

# 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する phosphodiesterase 阻害剤, cilostazol の治療効果

呉 城 珠 里

近畿大学医学部内科学教室 (神経内科部門)

## 抄 録

Phosphodiesterase (PDE) は cAMP, cGMP を加水分解する酵素であるが, 様々な PDE 阻害薬は多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) のモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を抑制すると報告されている。Cilostazol は PDE III を選択的に阻害し, その血小板凝集抑制作用や血管拡張作用により虚血性疾患の治療に用いられている。さらに cilostazol には接着分子の発現抑制作用もあると報告されている。今回, 我々は cilostazol の EAE に対する治療効果を検討した。C57B1/6 マウスを myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)<sub>35-55</sub> で感作し cilostazol 含有餌を与えた群と, 通常餌を与えた群に分けて飼育した。Cilostazol 群ではコントロール群に比べて有意に EAE 重症度, MOG 反応性 T 細胞増殖や, IFN- $\gamma$  産生, 血清中可溶性 intercellular adhesion molecule-1 が低下していた。以上より, cilostazol は自己反応性 T 細胞増殖や接着分子の発現を抑制することにより EAE を抑制すると考えられる。Cilostazol は MS の治療薬となる可能性があり, ヒトにおける治療効果や耐用性についてなどさらなる検討が必要である。

**Key words :** phosphodiesterase 阻害剤, cilostazol, 実験的自己免疫性脳脊髄炎, 多発性硬化症, 接着分子, intercellular adhesion molecule-1, P-selectin

## 緒 言

Phosphodiesterase (PDE) は細胞内セカンドメッセンジャーである環状ヌクレオチド cAMP, cGMP を加水分解する酵素であり, 下流の cAMP-dependent protein kinase (PKA)・cGMP-dependent protein kinase (PKG) シグナルを調節している。PDE はそのドメインに基づいて11種類のファミリー, さらに21のアイソザイムに分類され, アイソザイムには50種類以上のバリエーションが報告されている<sup>1</sup>。

Cilostazol は PDE III を特異的に阻害する抗血小板薬であり, 脳虚血性疾患の治療に広く使われている。抗血小板作用<sup>2</sup>以外にも, 血管拡張作用<sup>3,4</sup>, 血管平滑筋増殖抑制作用<sup>5</sup>も併せ持つ。NF- $\kappa$ B の活性化阻害を介した接着分子 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の発現抑制作用や<sup>6</sup>, アポトーシス抑制作用<sup>7</sup>, 血管内皮細胞における tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) による monocyte chemo-

attractant protein-1 (MCP-1) 産生の抑制<sup>8</sup> が報告されている。

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は中枢神経ミエリンの慢性進行性の炎症性疾患である。MS では活性化リンパ球と単球/マクロファージが中枢神経へ侵入することが中枢神経の炎症と脱髄に重要であると考えられている。免疫細胞が中枢神経へ侵入するとき VCAM-1, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), P-selectin のような接着分子は重要であると考えられている。

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) は MS のモデル動物とされており, myelin basic protein (MBP) や myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) をアジュバンドとともに免疫することにより作られる。Amrinone<sup>9</sup> や ibudilast<sup>10</sup>, mesopram<sup>11</sup>, rolipram<sup>12,13</sup> などの PDE 阻害薬は抗原特異性 T 細胞増殖を抑制し, T 細胞よりのサイトカイン産生を Th2 に偏倚させることにより EAE を抑

制すると報告されている。さらに、我々は COX-2 阻害薬である celecoxib により接着分子 P-selectin, ICAM-1 の発現が抑えられ、炎症細胞が中枢神経へ浸潤するのを抑制し EAE の治療につながったと報告した<sup>14</sup>。

以上より、cilostazol は EAE において免疫バランスを調節し、接着分子発現を抑制することにより EAE 症状を軽減させる可能性があると考えた。よって、今回我々は、cilostazol による EAE に対する治療効果を検討した。

## 方 法

### 1) マウス

動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律、基本指針に基づいて作成された近畿大学医学部動物実験規定に準じて行なった。野生型 C57B1/6 (B6) マウスを CLEA Laboratory Animals (Tokyo Japan) より購入。固形餌と水を自由に摂取させ、室温、12 時間明暗サイクル下で飼育した。

