目次

略語・略号一覧 2
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 参考文献 4

略語・略号一覧

略語･略号	内容
AKT	プロテインキナーゼ B
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的たんぱく質
PI3K	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ

2.6.1 緒言

本剤は、国内において2014年7月にリンパ脈管筋腫症を効能・効果として「ラパリムス®錠1 mg」の承認を世界に先駆けて取得している薬剤である。本申請は難治性脈管腫瘍・脈管奇形のうち難治性リンパ管疾患（・リンパ管腫（リンパ管奇形）・リンパ管腫症・ゴーハム病・リンパ管拡張症）に対する本剤の効能追加である。

難治性脈管腫瘍・脈管奇形は、難治性血管疾患と難治性リンパ管疾患に2分類され、主に小児期に発症する血管、リンパ管の形成異常の中で、頚胸部への浸潤による呼吸障害の発現、重篤な出血傾向、骨組織の進行性溶解などを示す難治性かつ時には致死的な症例をいう。現在、難治性脈管腫瘍・脈管奇形の治療においては、外科的処置、放射線照射及び薬剤治療が実施されているが、薬剤に関しては、国内外を問わず本疾患に対する適応を有する薬剤はない。

難治性脈管腫瘍・脈管奇形の治療法は病変部に対し、主に外科的切除、硬化療法（ピシバニール、ブレオマイシン、高濃度アルコール、高濃度糖水、フィブリン糊等）が行われるが外科的切除、硬化療法では治癒困難である場合、代替治療として、ステロイド、インターフェロン、プロプラノロール、化学療法（ビンクリスチン）などの薬物療法が行われることがある[1)]。しかしながら、これらの薬剤による有効率は20～45.8%（国内症例、臨床症状の改善度で判定）と低いだけでなく、晩期合併症、副作用などの問題がある。また、これらの薬剤は現時点で、難治性脈管腫瘍・脈管奇形に対して効能・効果を有していない[2、3、4)]。

難治性脈管腫瘍・脈管奇形の病因は明確になっていないものの、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）/プロテインキナーゼB（AKT）/哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR）経路の異常活性により、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞などの異常増殖を起こすことが原因の一つであると考えられている。また、mTORシグナルの促進は血管形成やリンパ管形成を制御している血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の発現を増加させ、腫瘍細胞の増殖や転移を促進する。従って、mTOR阻害剤のシロリムスは、細胞の分裂や増殖、生存などを調節するmTORに結合して、その活性化を抑制し、細胞増殖抑制とともに抗血管新生作用、抗リンパ管新生作用を示すことから、上記脈管疾患に対する有効性が期待される。

本剤の非臨床試験での薬理試験に関し、効力を裏付ける試験では公表論文（MEDLINEを用いて検索）の中からリンパ管腫や血管腫に関連した適切なin vitro及びin vivo試験を選択して纏め、CTD様式に編集した。安全性薬理試験、薬物動態試験は、ラパリムス®錠の初回承認申請時に提出済みであることから新たな試験を実施しなかった。毒性試験については、今回の難治性リンパ管疾患を対象としたラパリムス®錠の効能追加申請に際して、その対象が主に小児患者であることから、幼若ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験をGLP適用下で追加実施し、それ以外の毒性試験は、ラパリムス®錠の初回承認申請時に提出済みであることから新たな試験は実施しなかった。

2.6.1.1 参考文献

1 血管腫・血管奇形・リンパ管奇形診療ガイドライン 2017（第 2 版 2017 年 3 月 31 日）
2 Ozeki M, Fujino A, Matsuoka K, Nosaka S, Kuroda T, Fukao T. Clinical Features and Prognosis of Generalized Lymphatic Anomaly, Kaposiform Lymphangiomatosis, and Gorham-Stout Disease. Pediatr Blood Cancer.2016;63(5): 832-838
3 平成 24、25 年度厚生労働省難治性疾患克服研究事業報告書「リンパ管腫症の全国症例数把握及び診断・治療法の開発に関する研究」研究代表者小関道夫
4 小関道夫，藤野明浩，松岡健太郎，野坂俊介，深尾敏幸．リンパ管腫症・ゴーハム病（総説シリーズ現代医学の焦点）：日本臨床．2015.第 73 巻・第 10 号．1777-88.

目次

略語・略号一覧 2
2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 3
2.6.2.2.1 in vitro 試験 3
2.6.2.2.2 in vivo 試験 8
2.6.2.2.3 作用機序 13
2.6.2.3 副次的薬理試験 17
2.6.2.4 安全性薬理試験 17
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 17
2.6.2.6 考察及び結論 18
2.6.2.7 参考文献 19

略語・略号一覧

略語･略号	内容
AKT	プロテインキナーゼ B
BrdU	ブロモデオキシウリジン
DMEM	ダルベッコ改変イーグル培地
DMSO	ジメチルスルフォキサイド
HD	正常ヒト皮膚（Human dermal）
EOMA	マウス血管内皮腫
FBS	胎児牛血清
GSK3β	グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ
HDMECs	ヒト皮膚微小血管内皮細胞
HUVEC	ヒト臍帯静脈細胞
LECs	リンパ管内皮細胞
LM	リンパ管奇形（lymphatic malformation）
LYVE-1	リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体 1
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質
PI3K	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ
RT-PCR	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
VEGF	血管内皮細胞成長因子
VEGFR	血管内皮細胞成長因子受容体

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

in vitro 試験において、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMECs）の構成細胞であるリンパ管内皮細胞（LECs）、ヒトリンパ管奇形患者由来のリンパ管内皮細胞及びマウス血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）の増殖をシロリムスは濃度依存的に抑制した。また、シロリムスはヒト LECs の遊走を抑制した。

in vivo 試験では、エマルジョン化した不完全フロントアジュバンド誘発性リンパ管内皮腫瘍、マウス血管内皮腫細胞移植、マウス静脈奇形及びマウス転移性膵臓腫瘍細胞移植の各腫瘍モデルにおいて、シロリムスを経口もしくは腹腔内投与したとき、これらの動物モデルでみられた腫瘍細胞の増殖をシロリムスは抑制した。また、シロリムスはこれらの腫瘍細胞のリンパ管新生や血管新生を抑制した。

ヒト LECs においてシロリムスは血管内皮細胞増殖因子（VEGF-C（VEGFR-2 及び VEGFR-3 に結合））、VEGF-A（VEGFR-2 に結合）又は VEGF-C*（VEGFR-3 選択的に結合：システイン 156 がセリンに置換されたもの）による p70S6 kinase のリン酸化促進作用を抑制した。マウス EOMA 細胞においは血清で活性化したプロテインキナーゼ B（AKT）(Ser473)、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR)、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ（GSK3β）及び S6 のリン酸化促進作用はシロリムスにより抑制された。シロリムスはヌードマウスの皮下に埋植した B13LM 細胞の LECs の増殖を抑制するとともに VEGF-A 及び VEGF-C の発現量も抑制した。

なお、各図表中の「Rapamycin」及び「Rapa」は全てシロリムスを示す。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 in vitro 試験

(1) ヒトのリンパ管内皮細胞（LECs）の増殖及び遊走に対するシロリムスの作用

添付資料番号＜4.2.1.1-1 参＞

ヒト LECs 増殖作用に対するシロリムスの作用を検討した試験では、抗ブロモデオキシウリジン（BrdU）抗体を用いて細胞増殖中に DNA に取り込まれた BrdU を検出することで細胞増殖を測定した。すなわちヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMECs）を 10μM BrdU とインキュベーションし、リン酸緩衝液で洗浄後フルオレセイン標識抗 BrdU 抗体と再度インキュベーションして細胞内に取り込まれた BrdU を 2 色フローサイトメトリーを用いて BrdU 陽性でかつリンパ管内皮ヒアルロン酸受容体 1（LYVE-1）陽性細胞数を計測した。なお、LECs は HDMECs をリンパ管のマーカーである LYVE-1 で染色し、LYVE-1 の抗体を用いて確認した。

なお、この試験で使用した LECs は磁気ビーズソーティング法により、HDMECs から LECs を単離した。単離した LECs の純度は 95%以上であった。

細胞遊走に対するシロリムスの作用に関する試験では、modified Boyden chamber assay により検討した。すなわち，MatrigelInvasion Chamber 24-well を用いるが、これは 2 層式のチャンバーで，ポアサイズ 8μm のメンブレンにより上下二層に分けられている。上層のみに LECs 2.5×10^5 cell を 500μL の MV Basal Medium に播種し， シロリムス（20 ng/ml）又はその媒体

（tap water）及びVEGF（血管内皮細胞増殖因子）-C（100 ng/mL）を添加した。24時間後に上層から下層へ移動し細胞数を計測した。

結果を図 2.6.2-1に示す。シロリムスは0.1～100 ng/mLの濃度の範囲内において濃度依存性にLECsの増殖を有意に抑制した（a）。0.1 ng/mLのシロリムスを添加したとき～50%の細胞増殖抑制作用が認められた。10 ng/mL以上の濃度のシロリムスでは、ほとんど完全に細胞増殖は抑制された。

