (JUL221) had transient lymphedema around the left lower abdominal area only when she wore tight underwear (Fig. 2B). The severity of lymphedema was

Table 1 Clinical features of study population with LAM-associated lymphedema.

	Patient #1	Patient #2	Patient #3	Patient #4	Patient #5	Patient #6	Patient #7	Patient #8
Registry number	JUL112	JUL127	JUL130	JUL181	JUL213	JUL216	JUL221	JUL129
Age at the diagnosis of LAM	28	27	40	35	23	42	33	32
Age at the onset of lymphedema	28	27	44	37	23	42	34	32
History of PTX	–	–	+	–	+	–	–	+
Presenting feature	Lymphedema	Lymphedema	PTX	DOE	Lymphedema	Lymphedema	Medical checkup	Lymphedema
Site of lymphedema	Bilateral LE	Right LE	Left LE	Right LE Buttock	Bilateral LE Buttock	Left LE	Lower abdomen	Left LE
Stage of lymphedema before treatment	2	2	2	2	2	2	1	2
after treatment	0	0	0	0	1	1	0	0
Serum VEGF-D (pg/ml)	1357	6080	10,900	16,800	10,869	7398	1904	3010
Severity of cystic destruction on chest CT	Mild	Severe	Moderate	Severe	Moderate	Mild	Mild	Mild
Lymphangio- leiomyomas	R	R	R + Pv	R + Pv	Inguinal	R + Pv	Pv	R + Pv
Chylous pleural effusion	–	+	–	–	+	–	–	–
Chylous ascites	–	+	+	+	+	–	–	–
Angiomyolipoma	–	–	Left kidney	–	–	–	–	–
Treatment	FRD, CDP	FRD, CDP, GnRH, HOT	FRD, CDP, GnRH	FRD, CDP, GnRH, HOT	FRD, CDP, GnRH, HOT	FRD, CDP	Instruction only	FRD, CDP

Abbreviations: CDP, complex decongestive physiotherapy; DOE, dyspnea on exertion; FRD, fat-restricted diet; GnRH, gonadotropin-releasing hormone analog; HOT, home oxygen therapy; LE, lower extremity; PTX, pneumothorax; R, lymphangioleiomyomas in the upper abdominal region of retroperitoneum; and Pv, lymphangioleiomyomas in the pelvic cavity.