### 2) EAE 惹起

EAE は B6 マウス (8-12 週齢, 雌) に MOG ペプチド (MOG<sub>35-55</sub>: MEVGWYRSPFSRVVHLYR-NGK) 100 µg とフロイト不完全アジュバントに結核死菌 (Difco Laboratories, Detroit, USA) を加え、エマルジョンを作成、側腹部より皮下注射し感作した。初回感作時及び 48 時間後に、百日咳毒素 (List Biological Laboratories, Campbell, USA) 300 ng/匹を腹腔内投与した。感作時より 0.1% cilostazol 含有固形餌 (Ohtsuka, Tokushima, Japan) を与えた群 (n=28) と、通常餌 (n=28) を与えた群にわけて飼育した。

### 3) EAE 臨床評価

臨床症状評価には以下のスコアを用いた。

0: 正常, 1: 尾のトーンス低下, 2: 尾の完全下垂, 3: 歩行異常, 4: 後足の完全脱力, 5: 前足と後ろ足の完全脱力, 6: 死亡。

### 4) 抗原特異的リンパ球増殖反応

EAE 感作 12 日目に、単径リンパ節、膝窩リンパ節を採取し 100 µm ナイロンのセル ストレイナー (BD Biosciences, Bedford, USA) を使って single cell の状態にした。1×10<sup>6</sup>/well の細胞数にし、0, 1, 10, 100 µg/ml と段階希釈したペプチド MOG<sub>35-55</sub> を添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 96 穴平底のプレート上にて 72 時間の培養を行なった。なお培養液は、RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) に 5×10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1% 自家血清を添加したものを使用した。培養終了 18

時間前に [<sup>3</sup>H] thymidine (1 µCi/well) を添加し、radioactivity を β-1205 counter (Pharmacia, Uppsala, Sweden) にて測定した。

### 5) サイトカイン産生

増殖反応に使用した well の培養上清を用い、サイトカインの測定を行なった。培養 48 時間の培養上清をサイトカイン測定まで -80°C で保存した。IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10, IL-17 の測定は enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (anti-mouse OptEIA Kits, BD Bioscience, San Jose, USA) を用いて測定した。

### 6) 可溶性接着分子測定

EAE 感作 14 日, 21 日, 30 日目にマウス尾静脈よりガラス管を用いて血液を採取し血清を分離、可溶性接着分子測定まで -80°C で保存した。血清中可溶性 ICAM-1 (sICAM-1), VCAM-1 (sVCAM-1), P-selectin (sP-selectin) の測定は ELISA kit (R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt Germany) にて行なった。

### 7) マウス脳、脊髄の組織学的検討

EAE 感作 14 日, 30 日目のマウスにエーテル吸入麻酔下で胸腔を切開し心臓を露出、左心室より 10% ホルマリン液で満たした 50 ml シリンジをつないだ 27 ゲージ翼状針を挿入後、右心耳をメスにて約 3 mm 切開し、シリンジ中のホルマリン液で灌流した。その後脳、脊髄を採取。脳と三等分に横断した脊髄を 10% ホルマリンで固定し、パラフィン包埋の後、4 µm で連続切片を作成した。脳、脊髄への細胞浸潤を評価するために hematoxylin and eosin (HE) 染色を、脱髄を評価するために Luxol fast blue (LFB) 染色を、接着分子発現を評価するために免疫染色を行なった。一次抗体には ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), P-selectin (CD62-p: BD Bioscience, San Diego, USA) を用い、二次抗体には ICAM-1: 抗ビオチン化ハムスター抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, USA), VCAM-1/P-selectin: 抗ビオチン化ラット抗体 Vector Laboratories, Burlingame, USA) を用いた。

### 8) 統計学的解析

データはすべて平均値±標準誤差 (SEM) で表示した。すべての有意差検定には Mann-Whitney U-test を用い、P<0.05 を有意とした。

## 結 果

### 1) cilostazol による EAE の抑制効果

コントロール群では、EAE 感作後 13.9±0.54 日で症状が出現した。最重症スコアは 3.5±0.12 で累積スコアは EAE 感作 1-30 日で 42.2±2.70 (表 1) であ

表1 EAE 重症度

	最重症スコア	発症日 (日目)	発症頻度 (匹)	累積スコア
control	3.5±0.12	13.9±0.54	28/28	42.2±2.70
cilostazol	2.9±0.20*	14.6±0.70	23/28	36.1±3.86