リンパ管新生プロセスにおいて重要な細胞の遊走に対し、シロリムス20 ng/mLの作用を検討した試験では、シロリムスはLECsの遊走を有意に抑制した（b）。

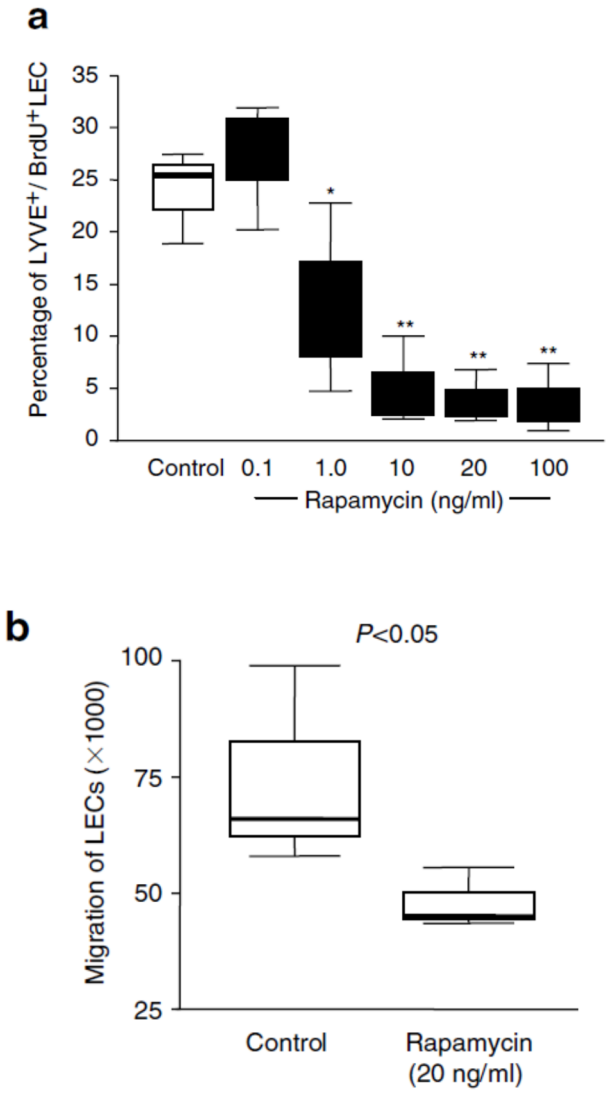


図 2.6.2-1 マウスリンパ管内皮細胞の増殖及び遊走に対するシロリムスの作用

（a）：増殖抑制作用
各グラフは実験を3回行い、3回の平均値±標準偏差を示す。
縦軸はBrdU陽性のLECsに占めるLYVE陽性細胞数の割合（%）示す。
横軸：シロリムスの濃度、mean±S.D、*p<0.05、*p<0.01 vs control（t-test）。

（b）：細胞遊走抑制作用
各グラフは実験を3回行い、3回の平均値±標準偏差を示す。
縦軸はmodified Boyden chamber assayを用いて25時間後の細胞遊走数を示す。

Mean±S.D、有意差検定はｔ testによる。

(2) リンパ管腫患者から樹立したリンパ管腫細胞に対するシロリムスの作用

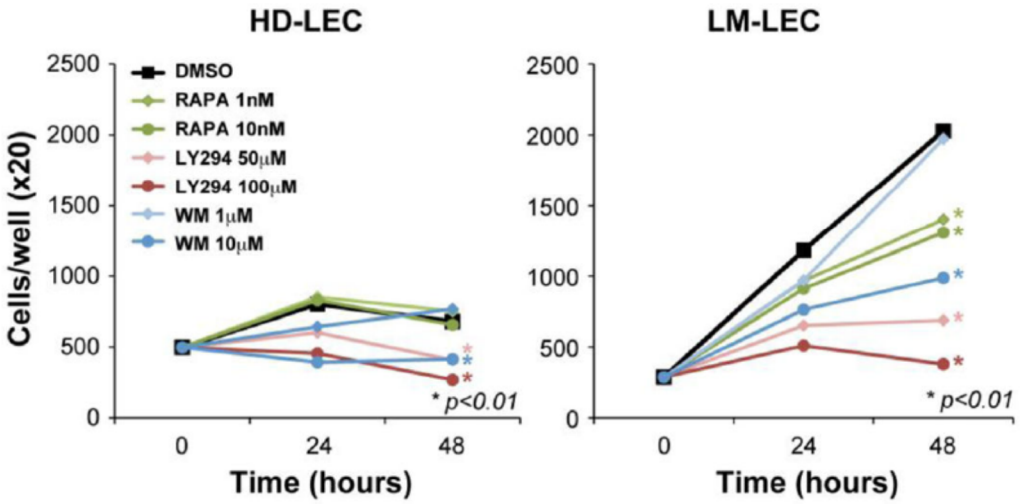
添付資料番号＜4.2.1.1-2参＞

試験はリンパ管腫患者から手術で切除した検体より樹立したリンパ管奇形（LM）-リンパ管内皮細胞（LECs）（PI3K遺伝子変異を有する）とヒト正常皮膚リンパ管内皮細胞（HD-LECs）の細胞増殖に対するシロリムスの作用を比較した。LM-LECs及びHD-LECsを48穴プレートに$10^4/cm^2$個を播きEBM2/10%胎児牛血清（FBS）培地液中で培養した。シロリムス（1及び10 nM)、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PIK3）阻害剤のLY-294（50及び100μM）とWortmannin（1及び10 μM）及びその媒体（DMSO）を加えた後24及び48時間にCoulter Counter又はHemocytometerにより細胞数を計測した。細胞スフェロイドのリンパ管新生の測定は、まずLM-LECs及びHD-LECsをEBM2/10%FBS溶液中で一昼夜サスペンドした後、細胞数が500個の細胞スフェロイドが形成されるが、この細胞スフェロイドをコラーゲンゲル中に包埋した。次にこれらの細胞スフェロイドに250 ng/mL VEGF-Cを加えて16時間処理する群とVEGF-Cを加えない未処理群との二群に分けた。ポリマー化する前にシロリムス（1及び 10 nM)、LY-294（50及び100μM)、Wortmannin（1及び10μM）又はその媒体のジメチルスルフォキサイド（DMSO）を添加し、16時間後に画像撮影を行い、スフェロイド中の新芽数をNIH ImageJ Softwareによりカウントした。

結果を図 2.6.2-2に示す。LM-LECsとHD-LECsに、シロリムスを添加し、細胞増殖数を比較したとき、シロリムスはHD-LECsの細胞増殖数には影響を与えなかったが、LM-LECsの細胞増殖数に対してはシロリムス添加48時間に濃度依存性に有意な細胞増殖数の抑制が認められた（a)。さらに、リンパ管新生に対してもシロリムスは有意な抑制作用を示した（b)。PIK3阻害剤のLY-294及びWortmanninはLM-LECs及びHD-LECsいずれの細胞に対しても有意な細胞増殖抑制作用及びリンパ管新生抑制作用を示した（a及びb)。

以上の結果から、シロリムスのLMに対する細胞増殖抑制作用が確認された。

a



b

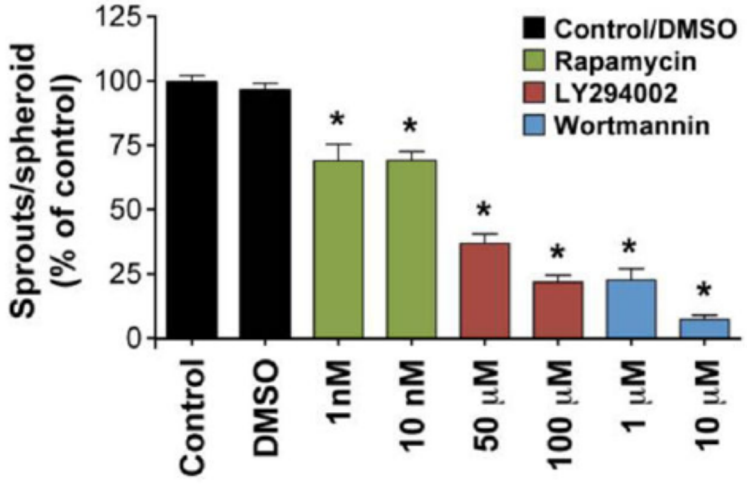


図 2.6.2-2 リンパ奇形患者由来リンパ管内皮細胞の増殖及びリンパ管新生に対するシロリムスの作用

a:リンパ管内皮細胞増殖に対するシロリムスの作用
　各データは平均値のみ表示
　縦軸：Well 中の細胞数、横軸：薬剤処理後の時間経過
b:リンパ管新生に対するシロリムスの作用
　Control は DMSO 無しの群
　n=10～15（スフェロイド数／各群）、mean±SEM、
　＊ p≦0.001 vs control/DMSO（ANOVA followed by Student's t-test）

(3) マウス血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）に対する作用

添付資料番号＜4.2.1.1-3 参＞

マウス EOMA 細胞の増殖に対するシロリムスの作用を検討した。EOMA 細胞を 10%FBS、抗生物質及び 4.5 g/L グルコースを含む Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）中にて順化した。FBS 欠乏 EOMA 細胞（serum free）は、1%FBS を含む DMEM で 18 時間、細胞を培養することで作製した。シロリムスは DMSO（2.5 mg/mL）に溶解した。種々の濃度（0、1、5、10 及び 20 nM、各群 n=4）のシロリムスを EOMA 細胞培養液に添加して 48 時間培養し、細胞増殖数を WST-1 cell proliferation アッセイ法により計測した。

細胞遊走に対するシロリムスの作用を検討した試験では、transwell migration assay 法を用いた。8 μm メンブレンで隔てられた上部と下部の chamber を用いて、上部 chamber にシロリムスで 48 時間処理した EOMA 細胞（細胞は 50%以上のコンフルエントまで増殖したもの）又は未処置細胞を播種し、下部 chamber には VEGF（10 ng/mL）などの化学誘引物質を含む medium（細胞増殖試験で用いた溶液）で満たした。24 時間インキュベーション後、遊走しなかった細胞を取り除いた。遊走した細胞を染色し、倒立型顕微鏡下に細胞数をカウントした。なお、データは化学誘引物質のない medium へ遊走した細胞を取り除いたサンプル 3 例(4 倍の高倍率レンズを使用)の平均値として表した。