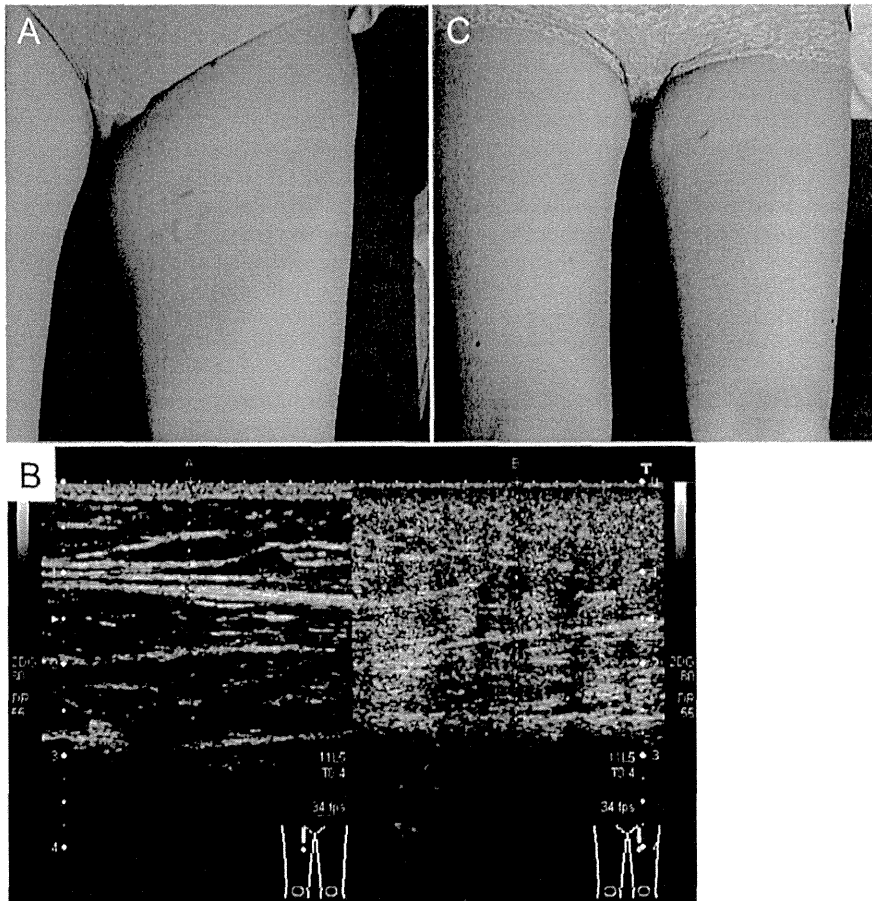


Figure 1 A representative portrait of LAM-associated lymphedema (patient #6, JUL216). Here, the left thigh was swollen, and inner side of its proximal portion showed rubor (A). Ultrasonography of both thighs revealed increased intensity and widening of the subcutaneous layer only in the left thigh (B). In panel B, the scan on the left illustrates the right thigh, and that on the right pictures the left thigh, supporting the diagnosis of lymphedema (stage 2). After CDP, lymphedema of left thigh decreased from stage 2 to 1 (C).

classified as stage 2 in seven of these eight patients; only patient #7 was at stage 1. Lymphoscintigraphy was performed on three patients and enabled the identification of a blockade that impeded normal axial lymphatic flow as shown in the representative example appears of Fig. 3.

Clinical features of patients with LAM and associated lymphedema

The pulmonary and extrapulmonary findings of LAM as well as treatments administered for LAM and LAM-associated

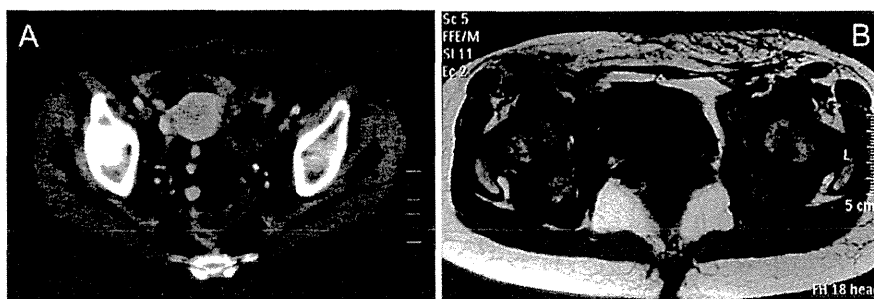


Figure 2 Representative images of lymphangioliomyomas in the pelvic cavity and lymphedema of the lower abdominal skin (patient #7, JUL 221). Computed tomography of the pelvic cavity after intravenous injection of contrast material revealed cystic lymphangioliomyomas along the left internal iliac vessels (A). T1-weighted MRI axial images without contrast material demonstrated thickening and fluid accumulated in the subcutaneous tissue of the left lower abdominal skin (B).

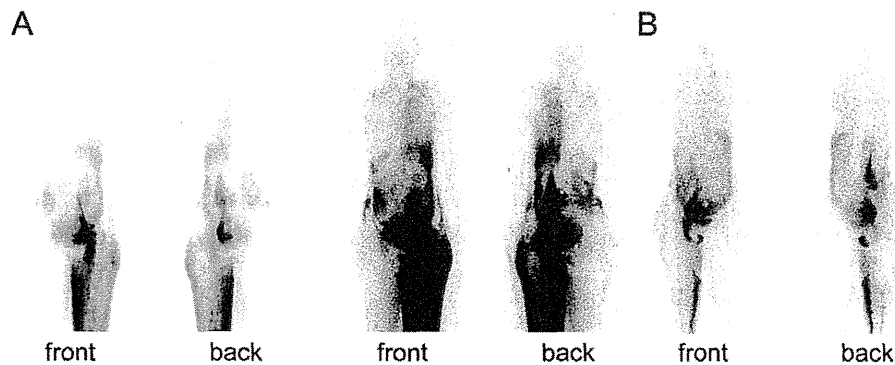


Figure 3 Lymphoscintigraphy of the lower extremities (patient #5, JUL213). This lymphoscintigram scanned 60 min after the subcutaneous injection of ^{99m}Tc -labeled human serum albumin (^{99m}Tc -HAS) at instep (A, left and B, right) revealed a marked dermal backflow of ^{99m}Tc -HAS due to a blockage of the normal axial lymphatic flow. A: left lower extremity with two differentially gained-images. B: right lower extremity.

