

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）

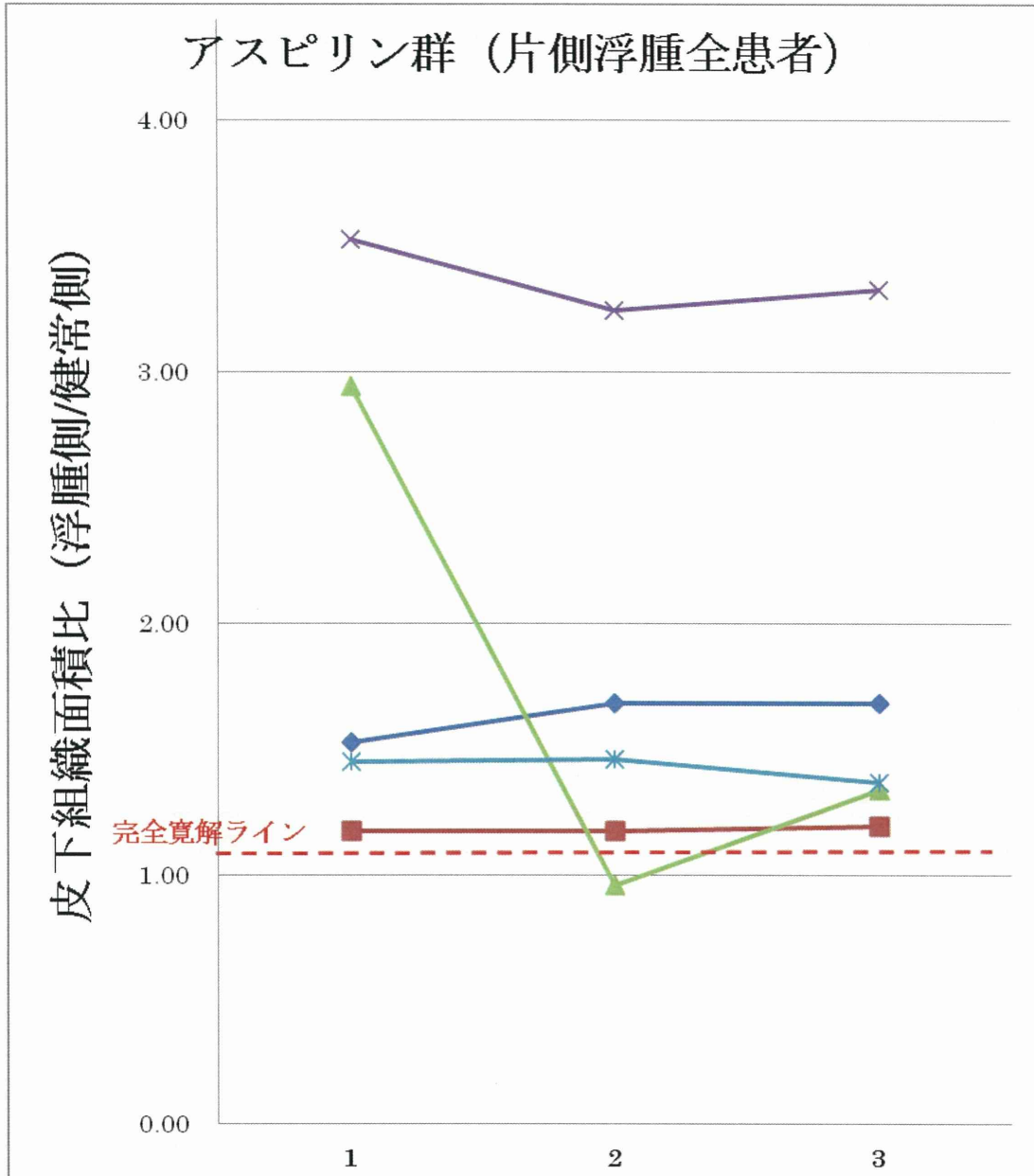
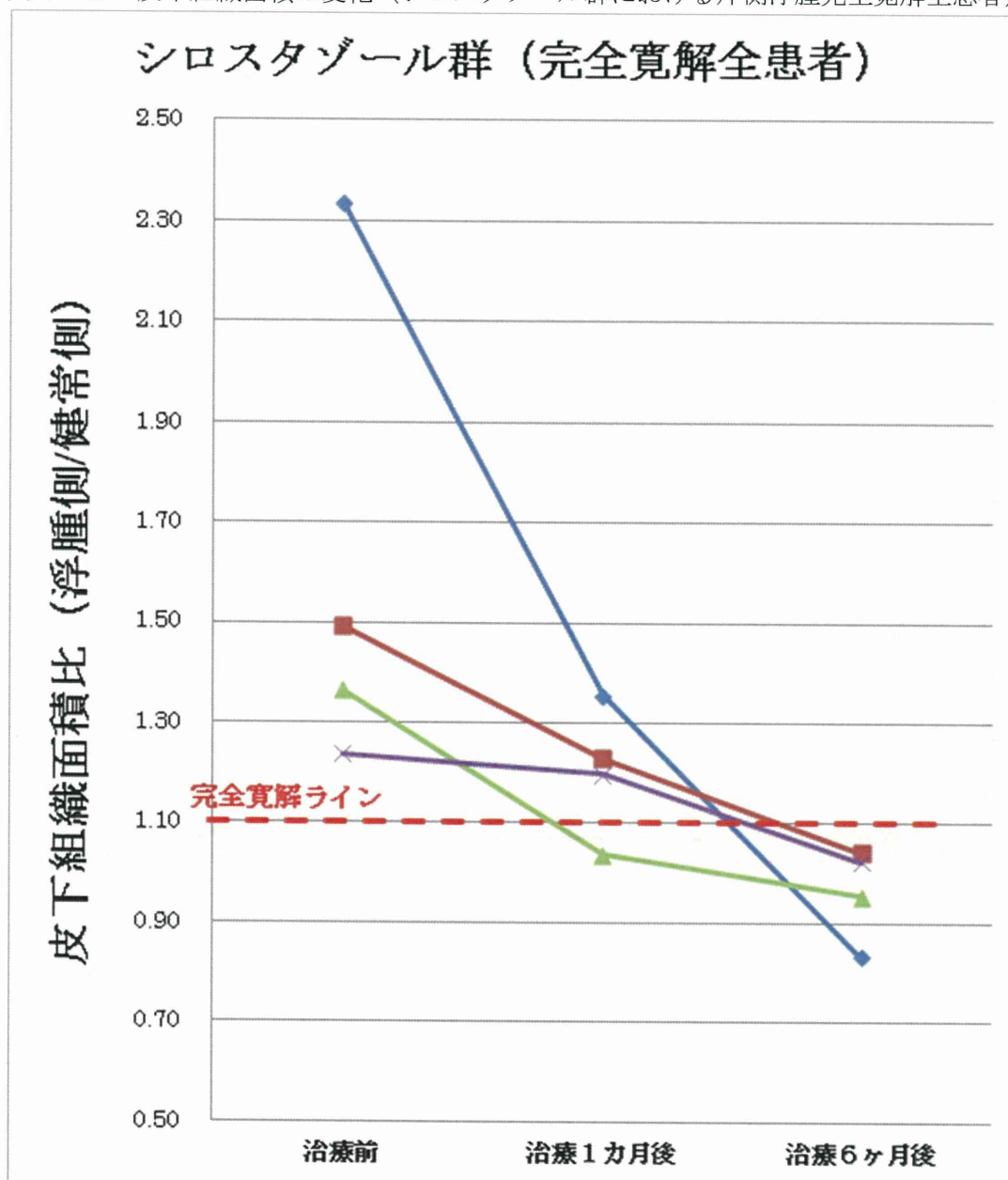