EOMA 細胞増殖に対するシロリムスの作用の結果を図 2.6.2-3 に示す。EOMA 細胞は FBS 欠乏群に比べ 10%FBS 群では顕著に増殖したが、この細胞増殖は、シロリムスの添加により濃度依存性に有意に抑制された。さらに、図 2.6.2-4 に示したように、EOMA 細胞の遊走に対してもシロリムスは濃度依存性に抑制した。

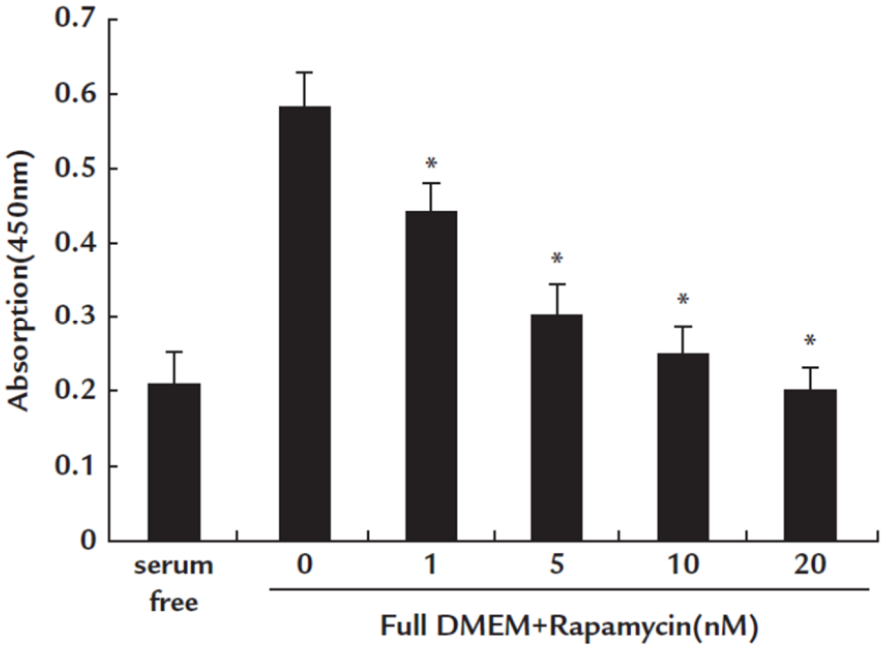


図 2.6.2-3 マウス血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）の増殖に対するシロリムスの作用

n=4、mean±SD、*p<0.05 vs serum control (by two tailed student t-test)
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
細胞増殖は WST-1 cell proliferation assay により測定した。

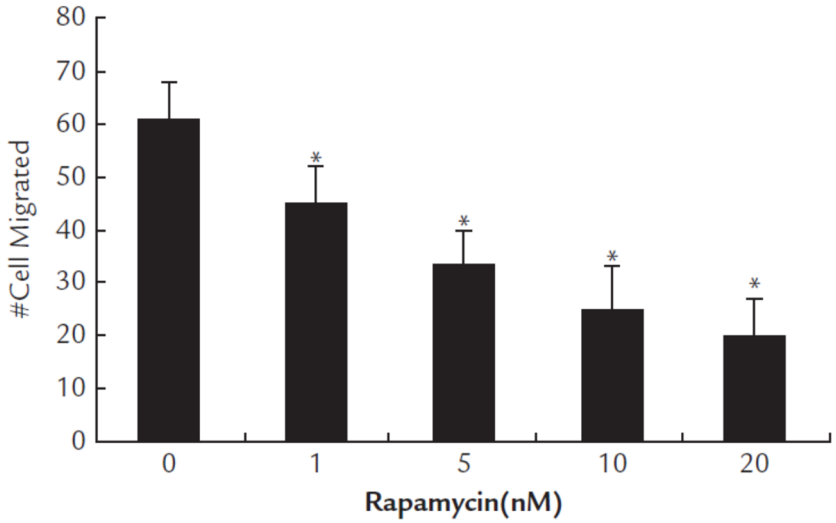


図 2.6.2-4 マウス血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）の遊走に対するシロリムスの作用

n=5 mean±SD、*p<0.05 vs control（by two tailed student t-test）

2.6.2.2.2 in vivo 試験

（1）マウスのリンパ管内皮腫瘍に対するシロリムスの作用

添付資料番号＜4.2.1.1-1 参＞

in vivo 試験において、二種類の動物モデルを用いてシロリムスの抗リンパ管腫瘍抑制作用を検討した。最初の実験では C57/BL6 マウスを使用した。腫瘍の作製にはエマルジョン化した不完全 Freund's adjuvant 200 mL をマウスの腹腔内に 2 回投与（初回投与時を 0 日目とし、この 2 週間後に 2 回目を投与）してリンパ管腫瘍を作製した。2 回目の投与後 4 週（28 日目）にマウスの横隔膜及び肝臓に発生したリンパ管内皮腫瘍（良性腫瘍）の面積は Patent Blue を投与し、その 15 分後に染色された腫瘍面積を測定した。なお、リンパ管は LYVE-1 を用いて免疫染色法により同定した。シロリムスの予防効果を検証する実験は、シロリムス 5 mg/kg/日（1 日の飲水量から算出、この投与量は臨床での血中濃度 5～20 ng/mL に範囲内に相当）をエマルジョン化した不完全 Freund's adjuvant 投与と同時にマウスに経口投与した。シロリムスの治療効果を検証する実験では、シロリムス 5 mg/kg/日をエマルジョン化した不完全 Freund's adjuvant の 2 回目の投与後 2 日にマウスに経口投与した。

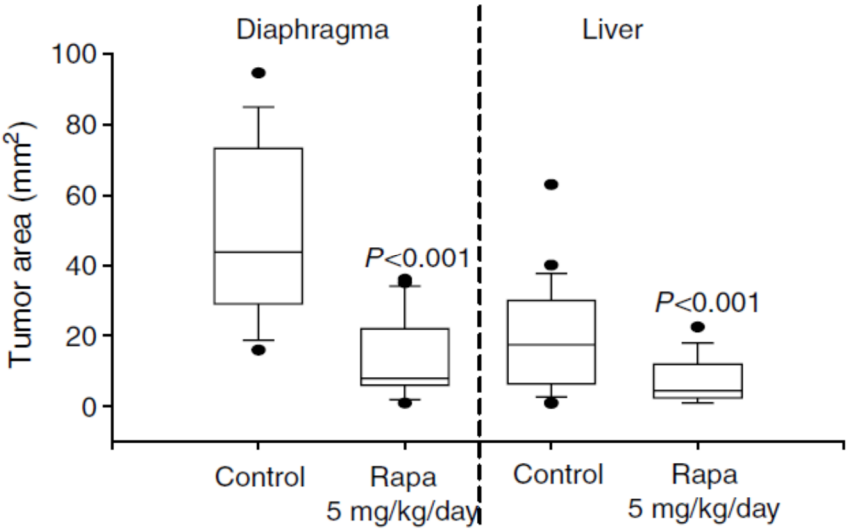
二番目の試験ではシロリムスの抗リンパ管腫瘍抑制作用において、シロリムスの免疫系抑制作用が関与しているか否かを検討する目的で、T 細胞欠損マウス（NMRI nu/nu マウス）を用いて C57/BL6 マウスでの予防効果を検証した実験と同様に行った。

C57/BL6 マウスにおけるシロリムスの腫瘍面積に対する作用を図 2.6.2-5 に示す。このマウスにエマルジョン化した不完全 Freund's adjuvant と同時にシロリムスを経口投与したとき、横隔膜及び肝臓のリンパ管腫瘍の面積は有意に減少した（a）。さらに、エマルジョン化した不完全 Freund's adjuvant 投与後 28 日目にシロリムスを経口投与して治療効果を検討したとき、すでに発症したリンパ管腫瘍の面積はシロリムスにより有意に減少した（b）。

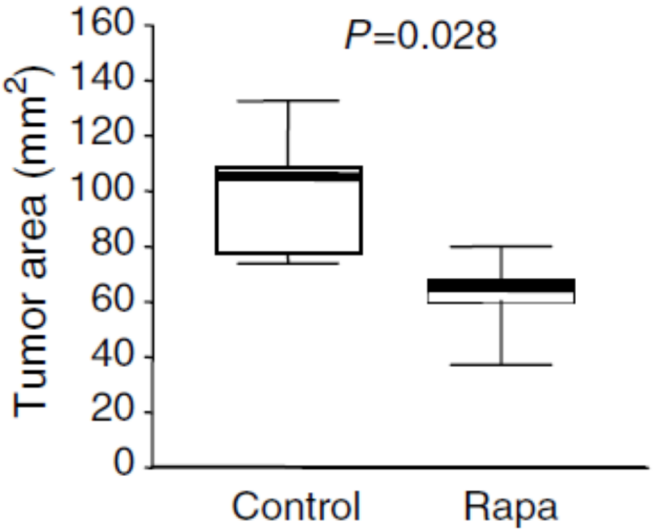
また、MRI nu/nu マウスにおいても腫瘍形成は確認され、腫瘍面積に対しシロリムスは有意に抑制した。一方、カルシニューリン阻害剤のサイクロスポリンは腫瘍面積を減少させなかった（c）。