lymphedema are summarized in Table 1. With respect to findings, the extent of cystic destruction of the lungs was mild in four patients, moderate in two and severe in two. Two patients {patient #2 (JUL127) and patient #5 (JUL213)} showed ground glass attenuation of the lungs suggesting lymphedema. However, there was no correlation between the severity of cystic destruction of the lung and LAM-associated lymphedema. All eight patients had lymphangioleiomyomas (enlargements of lymph nodes and/or lymphatics): seven patients had this condition in the retroperitoneum from an upper abdominal area to the pelvic cavity (Fig. 2A) but only patient #5 was similarly affected in the right inguinal area. Chylous pleural effusions were present in two patients and chylous ascites in four of them. Moreover, two patients suffered chylous pleural effusion and also ascites. An angiomyolipoma was evident in only one patient {patient #3 (JUL130)}. Measurement of the serum vascular endothelial growth factor (VEGF-D) showed a concentration of more than 800 pg/ml, indicating a possible diagnosis of LAM (Table 1).

Treatment for these patients varied over the long term of this study. Seven patients were treated with a fat-restricted diet (FRD) and complex decongestive physiotherapy (CDP). Four received monthly subcutaneous injections of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analog. The CDP, which was administered to seven patients, provided complete relief or substantial control of their lymphedema (Fig. 1B). For patient #7 (JUL221), no specific treatment was required, since wearing less restrictive underwear was enough to resolve her lymphedema.

Discussion

For the present study, we established the frequency of LAM-associated lymphedema over a 30-year-period in one hospital and analyzed the clinical features of patients whose LAM was complicated with lymphedema. Lymphedema was noted in 3.5% (8 of 228) of these LAM patients and was the main or at least an important presenting symptom of LAM in five of the eight patients. Therefore,

the frequency of lymphedema as a presenting feature of LAM in this group was 2.2% (5/228). In none of these patients did the severity of lymphedema exceed the classification of stage 2 or less. Prior to our study, only three case reports about LAM-associated lymphedema of the lower extremities appeared in the literature,^{11–13} and its exact incidence remained unknown.

The diagnosis of LAM as an underlying cause of lymphedema is often challenging. Generally, secondary lymphedema is caused by axillary, pelvic or inguinal lymph node dissection and/or radiation for the treatment of malignancy or infections, those diseases or conditions eventually resulting in the obstruction of lymphatics. Accordingly, the diagnosis of secondary lymphedema would not be difficult if symptoms or a past history indicated an impact on lymphatic drainage. Similarly, physical findings such as non-pitting edema and Stemmer sign would serve as clues. Furthermore, secondary lymphedema typically involves a single limb, whereas more widespread involvement may be seen in primary hereditary lymphedema.¹⁴ In our study, LAM was at an early stage (mild degree), most often with unremarkable physical findings. In 25% of these patients, lymphedema developed in both lower extremities. Therefore, it is worth emphasizing that here and elsewhere, ultrasonography and MRI have been useful for diagnosing the lymphedema and that lymphoscintigraphy helped to delineate the functional and physiological derangement of lymphatic flow in the affected areas (Figs. 1–3).^{14–16} However, even if we can establish the diagnosis of lymphedema, LAM would not be considered as an underlying disease unless characteristic LAM-related symptoms and findings such as exertional dyspnea, pneumothorax, chyle leak, etc., are present. Instead, lymphomas or soft tissue neoplasms would most likely be suspected, since enlarged lymph nodes (lymphangioleiomyomas) mimicking abdominal tumors can be demonstrated in the retroperitoneum, pelvic cavity, or inguinal area. Indeed, all eight LAM patients with lymphedema in their lower extremities or lower abdomen had lymphangioleiomyomas that were then extirpated completely in the three patients (patients #1, #2, and #8) whose clinical diagnoses suggested soft tissue neoplasm or lymphoma.

The reason why some LAM patients suffer from lymphedema and its mechanism(s) remain unknown. LAM is a neoplastic disease, characterized by both the proliferation of LAM cells and LAM-associated lymphangiogenesis,^{17,18} the latter presumably mediated by VEGF-D produced by LAM cells.¹⁹ Serum VEGF-D concentration was reported to be a good biomarker for lymphatic involvement in LAM²⁰ and indeed, five of eight patients in our study population showed very high serum VEGF-D concentration (>5000 pg/ml). Although the number of LAM patients analyzed here was small, no apparent correlation existed among serum VEGF-D level, extent of lymphangioliomyomas, and site or stage of lymphedema.