図1-3 皮下組織面積の変化（シロスタゾール群における片側浮腫完全寛解全患者）



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

「リンパ浮腫治療へのbreakthroughを目指して」に関する研究

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

研究要旨

[背景・目的] Cilostazolは抗血小板作用、血管拡張作用を有する薬剤として知られているが、リンパ管に対する作用はこれまでに報告がない。我々の予備的臨床データによるとリンパ浮腫患者に投与した場合一定の効果がみられたことからリンパ管内皮細胞において薬理作用を有することが推定された。従ってCilostazolのリンパ管新生およびリンパ浮腫の病態改善に対する効果を明らかにする目的で研究を行った。 [方法] ヒトリンパ管内皮の培養細胞をCilostazol存在下で培養し、細胞増殖および遊走能に対する影響を検討した。またprotein kinase A inhibitorの追加により増殖促進効果に変化がみられるか検討した。さらにリンパ流障害をもつトランスジェニックマウスに対しCilostazol含有飼料を投与し、生存率をみるとともにリンパ管の免疫染色を行い、リンパ管輸送能の評価を行った。野生型マウスの尾のリンパ浮腫モデルを作成し、Cilostazol飼料を投与して浮腫の経時的な変化を評価した。 [結果] リンパ管内皮細胞において、Cilostazol添加により濃度依存的な細胞増殖効果がみられ、高濃度では細胞遊走能がやや促進されていた。またCilostazol飼料を与えたトランスジェニックマウスでは死亡数が減少する傾向が認められた。また皮膚のリンパ管の増加、リンパ管輸送の改善がみられた。更に尾のリンパ浮腫モデルマウスではCilostazol飼料を投与した群で浮腫の程度が軽減する傾向がみられ、免疫染色でリンパ管の拡張がみられなくなった。 [結論] cilostazolはin vitroでリンパ管内皮細胞の増殖促進および遊走促進作用を有しており、in vivoでリンパ管の増加とリンパ管輸送の改善が認められた。Cilostazolはリンパ浮腫治療の選択肢になりうると考えられる。

A. 研究目的

Cilostazol は phosphodiesterase type III (PDE3) を選択的に阻害することにより抗血小板作用、血管拡張作用を発揮すると考えられており、慢性動脈閉塞症の治療や脳梗塞の再発予防に使用されている (1)。In vitro あるいは in vivo の実験により、血小板に対しては凝集抑制作用、血管平滑筋に対しては弛緩作用および増殖抑制作用を有することが報告されている (1, 2)。また血管内皮細胞の傷害に対し防御作用をもつという報告もある (1)。しかしこれまでにリンパ管にどのような影響を及ぼすかについては明

らかにされていない。

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

B. 研究方法

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 cilostazol (Wako) を最終濃度 $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, または $30 \mu\text{M}$ となるように添加した。また cilostazol のコントロールとして抗血小板薬の acetylsalicylic acid (ASA, Sigma) を $300 \mu\text{M}$ となるように添加した群、cilostazol の溶解液として用いた dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) のみ添加した群でも同様の培地条件で培養し、薬剤添加後 1、3、5、7、9 日目に細胞の計数を行った。細胞数の計測は、培養細胞に 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma) を1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 加え、 37°C で 2 分間インキュベートして細胞を剥離し、phosphate buffered saline (PBS) に懸濁し、Coulter Counter Z2 (BECKMAN COULTER) を用いて行った。

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

細胞の遊走能

上記の成人由来の正常ヒトリンパ管内皮細胞を、 10cm の dish に播種し、ほぼコンフルエントになるまで培養した。培地としては上記の微小血管内皮細胞培養キットから VEGF を除去したものをを用いた。 9mm 幅のセルスクレイパーで細胞を直線状に剥がし、同時に cilostazol を 1 , 10 , $30 \mu\text{M}$ となるように添加した。コントロールとして cilostazol の溶媒である DMSO のみを添加したものを