以上の結果から、リンパ管腫瘍形成時及び腫瘍形成後にシロリムスを投与したとき、マウスリンパ管腫瘍の増殖はシロリムスにより抑制されることが示された。このシロリムスの抗腫瘍作用にはシロリムスの免疫抑制作用は関与していないことが示唆された。

a



b



c

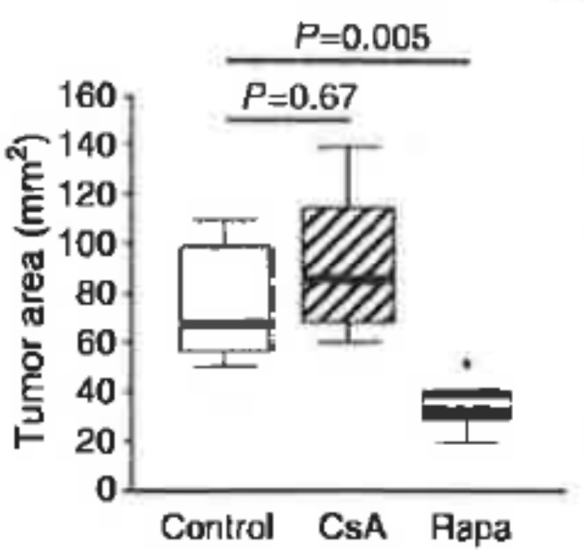


図 2.6.2-5 マウスのリンパ管内皮腫瘍に対するシロリムスの作用

a: エマルジョン化した不完全Freund's adjuvant 投与後（腹腔内に2回投与：初回は0day、2回目は 14 day）28日目の隔膜及び肝臓の腫瘍面積に対するシロリムス（5 mg/kg/day、 飲水投与）の作用
シロリムスはエマルジョン化した不完全Freund's adjuvant と同時投与（de novo lesions)。n=7、mean±SD、有意差検定は t-test を使用した。Rapa:シロリムス
b: エマルジョン化した不完全Freund's adjuvant 投与後（腹腔内に2回投与：初回は0day、2回目は 14 day）28日目の腹腔内腫瘍面積に対するシロリムス（5 mg/kg/day、 飲水投与）の作用
シロリムスはエマルジョン化した不完全Freund's adjuvant 投与後2日目から投与（pre-existing lesions)、c:a と同様な実験だが、用いたマウスは NMRI nu/nu マウス（T 細胞欠損）
CsA:シクロスポリン A

(2) マウス血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）に対するシロリムスの作用

添付資料番号＜4.2.1.1-3 参＞

試験では、4～6 週齢の雌性 Nu/Nu マウスを用いた。マウス脾腹に EOMA 細胞（マウス 1 匹につき 2×10^5 個/site を 2 sites に投与）を移植（皮下内投与、0 日）し、12 日間腫瘍の体積を測定した。腫瘍体積（cm^3）の大きさは clipper を用いて腫瘍移植後 2、4、6、10 及び 12 日に計測した。シロリムスは 0.5、1、1.5 及び 2 mg/kg を 12 日間毎日腹腔内に投与した。対照群には生理食塩液を投与した。各群あたり 5 匹のマウスを用いた。

in vivo 試験において（図 2.6.2-6)、シロリムスは 0.5 mg/kg の低用量から投与後 6～12 日にかけて移植した EOMA 細胞の増殖を有意に抑制した。しかし、最高用量のシロリムス 2 mg/kg を投与したときマウスは死亡した。

以上の結果から、シロリムス（0.5～1.5 mg/kg）は EOMA 細胞に対して腫瘍縮小効果を有することが示唆された。

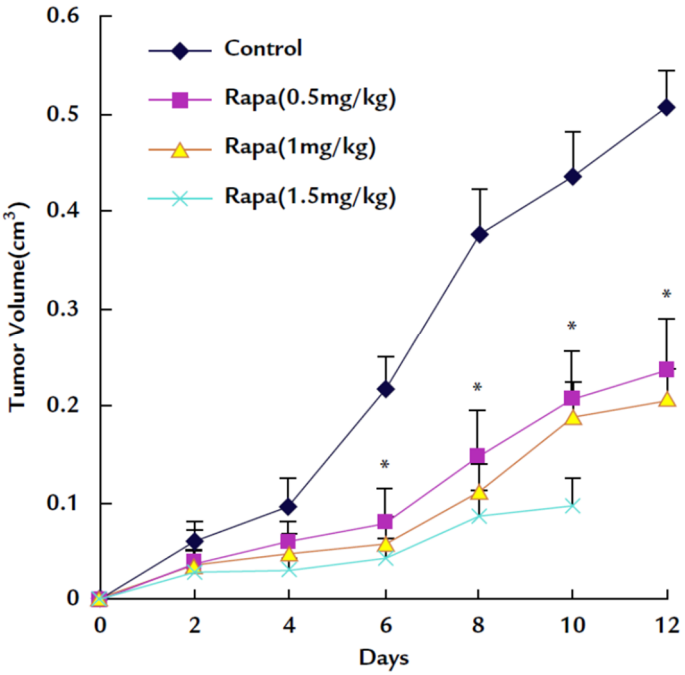


図 2.6.2-6 マウスの血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）に対するシロリムスの作用

N=5、mean±SE、*P<0.05 vs control（by tailed Student t test）

(3) マウス静脈奇形モデルに対するシロリムスの作用

添付資料番号＜4.2.1.1-4 参＞

静脈奇形の発症原因のひとつとして、血管内皮細胞の tyrosine kinase 受容体（TIE2）の活性化突然変異が指摘されており、静脈血管奇形を有する患者のほとんどに tyrosine kinase 受容体の突然変異体 TIE2-L914F が報告されている。そこで、この突然変異体を発現させた静脈血管奇形マウスを作製し、本薬の静脈奇形に対する作用を検討した。

6～7 週齢の雄性 athymic nu/nu マウスを用いた。このマウスに静脈血管奇形を惹起させるための腫瘍細胞については、ヒト臍帯静脈細胞（HUVEC）に TIE2 の遺伝子変異 TIE2-L914F を導入して発現させたレトロウイルスベクター法を用いて HUVEC-TIE2-L914F 腫瘍細胞を作製した。この方法で作製した HUVEC-TIE2-L914F 細胞をマウスの左右の背部（2 箇所）に移植し 12 日間放置した。移植後 12 日から 19 日までシロリムス 2 mg/kg を腹腔内に投与して HUVEC-TIE2-L914F 腫瘍細胞の面積、腫瘍内血管容量に対するシロリムスの作用を検討した。腫瘍の面積（mm^2）は、本薬投与後 2 日から 1 日おきに Clipper を用いて計測し、血管容量及び血流は超音波カラードプラ法（Vevo 2100 High Resolution Ultrasound System）を用いて測定した。また、シロリムスを長期間投与したときの腫瘍増加に対する作用を検討した試験では、腫瘍移植後 15 日から 35 日までの 20 日シロリムスを腹腔内に投与した。シロリムスの媒体として DMSO を投与した。

図 2.6.2-7 に示したように、シロリムスは投与 5 日後（17 日）から 7 日後（19 日）にかけて HUVEC-TIE2-L914F 腫瘍病変部の面積を有意に抑制した（a）。シロリムス投与 7 日後（19 日）における腫瘍内血管容量は、対照群に比べ、シロリムス群では有意に抑制された（b）。また、シロリムスの投与期間を 20 日間に延長したとき、対照群では腫瘍面積のさらなる増加がみられたが、シロリムス投与群の腫瘍面積は増加せず有意に抑制された（c）。