Although the existence of lymphangioliomyomas does not always lead to a LAM-associated lymphedema in the patient's lower extremities, subclinical dysfunction of axial lymphatics is clearly implied. Actually, the lymphedema around patient #7's left thigh and buttocks could be attributed to the restriction of tight clothing, since loosening her underwear resolved the lymphedema without further treatment. Patient #4 (JUL181) experienced lymphedema around the right buttock and thigh only after an abdominal bandage was applied to gently squeeze out chylous ascites. Even these few cases, though, illustrate the increased amount of subcutaneous lymphatic flow bypassing the usual axial lymphatic route with impaired drainage. Supporting this notion, lymphoscintigraphy clearly delineated a dermal lymphatic flow in patient #5 (JUL213) possibly due to a blockade of lymphatic flow draining into an axial lymphatics in the pelvic cavity from lower extremities by an inguinal lymphangioliomyoma (Fig. 3). Furthermore, subclinical lymphatic dysfunction has been supported by radiologic findings that the size of lymphangioliomyomas undergoes dramatic diurnal variation, i.e., enlargement in the afternoon resulting from increased lymphatic flow after physical activity in the morning.^{21,22}

Lymphedema is often difficult to treat, particularly if not diagnosed at an early stage.²³ In general, subcutaneous tissue becomes fibrotic and then spreads circumferentially if treatment is not initiated. Eventually, the involved skin becomes hyperkeratotic, hyperpigmented, and papillomatous or verrucous with increased skin turgor.⁶ The approach to managing lymphedema is largely dependent upon physiotherapeutic techniques. The term complex decongestive physiotherapy (CDP) refers to an empirically derived, multicomponent program that is designed to reduce the degree of lymphedema and to maintain the health of the skin and supporting structures.^{24–26} Some evidence indicates that this approach stimulates lymphatic transport and facilitates the dispersal of retained interstitial proteins. Seven patients reviewed here were treated with both CDP and FRD. Once lymphedema was ameliorated or completely resolved, the condition was sufficiently self-managed by CDP alone except for the four patients (patients #2–#5) with chylous effusions. GnRH therapy was added to the regimen of these four patients, and FRD continued. Although a controversy still existed regarding the effect of hormone therapy (estrogen-depleting treatment) on LAM, we added GnRH therapy to the regimen of these four patients who had chylous effusion to stabilize LAM and ameliorate chylous effusion. For all eight of these patients, lymphedema was mitigated completely or well-

controlled with CDP, GnRH therapy, and FRD. An additional possibility comes from recent evidence that sirolimus, a mTOR inhibitor, stabilizes lung function²⁷ and causes chylous effusion to subside.²⁸ Similarly, Chachaj et al. reported the successful treatment of lymphedema, chylous ascites, and pleural effusion with sirolimus.¹³ However, our combined multimodal approach is likely to be a choice for LAM-associated lymphedema without chylous effusion, particularly when sirolimus treatment is contraindicated.

In conclusion, this is the first review, to our knowledge, of the frequency of LAM-associated lymphedema and its clinical features. In even this small population of LAM patients, lymphedema appears to be a very important presenting feature that signals the possibility of LAM as an underlying disease. The dysfunction of axial lymphatics, undoubtedly caused by proliferation and infiltration of LAM cells along those sites, as well as the high level of serum VEGF-D quantified here are significant factors in the occurrence of lymphedema, but the reason why all LAM patients with these factors do not have lymphedema is unknown. The combined multimodal treatments documented in this analysis were effective for resolving or controlling lymphedema in patients with LAM.

Source of support

This study was supported by a grant to the Respiratory Research Group from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan; in part by the High Technology Research Center Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; and in part by the Institute for Environmental and Gender-Specific Medicine, Juntendo University, Graduate School of Medicine.

Conflicts of interest statement

None of the authors has any conflicts of interest with regard to this study.

Acknowledgment

We thank Phyllis Minick for excellent assistance in the review of English.

References

1. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(11):6085–90.
2. Sato T, Seyama K, Fujii H, Maruyama H, Setoguchi Y, Iwakami S, et al. Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangioliomyomatosis. *J Hum Genet* 2002; 47(1):20–8.
3. Hayashida M, Seyama K, Inoue Y, Fujimoto K, Kubo K. The epidemiology of lymphangioliomyomatosis in Japan: a nationwide cross-sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respirology* 2007; 12(4):523–30.
4. Kerchner K, Fleischer A, Yosipovitch G. Lower extremity lymphedema update: pathophysiology, diagnosis, and treatment guidelines. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59(2):324–31.