データは平均値±SEM で表示した。

\* : P<0.05 vs. control 群

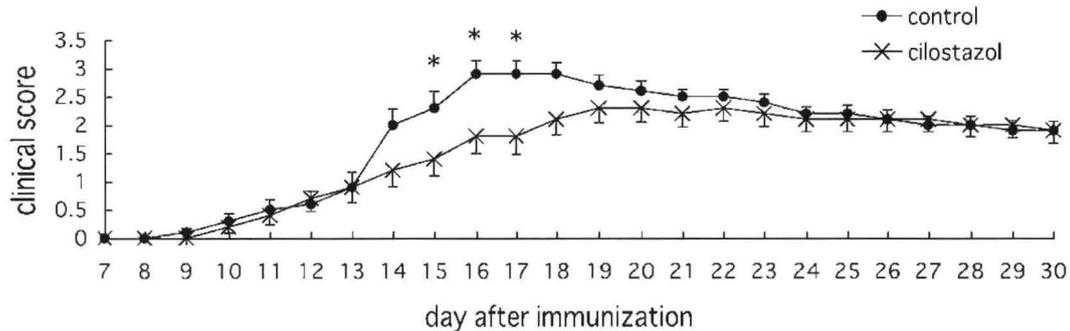
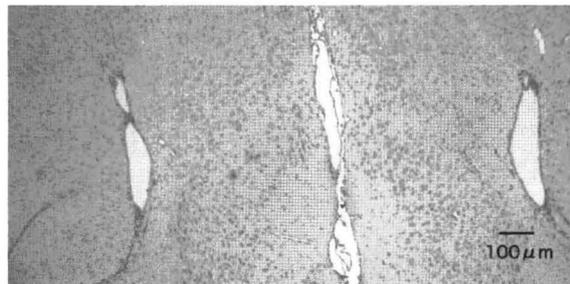


図1 EAE に対する cilostazol の効果

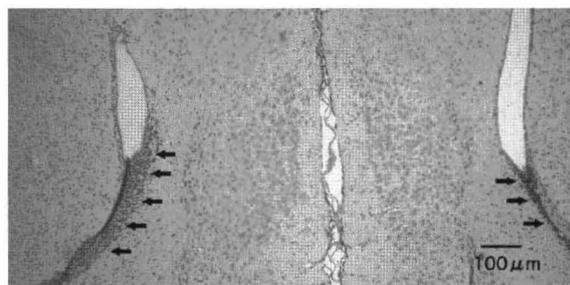
0.1% cilostazol 含有餌を与えた群 (n=) (×) と通常餌を与えた群 (n=) (●) の EAE 重症の変移を示す。EAE 感作15, 16, 17日目においてコントロール群に比較して cilostazol 群で EAE 重症度が有意に低下していた。

エラーバーは SEM を示す。

\* : P<0.05 vs. control 群



cilostazol 群



コントロール群

図2 マウス脳組織の HE 染色

コントロール群では、側脳室周囲や脳表において脳実質への細胞浸潤が見られ、一部の脳動脈では周囲への細胞浸潤 (perivascular cuffing) が見られた。一方, cilostazol 群では、脳実質への細胞浸潤は見られるものの、コントロール群に比べ程度は軽度であった。矢印は細胞浸潤を示す。

った。一方, cilostazol 群では EAE 感作後14.6±0.70日目で症状が出現し、最重症スコアは2.9±0.28、1-30日の累積スコアは36.1±3.86であった。cilostazol の経口投与により EAE の発症が遅れ、最重症スコア、累積スコアが低下する傾向にあったが、コントロール群との間に有意な差はなかった。図1は日別でみた EAE clinical score の平均を示す。EAE 感作15, 16, 17日の EAE スコアは cilostazol 群で有意に低下していた。組織学的には cilostazol 群では、脳実質内への細胞浸潤は見られるものの、コントロール群に比べて程度は軽度であった。(図2)