以上の結果から、マウス静脈血管奇形モデルにおいてシロリムスの静脈血管奇形に対する治療効果が確認された。

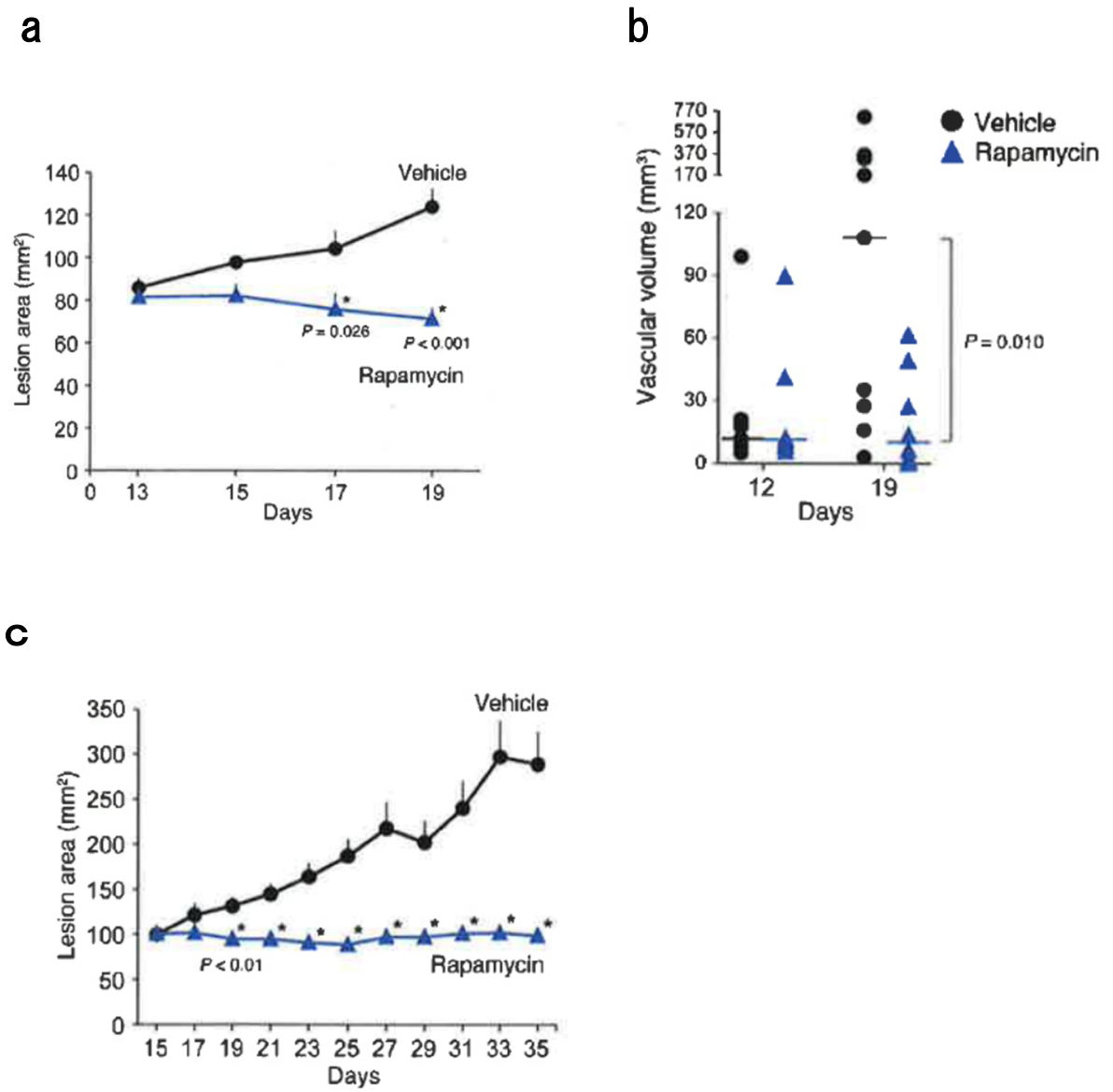


図 2.6.2-7 マウス静脈奇形モデルにおけるシロリムスの腫瘍縮小作用

a：シロリムスを HUVEC-TIE2-L914F 腫瘍細胞移植後 12 日から 19 日まで投与したときの腫瘍面積の経時変化
　n=5、mean±SE、t-test（二元配置反復測定分散分析（Two Way Repeated Measures ANOVA））
b:シロリムスを HUVEC-TIE2-L914F 腫瘍細胞移植後 12 日から 19 日まで投与し、シロリムス投与前（12 日）と投与 7 日後（19 日）の血管用量の比較
c:シロリムスを HUVEC-TIE2-L914F 腫瘍細胞移植後 15 日から 35 日まで投与したときの腫瘍面積の経時変化
　n=10、mean±SE、*p<0.01 vs vehicle（t-test）

2.6.2.2.3 作用機序

（1）シロリムスの LECs 増殖抑制における p70S6 kinase リン酸化抑制の関与

添付資料番号＜4.2.1.1-1 参＞

シロリムスの LECs 増殖抑制の作用機序として、シロリムスによる mTOR 依存性の p70S6 kinase（Thr^{389} サイト）のリン酸化抑制作用が関与しているか否か検討する目的で、Western blot 法を用いて評価した。単離した LECs を内皮細胞用培地（cell growth medium MV:すべてのサプリメントは含むが細胞成長因子は含まない）に 100 ng/mL VEGF-C を加えて培養した。LECs をサプリメント及び血清を枯渇した内皮細胞用培地で 16 時間放置し、20 ng/mL シロリムス又はその媒体を加えさらに 1 時間培養した。シロリムスの phospho-p70S6K(P-Thr^{389})に対するリン酸化は phospho-p70S6K (P-Thr389) の抗体を用いた Western blot 法により検出した。上記試験と同様ではあるが、VEGF-C の代わりにリコンビナント（r）VEGF-A_{165}（50 ng/ml）、rVEGF-C（200 ng/mL）又は rVEGF-C*（cysteine156 が serine に置換）を使用して LECs を刺激したときのリン酸化亢進作用に対するシロリムス作用を検討した。

図 2.6.2-8 に示したように、LECs において 20 ng/mL のシロリムスは VEGF-C（VEGFR-2 及び VEGFR-3 に結合）刺激による p70S6 kinase のリン酸化亢進作用を完全に抑制した（a）。VEGF には種々のアイソフォームがあることから血管内皮細胞受容体を刺激する VEGF-A（VEGFR-2 に結合）又は VEGF-C*（VEGFR-3 選択的に結合）の刺激による p70S6 kinase のリン酸化作用に対するシロリムスの作用をこれらの VEGF のリコンビナント体を用い LECs において検討した（b）。rVEGF-A 及び rVEGF-C いずれも顕著な p70S6 のリン酸化促進作用を示したが、rVEGF-C*のリン酸化亢進作用はマイルドであった。しかし、シロリムスはすべての VEGF アイソフォーム刺激による p70S6 kinase のリン酸化亢進作用を抑制した。

以上に結果から、シロリムスの抗 LECs 増殖作用はシロリムスによる mTOR 阻害作用を介した p70S6 リン酸化抑制作用が寄与していることが示唆された。

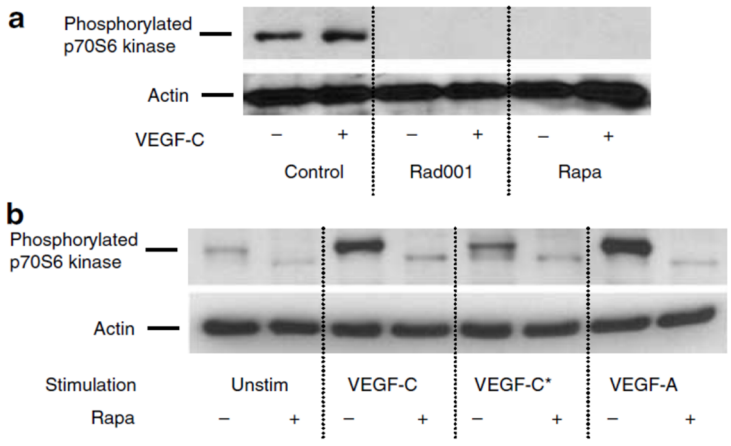


図 2.6.2-8 種々の VEGF 刺激による LECs の mTOR 依存性 p70S6 kinase リン酸化作用に対するシロリムスの作用

a:p70S6 kinase の VEGF-C（200 ng/mL）刺激によるリン酸化作用に対するシロリムス及び Rad001 の作用
LECs は磁気ビーズソーティング法により、HDMECs から LECs を単離した。p70S6 kinase のリン酸化は Western blot 法により検出した。Control:Tap water、Rad001=エベロリムス（20 ng/mL）。

b:p70S6 kinase の VEGF アイソフォーム刺激によるリン酸化作用に対するシロリムスの作用
Unstim:無刺激、Rapa=シロリムス（20 ng/mL）用いた VEGF-A、VEGF-C 及び VEGF-C*（ cysteine156 が serine に置換）の濃度はそれぞれ 50、200 及び 200 ng/mL。

(2) シロリムスの EOMA 細胞増殖抑制における AKT（Ser473）/mTOR/S6 シグナル経路の関与

添付資料番号＜4.2.1.1-3 参＞

シロリムスの抗 EOMA 細胞増殖作用に AKT（Ser473）/mTOR/S6 シグナル経路に対するシロリムスのリン酸化抑制作用が関与しているか否か検討する目的で以下の実験を行った。EOMA 細胞を 48 時間、10 ｎM シロリムスで処理する群、0.1%FBS を含む DMEM Medium で処理する群及び 10%FBS を含む EOMA 細胞で処理する群の 3 群につき AKT（Ser473）/mTOR/S6 シグナル経路に対するリン酸化作用を Western blot 法により検討した。AKT（Ser473）、mTOR、glycogen synthase kinase-3 beta（GSK3β）及び S6 に対する抗体は、それぞれ phospho-AKT（Ser473）、phospho-mTOR、phospho-GSK3β 及び phospho-S6 を使用した。

結果を図 2.6.2-9 に示す。0.1%に比べ 10%FBS を含む EOMA 細胞で処理する群は AKT(Ser473)、mTOR、GSK3β 及び S610 すべてにおいて顕著なリン酸化の亢進が認められたが、AKT（Ser473）、mTOR、GSK3β 及び S6 のリン酸化亢進は 10 nM のシロリムスにより抑制された。

以上の結果から、シロリムスのマウス EOMA 細胞増殖抑制作用には、AKT（Ser473）/mTOR/S6 シグナル経路に対するシロリムスのリン酸化抑制作用が寄与していることが示唆された。

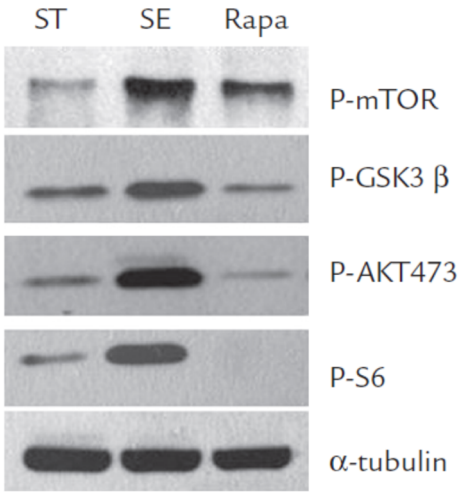


図 2.6.2-9 EOMA 細胞における AKT（Ser473）/mTOR/S6 シグナル経路のリン酸化作用に対するシロリムスの作用

ST: EOMA 細胞を 0.1%FBS 添加 DMEM Medium で処理
SE: EOMA 細胞を 10%FBS 添加 DMEM Medium で処理
Rapa：シロリムス（10 nM）添加 DMEM Medium で処理
mTOR、GSK3β、AKT473 及び S6 のリン酸化は Western blot 法により検出した。

(3) シロリムスの腫瘍細胞内リンパ管新生、血管新生に対する作用並びに VEGF-A 及び VEGF-C の発現量に対する作用

添付資料番号＜4.2.1.1-5 参＞

4 週齢の雄性 BALB/C nu/nu マウスを用いた。5.0×10^6 個の転移性膵臓腫瘍細胞（B13LM 細胞）をマウス左下肢の皮下に投与した。腫瘍細胞投与後 8 日から 20 日まで 1 回/日、シロリムス 1.5 mg/kg 又はその溶媒を腹腔内に投与した。シロリムス投与期間中における皮下腫瘍の体積は毎日計測した。また、シロリムスの最終投与後 24 時間にマウスを屠殺し、腫瘍を摘出してリンパ管数及びリンパ管量を測定した。皮下の腫瘍細胞内リンパ管の評価は LYVE-1 免疫組織化学染色法及び computer-assisted quantitative analysis を用いて行った。in vitro 試験では、B13LM 細胞のリンパ管形成及びリンパへの転移における VEGF-C 及び-A の発現量に対するシロリムスの作用を検討した。VEGF-C 及び VEGF-A の発現量は定量 RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応:Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction）及び Western blot 法を用いて定量した。