用いた。48 時間培養した後、細胞を顕微鏡で観察し、残った細胞シート間の距離を測定し、移動距離を算出した。

cilostazol 投与中の kCYC^{+/-}トランスジェニックマウスの生存率

カボジ肉腫において発現している、カボジ肉腫関連ヘルペスウイルスの遺伝子である k-cyclin を導入した kCYC^{+/-} トランスジェニックマウス (Tg) では全身のリンパ管の走行異常がみられ、寿命が短くなることが報告されている (4)。このリンパ流障害マウスに対して、0.1% cilostazol を含有する飼料あるいはコントロール飼料（いずれもオリエンタル酵母）を投与し、生存率を計測した。マウスはいずれも生後 4-5 週齢のものを用いた。

トランスジェニックマウス皮膚の免疫染色

0.1% cilostazol 含有飼料を投与した kCYC^{+/-} トランスジェニックマウスから耳介と背部の皮膚を採取した。3.5%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋を行った。リンパ管内皮細胞のマーカーである podoplanin (LifeSpan Biosciences) と血管内皮細胞のマーカーである CD31(BD)の抗体で二重染色を行った。

トランスジェニックマウスのリンパ管輸送能

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

マウス尾のリンパ浮腫モデル

FVB/N の野生型マウスに対し、sevoflurane による全身麻酔下で、メスを用いて尾の基部の皮膚を 5mm 幅で全周性に剥離した。皮

膚の剥離により皮膚のリンパ管が障害され、剥離部より遠位側に浮腫を生じることが報告されている (5)。これを術後リンパ浮腫のモデルとして、手術同日より cilostazol 含有飼料または非含有飼料の投与を行った。浮腫を生じた尾を経時的に写真撮影し、最大径の推移を測定した。

尾のリンパ管の免疫染色

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

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

C. 研究結果

細胞の増殖能

成人由来のヒトリンパ管内皮細胞を播種した翌日に cilostazol または ASA を培地に添加し、その翌日を day1 として細胞数を計測した。VEGF を除去し、cilostazol または ASA を添加した培地で細胞培養を行い、経時的に細胞数を計測した。それぞれの群で薬剤添加後 1 日 (day1) の細胞数を 1 として細胞数の平均値を用いてグラフを作製した (Fig.1)。cilostazol 30 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 cilostazol 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 ($P < 0.05$)。cilostazol 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 cilostazol 投与により若干の細胞数の増加がみられた。また VEGF のみ含む培地でも同様に cilostazol の濃度により細胞数は若干増加した。VEGF・FGF いずれも除去した培地ではほとんど細胞の増殖がみられなかった。

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

growth of lymphatic endothelial cell

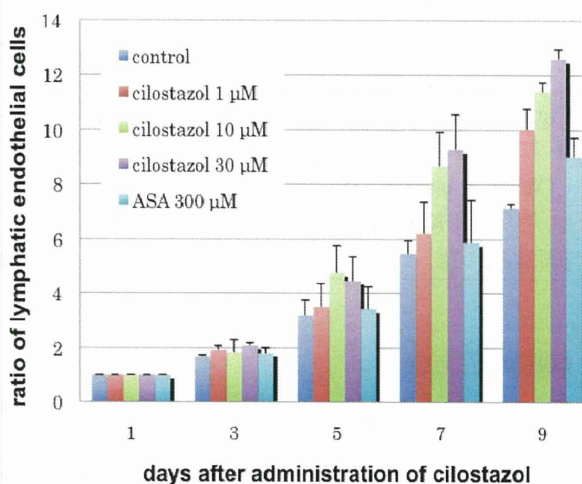


Fig.1 リンパ管内皮細胞の cilostazol 投与後の経時変化。cilostazol の濃度が 1 μ M、10 μ M、30 μ M と増すにつれて細胞数の増加がみられた。

次に細胞増殖試薬である WST-1 を用いてリンパ管内皮細胞の増殖を評価した。また cilostazol は cAMP の増加を介して protein kinase A (PKA) を活性化することで薬理作用を発揮することが知られている。そこで PKA 阻害薬が cilostazol の細胞増殖効果に影響を与えるかも併せて評価した (Fig.2)。