## 2) MOG 特異的 T 細胞増殖と Th1 サイトカイン産生

cilostazol 群では、コントロール群に比べ MOG 特異的 T 細胞増殖が有意に抑制された(図3 A)。さらに、リンパ節細胞の培養上清での IFN- $\gamma$  産生においても cilostazol 群ではコントロール群に比べ有意に抑制された(図3 B)。MOG 特異的 T 細胞増殖(図3 A)と IFN- $\gamma$  産生(図3 B)に有意差のある MOG 濃度に一致点は認めないが、IFN- $\gamma$  の上昇をきたすには MOG 濃度 1, 10  $\mu\text{g/ml}$  では刺激が足りなかったと思われる。さらに、IFN- $\gamma$  上昇と MOG 特異的 T 細胞増殖において必要な MOG の刺激濃度が違うと考えている。また、MOG 特異的 T 細胞増殖において一部の細胞では MOG 100  $\mu\text{g/ml}$  では刺激が強すぎて、細胞死に至り、増殖反応の数値が低値

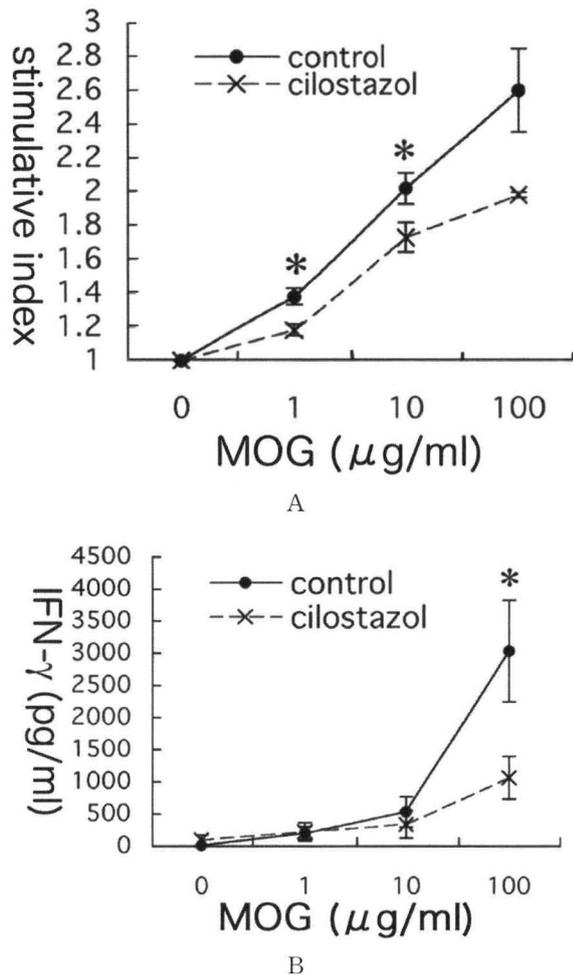


図3 cilostazolのMOG<sub>35-55</sub>特異的T細胞増殖反応への影響

Aはリンパ節細胞をMOG<sub>35-55</sub>で再刺激し、培養72時間後に<sup>3</sup>H]thymidineの取り込みでみた増殖反応を示す。横軸に再刺激したMOG<sub>35-55</sub>濃度、縦軸は増殖感度とした。Bは培養48時間後の培養上清中のIFN- $\gamma$ 産生をELISA法で確認、横軸は再刺激したMOG<sub>35-55</sub>濃度とした。

コントロール群とcilostazol群はそれぞれ8匹ずつとした。

エラーバーはSEMを示す。

\*: P<0.05vs. control群

になった可能性がある。TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-17では両群で差は認められなかった。また、血清中のサイトカイン、白血球は測定していない。

### 3) 接着分子

血清中sICAM-1はEAE感作21日目において、sP-selectinはEAE感作14日目においてcilostazol群で有意に低下していた(図4)。脳、脊髄の接着分子発現は免疫染色において両群間に差は認められなかった。

