

Fig.3 Cilostazol または PKA 阻害薬の存在下におけるリンパ管内皮細胞の増殖能 (WST-1 assay)。30μM 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.4)。Cilostazol 1, 10μM 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、30μM 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。

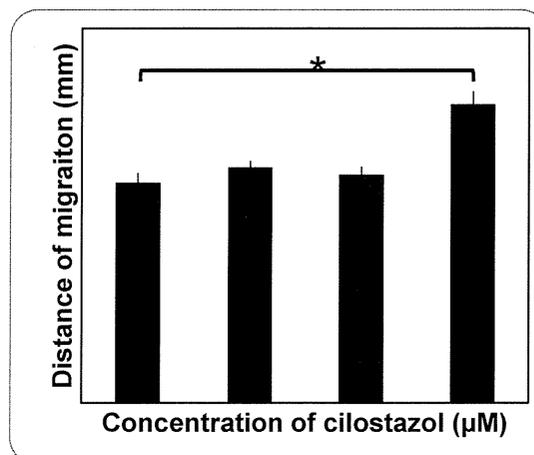


Fig.4 Cilostazol 存在下におけるリンパ管内皮細胞の遊走能。30μM において遊走が促進された。

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.5 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。

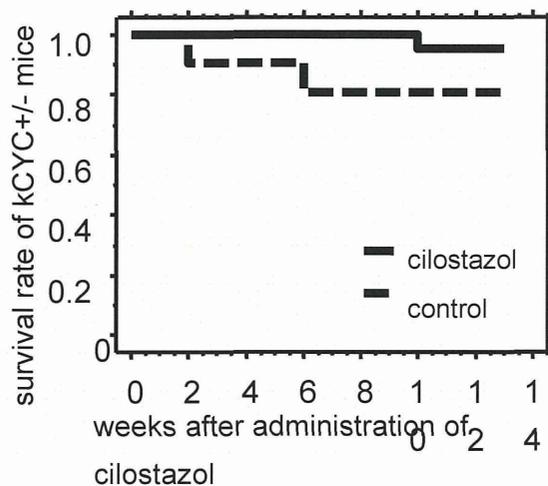


Fig.5 kCYC^{+/-} トランスジェニックマウスの生存率。Cilostazol 投与群において生存率の改善がわずかにみられた。

Cilostazol および Milrinone 投与中の kCYC^{+/-} トランスジェニックマウスの体重変化

4週齢のトランスジェニック (Tg) マウスに対して Cilostazol および Milrinone 含有または非含有飼料を投与し (それぞれ 21 匹ずつ)、経時的な体重変化を Fig.6 に示した。統計学的な差は得られなかったものの、実験用飼料を投与開始後、Cilostazol 投与群は非投与群の Tg マウスに比べて4週から12週までに体重増加率が高く、Cilostazol 投与が体重軽減の改善に寄与することが示唆された。一方、Milrinone 投与による体重増加率の顕著な上昇は認められなかった。

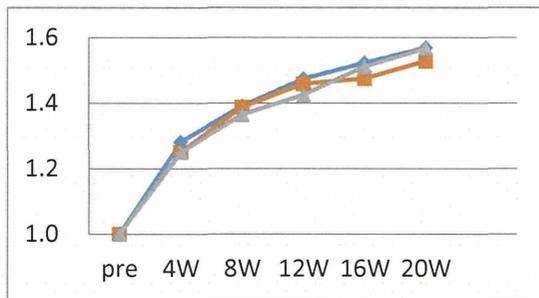
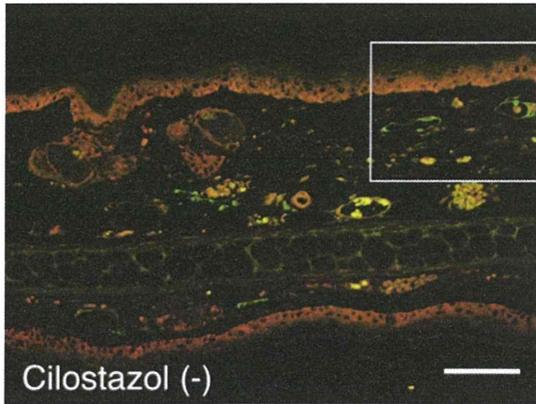