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

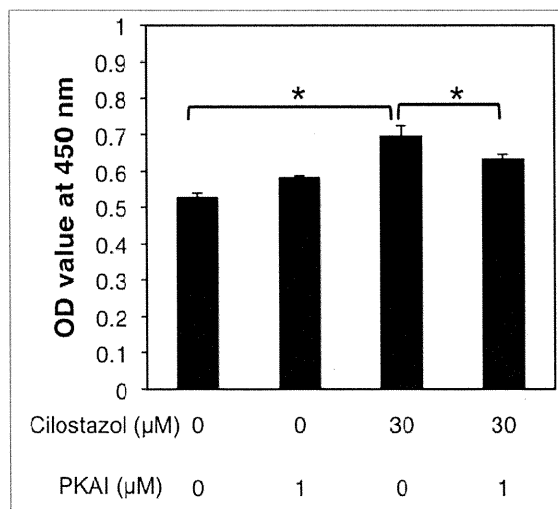


Fig.2 cilostazol または PKA 阻害薬の存在下におけるリンパ管内皮細胞の増殖能 (WST-1 assay)。30 μ M で細胞の増加がみられたが、PKA inhibitor の投与により増加は抑制された。

細胞の遊走能

培養リンパ管内皮細胞をセルスクレイパーで剥がした後、cilostazol の存在下で 72 時間培養し、細胞の移動距離を計測して遊走能を評価した (Fig.3)。cilostazol 1, 10 μ M ではコントロールと比較して有意差はみられなかったが、30 μ M では細胞の移動距離が有意に長かった ($P < 0.03$)。このことから高濃度の cilostazol はリンパ管内皮細胞の遊走を促進する可能性が示唆された。

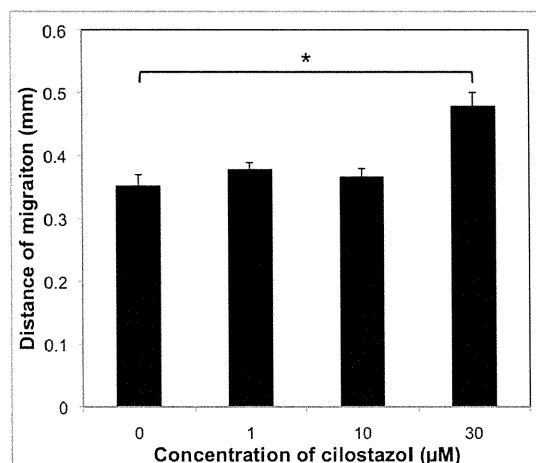


Fig.3 cilostazol 存在下におけるリンパ管内皮細胞の遊走能。30 μ M において遊走が促進された。

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

4 ~ 5 週齢のトランスジェニック (Tg) マウスに対して cilostazol 含有または非含有飼料を投与し (それぞれ 21 匹ずつ)、経時的な生存率を Fig.4 に示した。実験用飼料を投与開始後、cilostazol 非投与群の Tg マウスでは 2 週、6 週でそれぞれ 2 匹死亡がみられたが、cilostazol 投与群では 10 週の段階で 1 匹の死亡が確認された。統計学的な差は得られなかったものの、cilostazol 投与が生存率の改善に寄与することが示唆された。なお野生型マウスでは観察期間中に死亡したものはなかった。

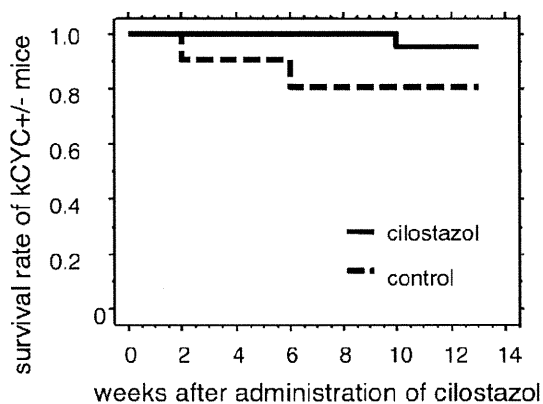


Fig.4 kCYC+/- トランスジェニックマウスの生存率。Cilostazol 投与群において生存率の改善がわずかにみられた。

kCYC+/-マウスにおけるリンパ管新生

Cilostazol を投与したマウスより耳の皮膚を採取し、抗 podoplanin 抗体と抗 CD31 抗体で蛍光二重染色を行った (Fig.5)。コントロールとして cilostazol 非投与群の同腹マウスを用いた。Cilostazol 非投与群では少数の拡張したリンパ管が観察された。これに対して cilostazol 投与群では拡張したリンパ管の近傍に細いリンパ管が多数見出された。これらの観察結果から Cilostazol によりリンパ管新生が促進されたことが示唆された。