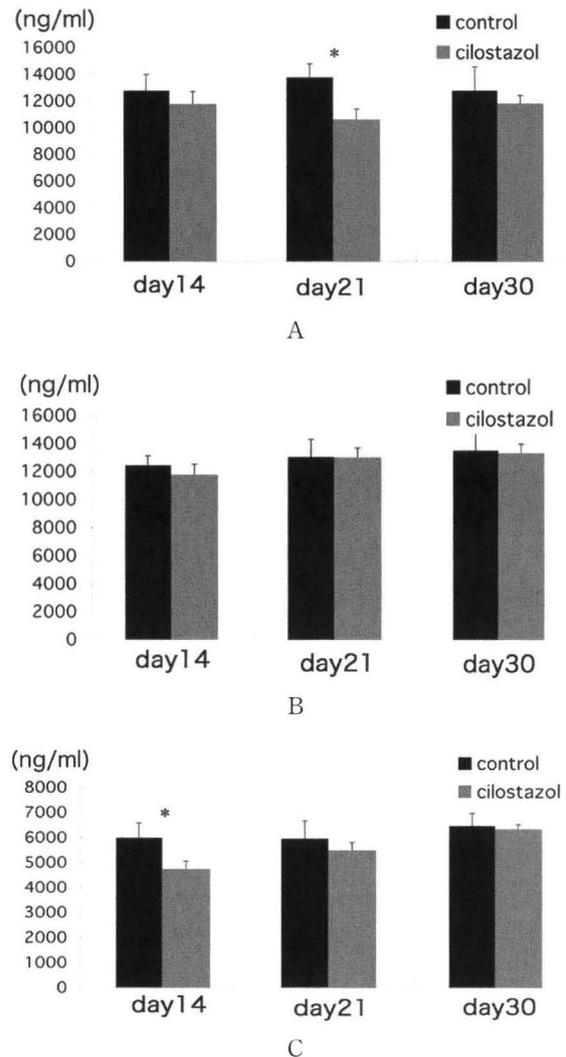


図4 EAE感作14日、21日、28日目の血清中可溶性接着分子をELISA法で観察した。AはsICAM-1を示す。いずれの時期もcilostazol群で低下傾向にあり、21日目においては有意差を認めた。BはsVCAM-1を示すが両群間で差は認められなかった。CはsP-selectinを示す。14日目においてcilostazol群で有意に低下していた。

コントロール群とcilostazol群はそれぞれ10匹ずつとした。

エラーバーはSEMを示す。

\*: P<0.05vs. control群

## 考 察

本研究においてcilostazolによるEAE抑制効果が明らかになった。MOG<sub>35-55</sub>での再刺激においては抗原特異的リンパ節細胞増殖とそれに伴うIFN- $\gamma$ 産生がcilostazolにより抑制された。これまでにIV型のPDE阻害薬であるmesopramやrolipram, nonselectiveのibudilastなどによるEAE抑制効果は報告されており<sup>9-13</sup>、免疫システムにお

いて cAMP を上昇させる薬剤が IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$ , IL-2 などの Th1 サイトカイン産生の抑制することは明らかとなっている<sup>15-19</sup>。III型とIV型の PDE の違いはそのドメインに基づく。また、それぞれ主な組織発現部位が違い、個々の組織において作用が変わってくる。III型 PDE は主に心臓、平滑筋、脂肪細胞、血小板、免疫細胞に存在し、IV型は主に脳、免疫細胞などに存在する。このように免疫細胞には主に PDE III と IV が存在する<sup>20</sup>。Bibiana らは、cilostazol と同じ III 型 PDE 阻害薬である cilostamide と IV 型の rolipram はヒト末梢リンパ球の抗原特異的増殖と、IFN- $\gamma$  産生を抑えると報告しており、ここではこれらの抑制効果は rolipram のほうが強かったとしている。その理由の一つとして、cAMP の分解経路が違うことを挙げている。

III 型 PDE 阻害薬による EAE 抑制効果の報告は今回の cilostazol がはじめてであり、その理由のひとつとして他の PDE 阻害薬と同様に Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  産生が抑制され、Th2 への偏倚がおこったためと考えている。従来、EAE では Th1/Th2 バランスが Th1 にシフトすることが発症に関わっていると考えられてきた。しかし最近、IL-17 を産生する Th17 細胞が最も重要な自己免疫細胞であると言われている。本研究においても IL-17 産生について検討したが、cilostazol 経口投与により IL-17 の低下は明らかでなかった。