シロリムス最終投与後 20 日において、腫瘍の体積は対照群に比べ、シロリムス群では有意に縮小した（図 2.6.2-10a）。シロリムスの腫瘍内のリンパ管数及びリンパ管用量に対してもシロリムス群では対照群に比べ有意に減少していた（図 2.6.2-10b 及び c）。

B13LM 細胞はストレス反応（血清飢餓状態下）より、VEGF-C 及び VEGF-A の発現量は増加したが、シロリムスの添加により濃度依存性（1～100 nM）に VEGF-C 及び VEGF-A の発現量の増加は抑制された（図 2.6.2-11a 及び b）。

以上の結果から、シロリムスは B13LM 細胞の増殖抑制作用及びリンパ管新生抑制作用を有することが示され、これらのシロリムスの抑制作用には VEGF-C 及び VEGF-A の発現量の抑制が関与していると推察される。

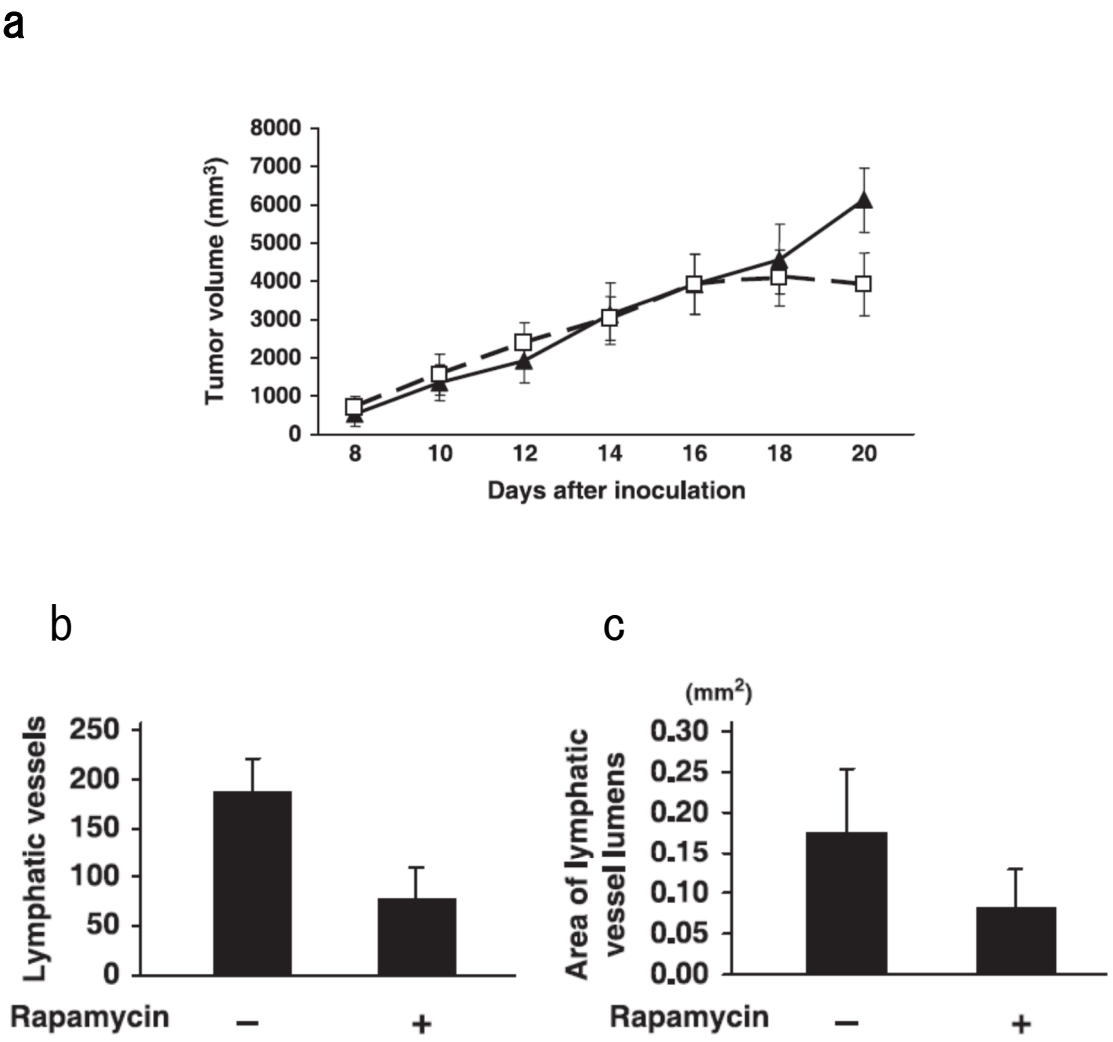


図 2.6.2-10 ヌードマウスの B13LM 細胞増殖作用（a）及び腫瘍内リンパ管数(b)及びリンパ管量(c)に対するシロリムスの作用

a: ヌードマウスに 5.0×10^6 個の B13LM 細胞をマウス左下肢の皮下に投与し、腫瘍細胞投与後 8 日から 20 日まで 1 回/日、シロリムス 1.5 mg/kg 又はその溶媒（DMSO）を腹腔内に投与した。シロリムス投与期間中における皮下腫瘍の体積は毎日計測した。

▲：溶媒群（n=11）、□：シロリムス群（n=10）、Mean±SE

B13LM 細胞投与 20 日において溶媒群とシロリムス群とは有意差あり（$p<0.009$ by Repeated-Measures ANOVA）

b 及び c:図 a で実施した試験においてシロリムスの最終投与後 24 時間にマウスを屠殺し、腫瘍を摘出してリンパ管数（b）及びリンパ管量（c）を測定した。

リンパ管数に対する作用において溶媒群とシロリムス群とは有意差あり（$p<0.001$ by Repeated Measures ANOVA）

リンパ管量に対する作用において溶媒群とシロリムス群とは有意差あり（$p=0.033$ by Repeated-Measures ANOVA）

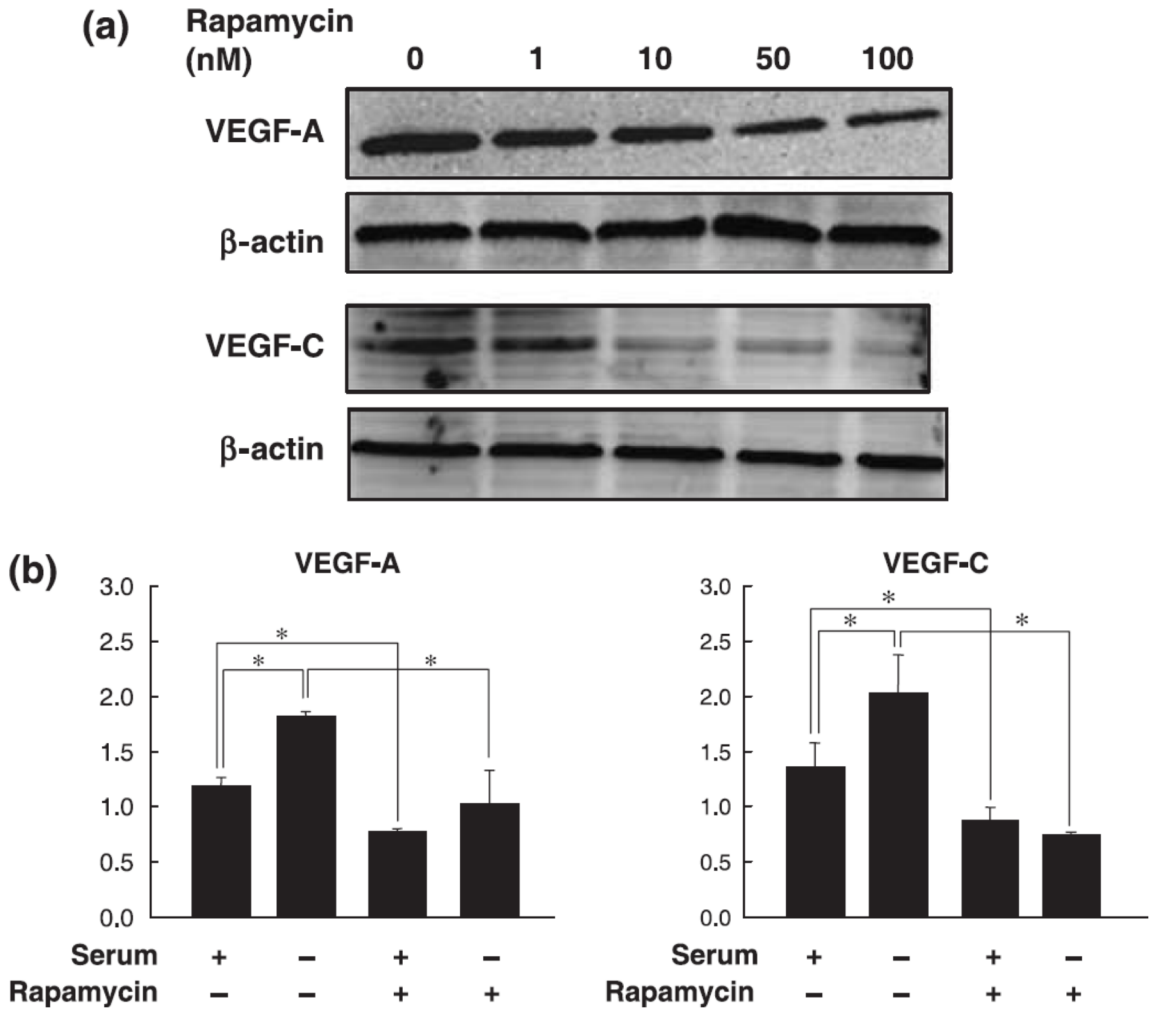


図 2.6.2-11 B13LM 細胞における VEGF-A 及び VEGF-C の発現量に対するシロリムスの作用

a:VEGF-A 及び EGF-C の発現量に対するシロリムスの濃度依存性作用につき検討したときの SDS-PAGE。
実験は 2 回繰り返し、その代表図を示す。
b 及び c: B13LM 細胞は 10%FCS（ウシ胎児血清：Fetal calf serum）を含む（Serum+）又は含まない（Serum-）Dulbecco's modified Eagle's medium 中に 24 時間培養した。この培養液にシロリムス 100 nM 又は媒体を加えたときの VEGF-A（b）又は VEGF-C（c）の mRNA の発現量を RT-PCR にて測定した。*p<0.05(by Student's t-test)、mean±SD