Fig.6 kCYC^{+/-} トランスジェニックマウスの体重増加率。Cilostazol 投与群において体重増加率の改善がわずかにみられた。

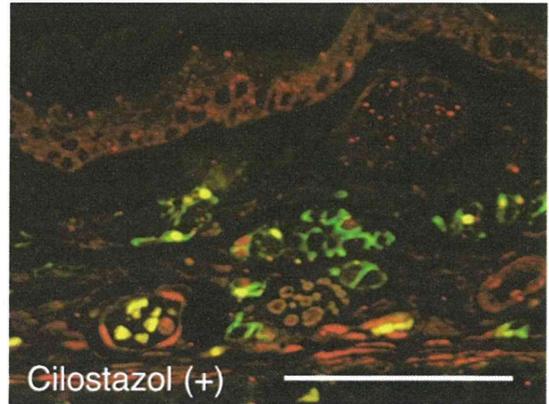
kCYC^{+/-} マウスにおけるリンパ管新生

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.7)。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。標本全体でリンパ管の数をカウントしたところ、Cilostazol 投与群でより多くのリンパ管が観察された。これらより Cilostazol によりリンパ管新生が促進されたことが示唆された。

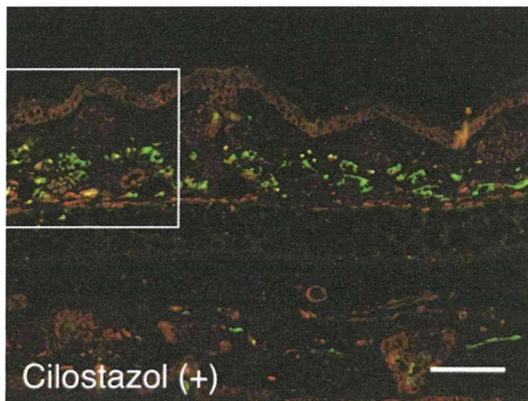
A



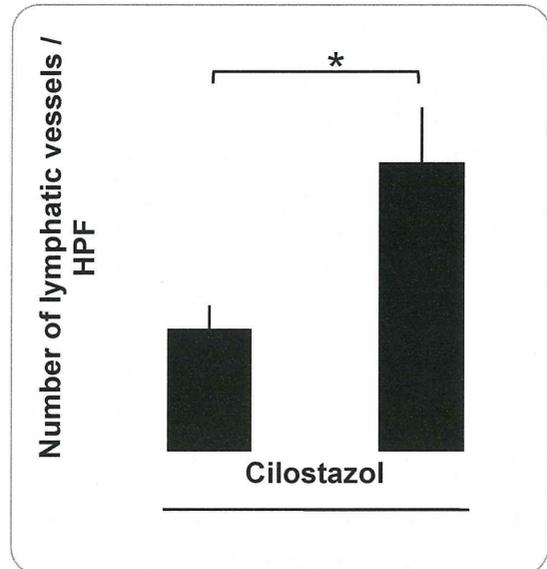
D



B



E



C

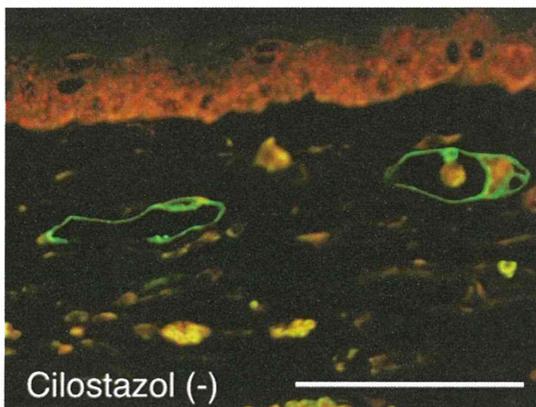
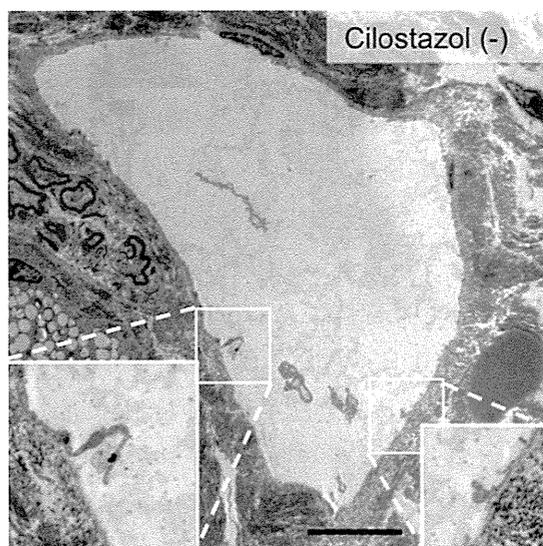


Fig.7 A, B マウス耳の皮膚に対して抗 podoplanin 抗体 (緑)、抗 CD31 抗体 (赤) で蛍光染色を行った。C, D はそれぞれ A, B の拡大像。Cilostazol 群において、拡張したリンパ管の近傍に細いリンパ管がみられた。Bar は 100 μ m。E リンパ管を顕微鏡下にカウントしたところ Cilostazol 群において多数のリンパ管が観察された。