選択的 COX-2 阻害剤である celecoxib は炎症性細胞が中枢神経へ侵入するのを防ぎ、さらに ICAM-1 と P-selectin の発現を抑えることが報告されている。その機序として接着分子発現を抑えることにより細胞浸潤が抑制されると考察されている<sup>14</sup>。EAE 発症においてはまず血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) の破綻が重要な初期のステップであり、炎症性細胞が BBB を通過し中枢神経へ浸潤する過程において、炎症性細胞はまず BBB を構成する内皮細胞上に緩やかに接着 (rolling) し、次に強固な接着 (attachment) がおこり、最後に内皮下へ遊走 (migration) する。これらの過程で重要となるのが P-selectin のようなセレクトリン族や ICAM-1 などの接着分子と炎症性サイトカインである。接着分子発現は炎症性サイトカインによりさらに増強され、炎症性細胞の流入は促進され、侵入した炎症性細胞は再び局所で炎症性サイトカインを paracrine に放出する。Bullard らは ICAM-1 のいずれのアイソフォームも発現しない ICAM-1 null mutant マウスでは中枢神経への T 細胞浸潤と IFN- $\gamma$  産生が抑制されることにより EAE が抑えられると報告し、ICAM-1 は T 細胞が中枢神経に浸潤するのに必要

であり、また抗原特異的 T 細胞増殖においても重要であるとしている<sup>21</sup>。さらに、MS 患者では内皮細胞での ICAM-1 や VCAM-1 発現の増強<sup>22</sup>、血清中 sICAM-1, sVCAM-1 の増加が認められている<sup>23,24</sup>。

cilostazol による接着分子への影響は今までに多く報告されている。NIDDM 患者においては cilostazol の経口投与により血清中 sICAM-1 と sVCAM-1, sP-selectin が低下する<sup>25</sup>。又 cilostazol による高血糖下の患者における NO 産生促進を介した ICAM-1, P-selectin 発現抑制作用<sup>26</sup>、TNF- $\alpha$  産生抑制による NF- $\kappa$ B の活性化阻害を介した血管内皮上の VCAM-1 の発現抑制作用<sup>6</sup> も報告されている。本研究においても血清中 sICAM-1, sP-selectin は cilostazol 投与群において低下しており上記報告と矛盾ない。接着分子は血管内皮細胞や、免疫細胞など様々な細胞上に発現する。以前、COX-2 阻害剤である celecoxib が BBB での接着分子発現をおさえることにより中枢神経への炎症細胞の侵入を防いだと報告した<sup>14</sup>。今回、EAE の重症度で統計学的に有意差が認められたのは、EAE 誘導後 15 日目、16 日目、および 17 日目であった。15 日目はおよそ、EAE 症状の出はじめの時期 (表 1) と考えられる。つまり MOG 特異的 T 細胞が BBB を通過しミエリンを攻撃する時期であり、cilostazol によりここが抑制されると考えれば、今回の結果のようにこの時期に最も差が出やすいと思われる。以上より、今回も同様の機序を考えているが、接着分子の局在など詳細な検討は行なえていない。前報告のように BBB での発現抑制の他に、抗原提示細胞上の接着分子発現をおさえシグナル伝達を抑えた可能性なども残され、今後のさらなる検討が必要と考えている。

以上より、cilostazol は Th1/Th2 バランスを Th2 に偏倚させるだけでなく、接着分子発現抑制を介して中枢神経へ炎症細胞が侵入するのを防ぐことで EAE を抑制している可能性があると考えられる。

cilostazol は経口可能な薬剤であり、すでに虚血性疾患の治療に広く使われている。今回の研究で EAE の抑制効果を認めたことより今後、MS の再発予防に有効な治療薬となる可能性がある。ヒトに対する用量的な認容性の問題や、他薬物との併用についてなどのさらなる検討が必要と思われる。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導ならびに御稿閲いただいた近畿大学医学部神経内科学教室宮本勝一講師、楠進教授に深謝申し上げます。また、終始ご協力いただきました神経内科学教室員各位に感謝申し上げます。