5. Tobin MB, Lacey HJ, Meyer L, Mortimer PS. The psychological morbidity of breast cancer-related arm swelling. Psychological morbidity of lymphoedema. *Cancer* 1993;72(11):3248–52.
6. McWayne J, Heiney SP. Psychologic and social sequelae of secondary lymphedema: a review. *Cancer* 2005;104(3):457–66.
7. Makita H, Nasuhara Y, Nagai K, Ito Y, Hasegawa M, Betsuyaku T, et al. Characterization of phenotypes based on severity of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2007;62(11):932–7.
8. Piller N, Carati C. The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema. *Lymphology* 2009;42(3):146–7.
9. Ko DS, Lerner R, Klose G, Cosimi AB. Effective treatment of lymphedema of the extremities. *Arch Surg* 1998;133(4):452–8.
10. Hayashi T, Koike K, Kumasaka T, Saito T, Mitani K, Terao Y, et al. Uterine angiosarcoma associated with lymphangioleiomyomatosis in a patient with tuberous sclerosis complex: an autopsy case report with immunohistochemical and genetic analysis. *Hum Pathol* 2012;43(10):1777–84.
11. Abe R, Kimura M, Airosaki A, Ishii H, Nakamura T, Kasai M, et al. Retroperitoneal lymphangioleiomyomatosis with lymphedema of the legs. *Lymphology* 1980;13(2):62–7.
12. van Lith JM, Hoekstra HJ, Boeve WJ, Weits J. Lymphoedema of the legs as a result of lymphangiomyomatosis. A case report and review of the literature. *Neth J Med* 1989;34(5–6):310–6.
13. Chachaj A, Drozd K, Chabowski M, Dziegiel P, Grzegorek I, Wojnar A, et al. Chyloperitoneum, chylothorax and lower extremity lymphedema in woman with sporadic lymphangioleiomyomatosis successfully treated with sirolimus: a case report. *Lymphology* 2012;45(2):53–7.
14. Szuba A, Shin WS, Strauss HW, Rockson S. The third circulation: radionuclide lymphoscintigraphy in the evaluation of lymphedema. *J Nucl Med* 2003;44(1):43–57.
15. Szuba A, Cooke JP, Yousuf S, Rockson SG. Decongestive lymphatic therapy for patients with cancer-related or primary lymphedema. *Am J Med* 2000;109(4):296–300.
16. Yamamoto R, Yamamoto T. Effectiveness of the treatment-phase of two-phase complex decongestive physiotherapy for the treatment of extremity lymphedema. *Int J Clin Oncol* 2007;12(6):463–8.
17. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Sato T, Souma S, Kondo T, et al. Lymphangiogenesis in lymphangioleiomyomatosis: its implication in the progression of lymphangioleiomyomatosis. *Am J Surg Pathol* 2004;28(8):1007–16.
18. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, et al. Lymphangiogenesis-mediated shedding of LAM cell clusters as a mechanism for dissemination in lymphangioleiomyomatosis. *Am J Surg Pathol* 2005;29(10):1356–66.
19. Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, et al. Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangioleiomyomatosis. *Lymphat Res Biol* 2006;4(3):143–52.
20. Glasgow CG, Avila NA, Lin JP, Stylianou MP, Moss J. Serum vascular endothelial growth factor-D levels in patients with lymphangioleiomyomatosis reflect lymphatic involvement. *Chest* 2009;135(5):1293–300.
21. Avila NA, Bechtel J, Dwyer AJ, Ferrans VJ, Moss J. Lymphangioleiomyomatosis: CT of diurnal variation of lymphangioleiomyomas. *Radiology* 2001;221:415–21.
22. Avila NA, Dwyer AJ, Murphy-Johnson DV, Brooks P, Moss J. Sonography of lymphangioleiomyoma in lymphangioleiomyomatosis: demonstration of diurnal variation in lesion size. *AJR Am J Roentgenol* 2005;184:459–64.
23. Erickson VS, Pearson ML, Ganz PA, Adams J, Kahn KL. Arm edema in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(2):96–111.
24. Lawenda BD, Mondry TE, Johnstone PA. Lymphedema: a primer on the identification and management of a chronic condition in oncologic treatment. *CA Cancer J Clin* 2009;59(1):8–24.
25. Rockson SG. Diagnosis and management of lymphatic vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(10):799–806.
26. Rockson SG. Lymphedema therapy in the vascular anomaly patient: therapeutics for the forgotten circulation. *Lymphat Res Biol* 2005;3(4):253–5.
27. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, et al., National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 2011;364(17):1595–606.
28. Taveira-DaSilva AM, Hathaway O, Stylianou M, Moss J. Changes in lung function and chylous effusions in patients with lymphangioleiomyomatosis treated with sirolimus. *Ann Intern Med* 2011;154(12):797–805.