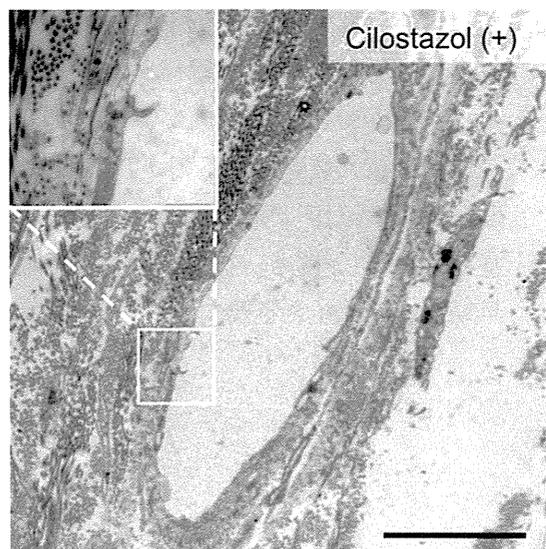
同様に採取したマウス耳の皮膚を電子顕微鏡で観察した。単層の内皮細胞に裏打ちされた管腔構造を呈するリンパ管を同

定した (Fig.8)。Cilostazol 非投与群において、リンパ管内皮細胞が基底膜から剥離しているのが観察された。それに対して投与群では同様の所見はあまりみられなかった。同定されたリンパ管のうち内皮の剥離が観察されたものは、Cilostazol 投与群では有意に少なかった。このことから Cilostazol がリンパ管内皮細胞の接着の安定化に関わる可能性が示唆された。

A



B



C



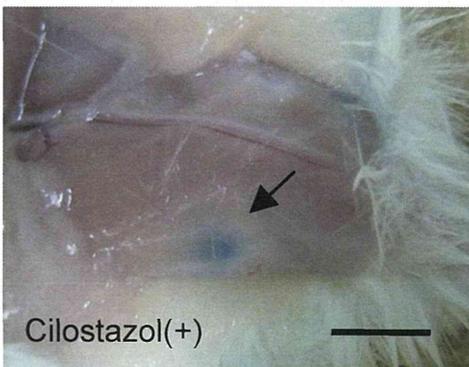
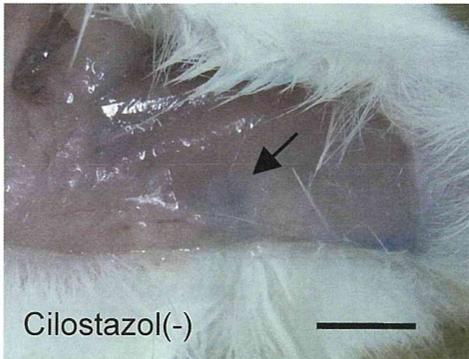
Fig.8 マウス耳の皮膚を電子顕微鏡で観察した。リンパ管の代表的な像を示す。A Cilostazol 非投与群では基底膜から内皮細胞が剥離していた。B 投与群では同様の所見はあまりみられなかった。Bar はそれぞれ 10nm, 5nm。C 同定したリンパ管のうち内皮の剥離が観察されたものの割合を示す。Cilostazol 投与群では非投与群と比較して剥離が少なかった($P < 0.05$)。

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 (Fig.9)。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。

A



B

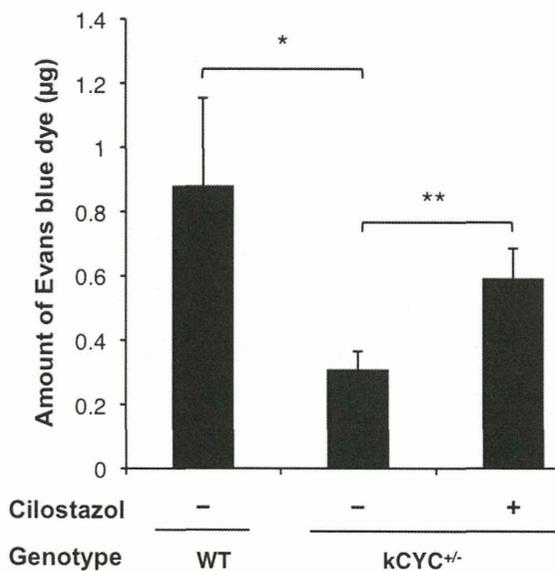


Fig.9 A Cilostazol 飼料投与マウスに対して色素を注射し、10 分後の膝窩リンパ節の外観を示す。Cilostazol 投与群のマウスでは非投与群よりも濃くリンパ管が濃く染まるのが観察された。B 膝窩リンパ節に流入した Evans blue を定量した。WT と比較して Tg マウスでは移行する色素の量が低下していた。Tg の Cilostazol 投与群では非投与群と比較して色素量の増加がみられた。

