

B

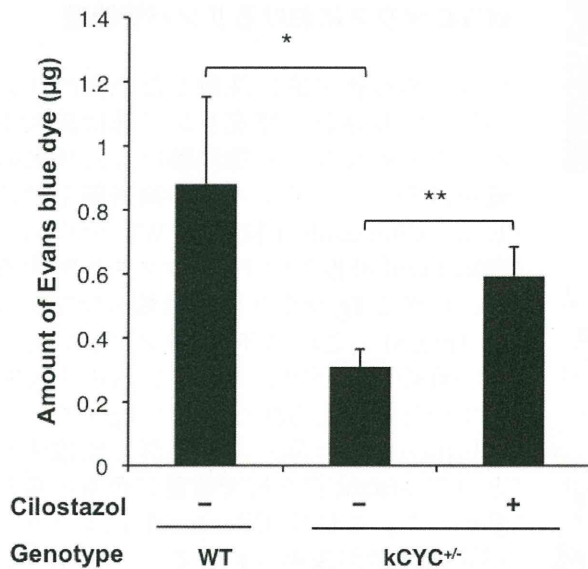


Fig.8 A Cilostazol 飼料投与マウスに対して色素を注射し、10 分後の膝窩リンパ節の外観を示す。Cilostazol 投与群のマウスでは非投与群よりも濃くリンパ管が濃く染まるのが観察された。B 膝窩リンパ節に流入した Evans blue を定量した。WT と比較して Tg マウスでは移行する色素の量が低下していた。Tg の Cilostazol 投与群では非投与群と比較して色素量の増加がみられた。

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.10)。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。Cilostazol 投与群では非投与群と比較して尾の直径が有意に減少し、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のが、Cilostazol 非投与群では 9 日間であるのに対して投与群では 7 日間と、投与群の方が浮腫が早期に peak out する傾向がみられた。



Fig.9 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。

### 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.9 に示した。

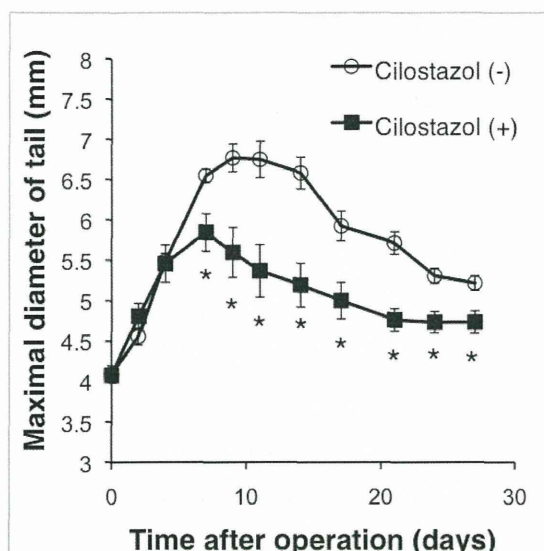


Fig.10 マウスの尾の直径の経時的変化。Cilostazol 投与群において尾の直径が減少する傾向がみられた。

#### 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.10)。Cilostazol 非投与群では真皮のリンパ管は拡張していた。これは尾のモデルにおいてリンパ管の機能障害によってリンパ浮腫をきたしている状態として矛盾しないと考えられた。一方、Cilostazol 投与群においてはリンパ管の拡張はみられなかった。

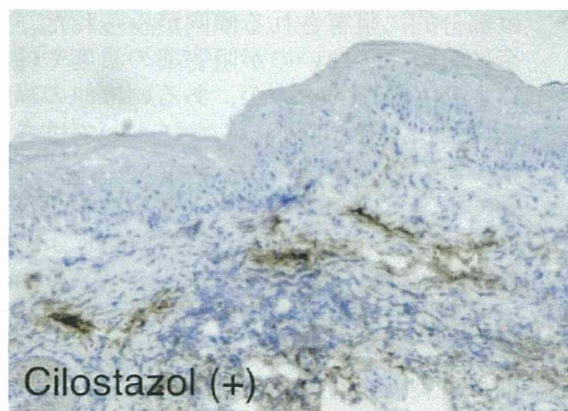
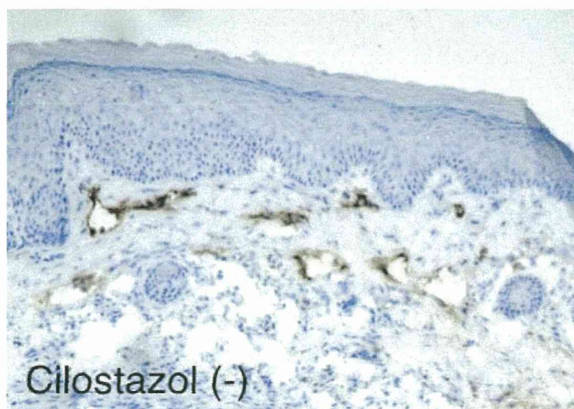


Fig.11 尾の皮膚に対して抗 LYVE-1 抗体で免疫染色を施行した。Cilostazol 非投与群においてリンパ管の拡張がみられたが、投与群では拡張がみられなかった。

#### 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対的に細胞増殖に寄与するものと考えられる。また細胞の遊走能が Cilostazol の存在下で促進されることが示された。細胞増殖と併せて in vitro で Cilostazol はリンパ管新生の促進に寄与することが示唆された。また Cilostazol は phosphodiesterase の阻害薬であり、薬理作用は protein kinase A の活性化を介して様々な薬理作用を有することが知られている。本研究においては PKA 阻害薬を添加することで Cilostazol の増殖促進効果

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

kCYC<sup>+/+</sup>マウスでは全身のリンパ管の障害のためリンパ浮腫および胸水貯留により短命となることが知られている。Cilostazol投与群において生存率の若干の改善傾向がみられた。このマウスにCilostazolを投与して免疫染色を行ったところリンパ管の増加がみられ、電子顕微鏡ではリンパ管内皮細胞の異常が減少するのが観察された。また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がリンパ管の増加および内皮細胞の安定化が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 II

平成24年度 総括・分担研究報告書  
発行 平成25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 II  
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)