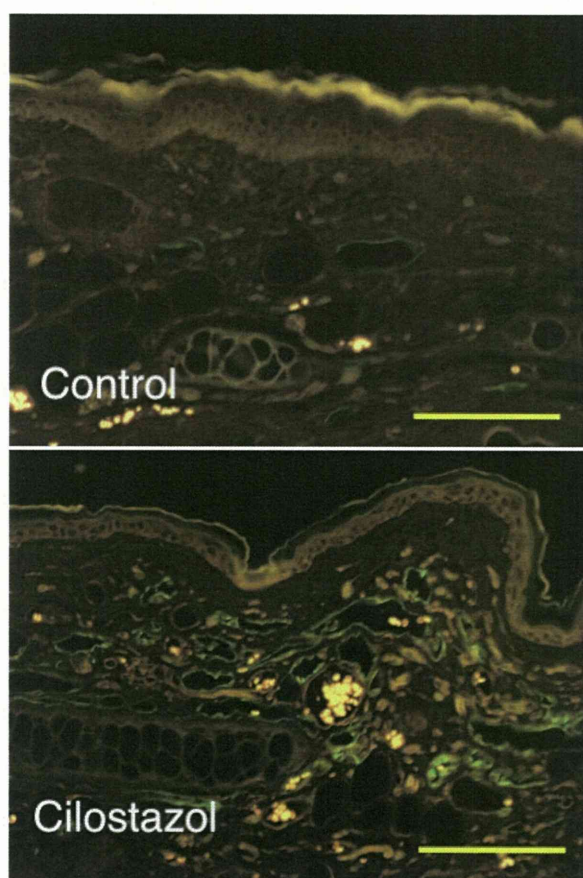


Fig.5 マウス耳の皮膚に対して抗 podoplanin 抗体 (緑)、抗 CD31 抗体 (橙) で免疫染色を行った。Cilostazol 群において、拡張したリンパ管の近傍に細いリンパ管が多数観察された。Bar は 100 μ m。

kCYC マウスにおけるリンパ管輸送

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

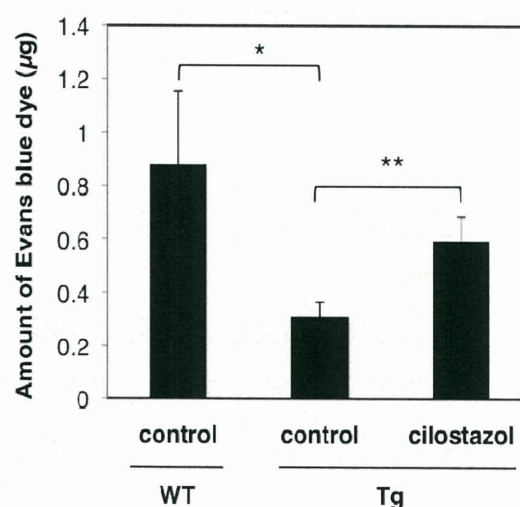


Fig.6 膝窩リンパ節に流入した Evans blue の定量。WT と比較して Tg マウスでは移行する色素の量が低下していた。Tg の Cilostazol 投与群では非投与群と比較して色素量の増加がみられた。

マウス尾におけるリンパ浮腫モデル

マウスの尾の皮膚を全周性に剥離することで術後リンパ浮腫モデルを作成した。手術した部位より遠位の皮膚に浮腫が生じ、10 日くらいでピークとなった。術後 9 日目の代表的な写真を Fig.7 に示した。

cilostazol 投与群 5 匹と非投与群 9 匹について、腫脹した尾の直径を経時的に計測した (Fig.8)。各群の直径の平均を算出してグラフを作成し、標準誤差をエラーバーで示した。統計学的な有意差は得られ