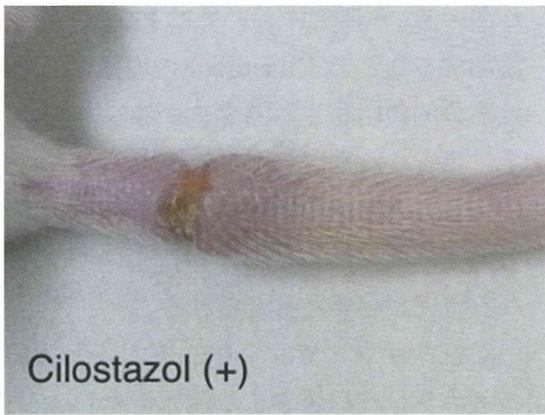
マウス尾におけるリンパ浮腫モデル

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.10 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.11)。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。



Cilostazol (-)



Cilostazol (+)

Fig.10 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。

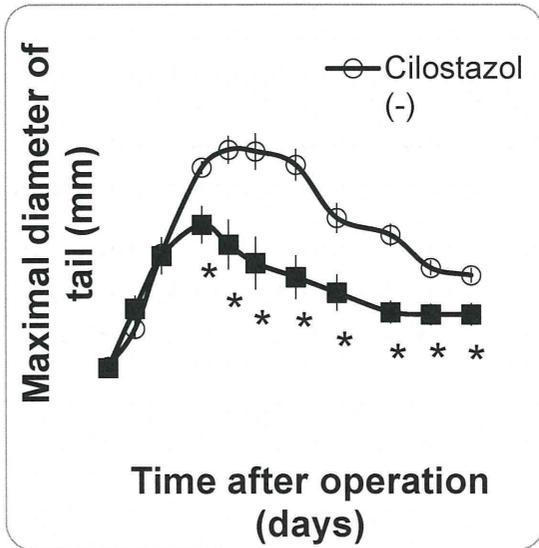
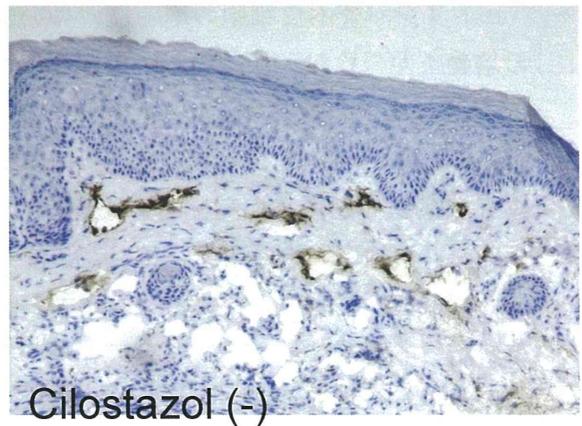


Fig.11 マウスの尾の直径の経時的変化。Cilostazol 投与群において尾の直径が減少する傾向がみられた。

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.12)。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。



Cilostazol (-)

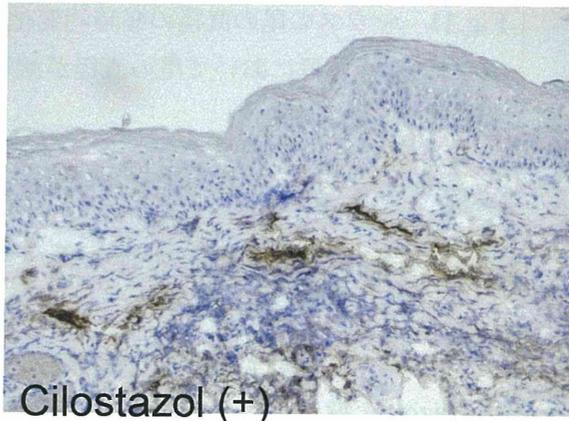


Fig.12 尾の皮膚に対して抗 LYVE-1 抗体で免疫染色を施行した。Cilostazol 非投与群においてリンパ管の拡張がみられたが、投与群では拡張がみられなかった。

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、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。また、同じPDE3抑制剤であるCilostamideおよびMilrinoneと比べると、Cilostazolによるリンパ内皮細胞増殖効果およびリンパ浮腫モデルマウスに対する体重増加率の向上効果が大きい傾向が認められた。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 25 年度 総括・分担研究報告書
発行 平成 26 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)