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

本申請の本剤の適応症として考えている難治性リンパ管疾患としては、リンパ管腫（リンパ管奇形）、リンパ管腫症、ゴーハム病、リンパ管拡張症が挙げられる。また本申請の適応症には含まれないが、難治性血管疾患としては、カサバッハ・メリット現象を伴うカポジ型血管内皮腫、房状血管腫、血管奇形などの血管異常症が挙げられる。これらの疾患ではリンパ管あるいは血管を構成する細胞などに腫瘍性の増殖が共通に認められる[1、2、3)]。

難治性脈管腫瘍・脈管奇形（難治性リンパ管疾患及び血管疾患）の治療においては、外科的処置、放射線照射及び薬剤治療が実施されているが、薬剤に関しては、国内外を問わずこれらの疾患に対する適応症を有する治療薬はない。種々の疾患に対応してプロプラノロール、抗癌剤、インターフェロン、ステロイドなどを使用した報告例はあるが効果は限定的である[4、5、6、7、8、9、10)]。

シロリムスのリンパ管及び血管異常に対する効力を裏付ける試験に関し、in vitro 試験では正常ヒトの LECs、リンパ管奇形患者由来の LECs 及びマウス EOMA 細胞を用いた試験、in vivo 試験ではマウスのリンパ管内皮腫、血管内皮腫及び静脈奇形動物モデルを用いて薬理作用を検討した。その結果、in vitro 及び in vivo 試験において、シロリムスはマウス及びヒトのリンパ管及び血管内皮腫の増殖を抑制した。ヒト LECs の遊走もシロリムスにより抑制された。臨床研究においてもリンパ管腫、静脈奇形、カサバッハ・メリット減少を伴うカポジ型血管内皮腫などに対し、シロリムスの有効性を示唆する複数の報告がなされているが[11、12、13、14、15)]、上記薬理試験の結果は臨床試験で認められたシロリムスの有効性を裏付けている結果と考えられる。

これらのことから、シロリムスはリンパ管及び血管を構成する細胞の腫瘍増殖の抑制に有効な治療薬であると考えられる。

脈管腫瘍及び脈管奇形は、病因は明確になっていないものの、PI3K/AKT/mTOR 経路の異常活性により、血管内皮細胞、LECs などの異常増殖を起こすことが原因の一つであると考えられている[16、17)]。そこで PI3K/AKT/mTOR シグナル系に対するシロリムスの作用を検討した。その結果、リンパ管内皮細胞及び EOMA 細胞において PI3K/AKT/mTOR シグナル系のリン酸化亢進作用はシロリムスにより抑制されることが認められた。

また、mTOR シグナルの促進は血管形成やリンパ管形成を制御している VEGF の発現量を増加させるが、VEGF の発現量の増加は腫瘍の増殖や遊走に重要である。今回の B13LM 細胞を用いた試験において、シロリムスは細胞増殖抑制作用を示すとともに、リンパ管における VEGF-A 及び VEGF-C の発現量を抑制した。VEGFR-3 はリンパ管内皮細胞に発現しており、リンパ管形成を促進する働きを有するとの報告[18)] 及び血管腫における血管内皮細胞増殖に VEGFR-2 が関与するとの報告[3)] とを考え併せると、シロリムスによる VEGF 発現量抑制作用はシロリムスのリンパ管及び血管内皮細胞の増殖や転移抑制作用に関与していると推察される。

以上の結果をまとめると、シロリムスは、細胞の分裂や増殖、生存等を調節する mTOR に結合し、その活性化を抑制することにより、細胞増殖抑制とともに抗血管新生作用、抗リンパ管新生作用を示すと推察される。従って、本剤は難治性脈管腫瘍・脈管奇形（難治性リンパ管疾患及び血管疾患）に対する治療薬としての有効性が期待される。

2.6.2.7 参考文献

1 Wassef M, Blei F, Adams D, Alomari A, Baselga E, Berenstein A, Burrows P, Frieden LJ, Garzon MC, Lopez-Gutierrez J-C, Lord DJE, Mitchel S, Powell J, Prendiville J, Vikkula M, on behalf of the ISSVA Board and Scientific Committee. Vascular anomalies classification: recommendations from the International Society for the study of vascular anomalies. Pediatrics 2015;136:e203-e214.
2 Brouillard P, Boon L, Vikkula M, Genetics of lymphatic anomalies. J Clin Invest 2014;124:898-904.
3 Medici D and Olsen BR, Rapamycin inhibits proliferation of hemangioma endothelial cells by reducing HIF-1-dependent expression of VEGF. PLOS One 2012;7:e42913
4 血管腫・血管奇形・リンパ管奇形診療ガイドライン 2017（第 2 版 2017 年 3 月 31 日）
5 Ozeki, M., A. Fujino, K. Matsuoka, S. Nosaka, T. Kuroda, and T. Fukao, Clinical Features and Prognosis of Generalized Lymphatic Anomaly, Kaposiform Lymphangiomatosis, and Gorham-Stout Disease. Pediatr. Blood Cancer. 2016; 63:832-838.
6 Ozeki M and Fukao T, Generalized lymphatic anomaly and Gorham-Stout disease:overview and recent insights. Adv Wound Care (New Rochelle) 2019;8:230-245.
7 Ozeki, M., M. Funato, K. Kanda, M. Ito, T. Teramoto, H. Kaneko, T. Fukao, and N. Kondo, Clinical improvement of diffuse lymphangiomatosis with pegylated interferon alfa-2b therapy: case report and review of the literature. Pediatr. Hematol. Oncol. 2007;24:513-524.
8 de Souza RJSP and Tone LG, Treatment of lymphangioma with alpha-2a-interferon. J Pediatr (Rio J) 2001;77:139-42
9 Hagendoorn J, Yock TI, Rinkes IHMB, Padera TP, Ebb DH, Novel molecular pathways in Gorham disease: Implications for treatment. Pediatr Blood Cancer.2014;61:401-406.
10 Ellati, R., A. Attili, H. Haddad, M. Al-Hussaini, and A. Shehadeh, Novel approach of treating Gorham-Stout disease in the humerus--Case report and review of literature. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 016;20:426-432.
11 Raphael MF, Breur JMPJ, Vlasveld FAE, Elbert NJ, Liem YTB, Kon M, Breugem CC and Pasmans SGMA, Treatment of infantile hemangiomas: therapeutic options in regard to side effects and adverse events - a review of the literature. EXPERT OPINION ON DRUG SAFETY, 2016;15:199-214.
12 Triana, P., M. Dore, V.N. Cerezo, M. Cervantes, A.V. Sanchez, M.M. Ferrero, M.D. Gonzalez, and J.C. Lopez-Gutierrez, Sirolimus in the Treatment of Vascular Anomalies. Eur. J. Pediatr. Surg. 2017:27:86-90.
13 Hammill AM, Wentzel M, Gupta A, Nelson S, Lucky A, Elluru R, Dasgupta R, Azizkhan RG and Adams DM, Sirolimus for the Treatment of Complicated Vascular Anomalies in Children. Pediatr Blood Cancer 2011;57:1018-1024.
14 Adams DM, Trenor III CC, Hammill AM, Vinks AA, Patel MN, Chaudry G, Wentzel MS, Mobberly-Schuman PS, Campbell LM, Brookbank C, Efficacy and safety of sirolimus in the treatment of complicated vascular anomalies. Pediatrics 2016;137:e20153257.
15 Freixo C, Ferreira V, Martins J, Almeida R, Caldeira D, Rosa M, Costa J, and Ferreira, J, Efficacy and safety of sirolimus in the treatment of vascular anomalies: A systematic review. J Vasc Surg 2020;71:318-27.
16 Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. J Pediatr. 2015 Apr;166(4):1048-54.e1-5.
17 Limaye N, Kangas J, Mendola A, et al. Somatic Activating PIK3CA Mutations Cause Venous Malformation. Am J Hum Genet. 2015 Dec 3;97(6):914-21.