なかったものの、cilostazol 投与群では非投与群と比較して尾の直径が減少し、浮腫が軽減する傾向がみられた。また浮腫が最大値を呈するまでの期間が、cilostazol 非投与群では 7 日間であるのに対して投与群では 9 日間と、投与群の方が浮腫が進行する期間が長い傾向がみられた。

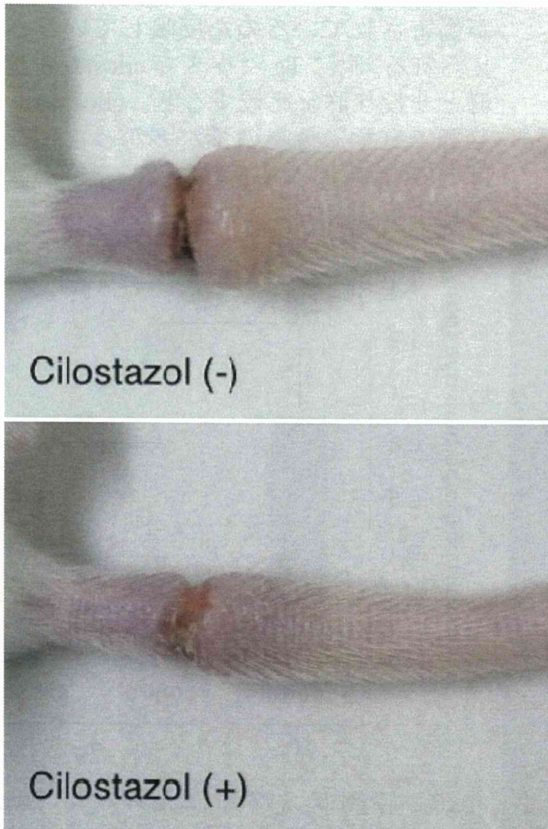


Fig.7 マウス尾のリンパ浮腫モデル。尾の皮膚を一定幅で全周性に剥離し、手術後 9 日目の写真を示した。

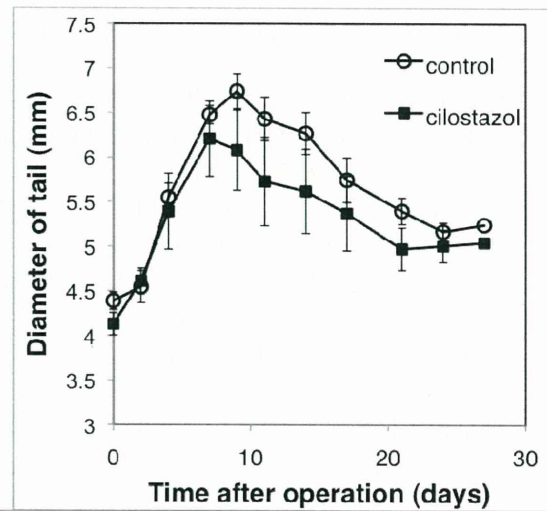
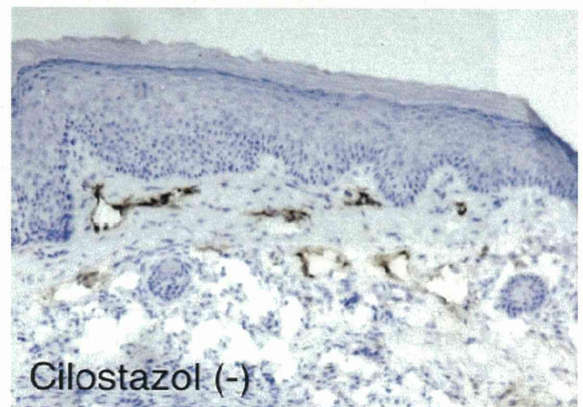