18 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C and Alitalo K.(2004)"Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins."Nat.Immunol. 5,74-80. PMID 14634646

目次

略語・略号一覧 2
2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 7
2.6.3.4 安全性薬理試験 7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 7

略語・略号一覧

略語･略号	内容
AKT	プロテインキナーゼ B
HD	正常ヒト皮膚（Human dermal）
EOMA	マウス血管内皮腫
FBS	胎児牛血清
GSK3β	グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ
HDMECs	ヒト皮膚微小血管内皮細胞
HUVEC	ヒト臍帯静脈細胞
LECs	リンパ管内皮細胞
LM	リンパ管奇形（(lymphatic malformation) ＝リンパ管腫とも表現する）
LYVE-1	リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体 1
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質
PI3K	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ
RT-PCR	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応:Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
VEGF	血管内皮細胞成長因子
VM	静脈奇形

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系	動物種／組織	投与方法	実施施設	添付資料番号
効力を裏付ける試験	ヒトリンパ管内皮細胞（LECs）の増殖及び遊走試験並びにマウスリンパ管内皮腫瘍モデルに対するシロリムスの作用試験	ヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMECs）、LECs C57/BL6 及び NMRI nu/nu マウス（8～10 週齢）	in vitro 及び経口投与	2007 年ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン外科学及び病理学研究室	4.2.1.1-1 （参考）
	リンパ管腫患者から樹立したリンパ管腫内皮細胞（LM-LEC）に対するシロリムスの作用試験	リンパ管腫患者の（LM-LEC）及び正常ヒト皮膚リンパ管内皮細胞（HD-LEC）	in vitro	2015 年ハーバード大学医学部ボストン小児病院血管生物学及び外科学研究室など	4.2.1.1-2 （参考）
	マウス血管内皮腫（EOMA）細胞の増殖及び腫瘍面積増大に対するシロリムスの作用試験	マウス EOMA 細胞、 Nu/Nu マウス	in vitro 及び腹腔内投与	2014 年中国医薬大学病態生理学、麻酔学研究室並びに国際教育校	4.2.1.1-3 （参考）
	マウス静脈奇形（VMs）モデルにおけるシロリムスの作用試験	Athymic nu/nu マウス	腹腔内投与	2015 年ハーバード大学医学部ボストン小児病院血管生物学及び外科学研究室、ルーヴァン・カトリック大学ヒト分子遺伝学研究室、オウル大学医化学研究など	4.2.1.1-4 （参考）
	マウス B13LM 細胞の増殖、リンパ管新生、血管新生及び VEGF-A 及び-C の発現に対するシロリムスの作用試験	B13LM 細胞 BALB/C nu/nu マウス	in vitro 及び腹腔内投与	2007 年千葉大学医学部分子病理学及び総合外科学研究室	4.2.1.1-5 （参考）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	添付資料番号
Huber S Kidney Int 2007;71:771-777	Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis.	ヒトの LECs の増殖及び遊走に対するシロリムスの作用及びリンパ管腫瘍形成時及び腫瘍形成後にシロリムスを投与したときのマウスリンパ管腫瘍の増殖抑制作用並びに作用機序を検討する。	HDMECs、LECs C57/BL6 及び NMRI nu/nu マウス ／シロリムス	in vitro 試験：シロリムス（0.1～100 ng/mL）はヒトの LECs の増殖を濃度依存性に有意に抑制し、20 ng/mL シロリムスは LECs の遊走も抑制（$p<0.05$）した。 in vivo 試験：エマルジョン化した不完全 Freund's adjuvant と同時にシロリムス(5 mg/kg/日)を経口投与したとき、横隔膜及び肝臓のリンパ管腫の面積は有意（$p<0.001$）に減少した。さらに、エマルジョン化した不完全 Freund's adjuvant 投与後 28 日目にシロリムスを投与して治療効果を検討したとき、すでに発症したリンパ管腫の面積はシロリムスにより有意（$p=0.028$）に抑制した。 シロリムスの作用機序：VEGF-C、VEGF-C*（システイン 156 がセリンに置換）、VEGF-A による p70S6 kinase のリン酸化亢進作用をシロリムスは抑制した。	4.2.1.1-1 （参考）
Boscolo E Angiogenesis 2015;18:151-162	AKT hyper-phosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation	リンパ管腫患者から手術で切除した検体より樹立した LM-LECs（PI3K 遺伝子変異を有する）と HD-LECs の細胞増殖に対するシロリムスの作用を検討する。	LM-LECs、HD-LECs ／シロリムス、 LY-294、 Wortmannin	実験ではリンパ管腫患者から手術で切除した検体より樹立した HM-LECs 株（PI3K 遺伝子変異）と HD-LECs 株の細胞増殖に対するシロリムスの作用を検討した。LM-LECs と HD-LECs にシロリムス（1 及び 10 nM）を添加後 48 時間に細胞増殖を比較したとき、シロリムスは HD-LECs の増殖に影響を与えなかったが、LM-LECs の増殖はシロリムスにより有意に抑制された（$p<0.01$）。LY-294 及び Wortmannin は LM-LECs 及び HD-LECs の増殖を有意に抑制した（$p<0.01$）。	4.2.1.1-2 （参考）
Zheng N Curr Ther Res 2014;76:99-103	Low concentration of rapamycin inhibits hemangioma endothelial cell	マウス血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）の増殖に対するシロリムスの作用並びに作用機序を検討する。	マウス EOMA 細胞、 Nu/Nu マウス ／シロリムス	in vitro 試験：シロリムスはマウス EOMA 細胞の増殖を濃度依存性に抑制した（$p<0.05$）。 in vivo 試験：4～6 週齢の雌性 Nu/Nu マウスを用いた。マウス側腹部に EOMA 細胞（マウス	4.2.1.1-3 （参考）

	proliferation, migration, and vascular tumor formation in mice.			に 2×10^5 個/site の細胞を 2 sites に）を皮下内投与（0 日）し、12 日間腫瘍の体積を観察した。腫瘍投与後 2、4、6、8、10 及び 12 日に腫瘍面積を計測した。シロリムスは 0.5、1、1.5 及び 2 mg/kg を 12 日間毎日腹腔内に投与した。対照群には生理食塩液を投与した。各群 5 匹のマウスを用いた。シロリムスは 0.5 mg/kg の低用量から投与後 6～12 日にかけて EOMA 細胞の増殖を有意（$p<0.05$）に抑制した。しかし、最高用量の 2 mg/kg を投与されたマウスは死亡した。 シロリムスの作用機序:0.1%FBS(胎児牛血清)単独に比べ 10%FBS を含む EOMA 細胞で処理する群は AKT（Ser473）、mTOR、GSK3β（グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ）及び S6 すべてにおいて顕著なリン酸化促進が認められたが、AKT（Ser473）、mTOR、GSK3β 及び S6 のリン酸化亢進は 10 nM のシロリムスにより抑制された。	
Boscolo E J Clin Invest 2015;125:3491-3504	Rapamycin improves TIE2-mutated venous malformation in murine model and human subjects.	マウス VM モデルにおける腫瘍細胞増殖に対するシロリムスの作用を検討する。	雄性 Athymic nu/nu マウス／シロリムス	VM を有する患者のほとんどに tyrosine kinase 受容体の突然変異体 TIE2 L914F が報告されている。そこで、この突然変異体を発現させた静脈血管奇形マウス(6～7 週齢の雄性 athymic nu/nu マウス)モデルを作製し、本薬の静脈奇形に対する作用を検討した。ヒト臍帯静脈細胞（HUVEC）に TIE2 の遺伝子変異 TIE2-L914F を導入して発現させたレトロウイルスを用いて HUVEC-TIE2-L914F 腫瘍細胞をマウスに移植し 12 日間放置した。移植後 13 日から 18 日までシロリムス 2 mg/kg を腹腔内に投与したとき、シロリムスは投与後 5 日から最終投与の 7 日にかけて HUVEC TIE2 L914F 腫瘍病変部の面積を有意（$p<0.01$）に抑制した。シロリムス投与後 7 日における腫瘍内血管容量は、対照群に比べ、シロリムス群は腫瘍内血管容量を有意（$p<0.01$）に抑制した。また、シロリムスの投与期間を 20 日間に延長したとき、対照	4.2.1.1-4 （参考）

				群では腫瘍面のさらなる増加がみられたが、シロリムス投与群の腫瘍面積は増加せず抑制された（$p<0.01$）。	
Kobayashi S Cancer Sci 2007;98:726-733	Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis.	マウス腫瘍細胞内リンパ管新生、血管新生に対する作用並びに腫瘍縮小作用の機序としてVEGF-A及びVEGF-Cの発現量に対するシロリムスの作用を検討する。	B13LM細胞 雄性BALB/C nu/nuマウス ／シロリムス	in vivo試験：4週齢の雄性BALB/C nu/nuマウスを用いた。5.0×10^{6}個の転移性膵臓腫瘍細胞（B13LM細胞）をマウス左下肢の皮下に投与した。腫瘍細胞投与後 8日から1回／日シロリムス 1.5 mg/kg 又はその溶媒を腹腔内に投与した。シロリムス投与期間中における皮下腫瘍の体積を毎日計測した。また、シロリムス又は溶媒投与後3週においてマウスを屠殺し、腫瘍を摘出してリンパ管数及びリンパ管量を測定した。皮下の腫瘍細胞内リンパ管の評価はLYVE-1 免疫組織化学染色法及び computer assisted quantitative analysis法を用いて行った。 作用機序試験：B13LM細胞のリンパ管形成及びリンパへの転移におけるVEGF-C及び-Aの関与につき、これらの発現量に対するシロリムスの作用を検討した。VEGF-C及び-Aの発現量は定量 RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応:Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction）及びWestern blot法を用いて定量した。シロリムス最終投与後20日において、腫瘍の体積は対照群に比べ、シロリムス群で有意に縮小した（$p=0.009$）。腫瘍細胞のリンパ管数及びリンパ管容量に対してもシロリムス群では対照群に比べ有意に減少していた（それぞれ$p<0.001$及び$p=0.033$）。B13LM細胞はストレス反応（血清飢餓状態下）に対し、VEGF-C及び-A の発現量の増加が認められたが、シロリムスの添加により濃度依存性（1～100 nM）にVEGF-C 及び-A の発現量の増加は抑制された（$p<0.05$）。	4.2.1.1-5 （参考）

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する試験を実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

該当する試験を実施していない。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験を実施していない。