Fig.8 マウスの尾の直径の経時的変化。Cilostazol 投与群において尾の直径が減少する傾向がみられた。

尾のリンパ浮腫におけるリンパ管拡張

尾のリンパ浮腫モデルを作成後に cilostazol を投与したマウスより、尾の皮膚を採取した。抗 LYVE-1 抗体で染色した (Fig.9)。cilostazol 非投与群では真皮のリンパ管は拡張していた。これは尾のモデルにおいてリンパ管の機能障害によってリンパ浮腫をきたしている状態として矛盾しないと考えられた。一方、cilostazol 投与群においてはリンパ管の拡張はみられなかった。



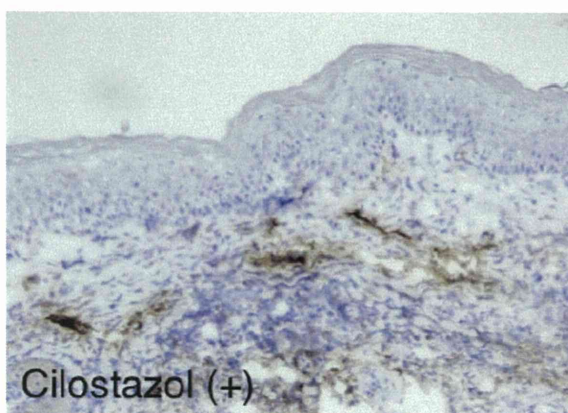


Fig.9 尾の皮膚に対して抗 LYVE-1 抗体で免疫染色を施行した。Cilostazol 非投与群においてリンパ管の拡張がみられたが、投与群では拡張がみられなかった。

D. 考察

ヒトリンパ管内皮細胞の増殖能についての培養条件の検討より、VEGF の存在下では cilostazol の効果は限定的である一方、VEGF を除いた培地では cilostazol による有意な増殖促進効果が確認された。VEGF はリンパ管内皮細胞に発現した VEGFR3 を介して細胞の増殖に寄与することが知られている。本研究において VEGF の存在下で cilostazol の効果が限定的であったのは、VEGF の細胞増殖効果と比較して cilostazol の効果が相対的に小さいためであったと推察される。また VEGF、FGF を除いた培地で培養したところ、cilostazol の濃度非依存的な細胞の増殖はみられず細胞は 1 週間以内に死滅した。このことから FGF、VEGF のうち少なくとも一方は細胞の増殖・生存に必要であり、cilostazol はこれらの増殖因子を代替することはできないが、これらの増殖因子の存在下で相加的に細胞増殖に寄与するものと考えられる。また細胞の遊走能が cilostazol の存在下で促進されることが示された。細胞増殖と併せて *in vitro* で cilostazol はリンパ管新生の促進に寄与することが示唆された。また Cilostazol は phosphodiesterase の阻害薬であり、薬理作用は protein kinase A の活性化を介して様々な薬理作用を有することが知られている。本研究においては PKA 阻害薬を添加することで cilostazol の増殖促進効果は部分的に阻

害される傾向がみられた。完全に阻害されないのが阻害薬の濃度や機能によるものであるのか、あるいは他の経路も増殖に関与しているのかについてはさらなる研究が必要と考えられる。

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

一方、トランスジェニックマウスは遺伝的（先天的）な要因によりリンパ管異常を生じていることから、術後のリンパ浮腫をより反映したモデルとして野生型マウスの尾のリンパ浮腫モデルを用いた。この実験系では 1～2 週間で浮腫のピークに達したのち、徐々に浮腫が改善する。cilostazol 投与群のマウスではピーク時の尾の腫脹が軽度であったほか、腫脹が改善に転じるまでの期間がやや短いことが観察された。また尾の皮膚に免疫染色を行ったところ cilostazol 投与群においてはリンパ管の拡張が軽減されている像が観察され、リンパ浮腫が改善していることが示唆された。

E. 結論

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

《参考文献》

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

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

平成23年度 総括・分担研究報告書
発行 平成24年3月

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

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