## 文 獻

1. Lugnier R (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109: 366-398
2. Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K (1985) Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 35: 1144-1149
3. Kawamura K, Watanabe K, Kimura Y (1985) Effect of cilostazol, a new antithrombotic drug, on cerebral circulation. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 35: 1149-1154
4. Shintani S, Watanabe K, Kawamura K, Mori T, Toba T, Sasabe H, Nakagiri N, Hongoh O, Fujita S, Aogi T, Kido Y, Umezato M, Ishikawa M, Hiyama T (1985) General pharmacological properties of cilostazol, a new antithrombotic drug. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 35: 1163-1172
5. Takahashi S, Oida K, Fujiwara R, Maeda H, Hayashi S, Takai H, Tamai T, Nakai T, Miyabo S (1992) Effect of cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: 900-906
6. Otsuki M, Saito H, Xu X, Sumitani S, Kouhara H, Kurabayashi M, Kasayama S (2001) Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF- $\kappa$ B binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis* 158: 121-128
7. Kim KY, Shin HK, Choi JM, Hong KW (2002) Inhibition of lipopolysaccharide-induced apoptosis by cilostazol in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 709-715
8. Nishio Y, Kashiwagi N, Takahara N, Hidaka H, Kikkawa R (1997) Cilostazol, a cAMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in response to tumor necrosis factor-1 in vascular endothelial cells. *Hrm Metab Res* 29: 491-495
9. Tamaru T, Suzumura A, Takayanagi T (1998) Inhibitory effects of phosphodiesterase inhibitors on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunology* 6: 154-155
10. Fujimoto T, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T (1999) Ibudilast, a phosphodiesterase inhibitor, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark August rats. *J Neuroimmunol* 95: 35-42
11. Dinter H, Tse Jenny, Halks-Miller M, Asarnow D, Onuffer J, Faulds D, Mitrovic B, Kirsch G, Laurent H, Esperling P, Sidemann D, Ottow E, Schneider H, Tuohy VK, Wachtel H, Perez HD (2000) The type IV phosphodiesterase specific inhibitor mesopram inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents. *J Neuroimmunol* 108: 136-146
12. Martinez I, Puerta C, Redondo C, Garcia-Merino A (1999) Type IV phosphodiesterase inhibition in experimental allergic encephalomyelitis of Lewis rats: Sequential gene expression analysis of cytokines, adhesion molecules and the inducible nitric oxide synthase. *J Neurol Sci* 164: 13-23
13. Moore CS, Earl N, Frenette R, Styhler A, Mancini JA, Nicholson DW, Hebb ALO, Owen T, Robertson GS (2006) Peripheral phosphodiesterase 4 inhibition produced by 4-[2-(3,4-Bis-difluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)-phenyl]-ethyl]-3-methylpyridine-1-oxide (L-826, 141) prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 63-72
14. Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S, Yamamura T (2006) Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway. *Brain* 129: 1984-1992
15. Claveau D, Chen SL, O'Keefe S, Zaller DM, Styhler A, Liu S, Huang Z, Nicholson DW, Mancini JA (2004) Preferential inhibition of T helper 1, but not T helper 2, cytokines in vitro by L-826, 141 [4-{2-(3,4-Bisdifluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)-phenyl]-ethyl}-3-methylpyridine-1-oxide], a potent and selective phosphodiesterase 4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 752-760
16. Suzumura A, Ito A, Yoshikawa M, Sawada M (1999) Ibudilast suppresses TNF $\alpha$  production by Glia cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res* 837: 203-212
17. Suzumura A, Ito A, Mizuno T (2003) Phosphodiesterase inhibitors suppress IL-12 production with Microglia and T helper 1 development. *Mult Scler* 9: 574-578
18. Bielekova B, Lincoln A, Mcfarland H, Martin R (2000) Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases. *J Immunol* 164: 1117-1124
19. Yoshikawa M, Suzumura A, Tamaru, Takayanagi T, Sawada M (1999) Effects of phosphodiesterase inhibitors on cytokine production by microglia. *Mult Scler* 5: 126-133
20. Ekholm D, Hemmer B, Gao G, Vergelli M, Martin R (1997) Differential expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 and 4 activities in human T cell clones specific for myelin basic protein. *J Immunol* 159: 1520-1529
21. Bullard DC, Hu X, Schoeb TR, Collins RG, Beardet AL, Barnum SR (2007) Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell type for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178: 851-857
22. Dore-Duffy P, Washington R, Dragovic L (1993) Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 331: 243-248
23. Sharief MK, Noori MA, Ciardi M, Cirelli A, Thompson EJ (1993) Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active

- multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage. *J Neuroimmunol* 43 : 15-21
24. Rieckmann P, Nunke K, Burchhardt M, Albrecht M, Wiltfang J, Ulrich M, Felgenhauer K (1993) Soluble intercellular adhesion molecule-1 in cerebrospinal fluid: an indicator for the inflammatory impairment of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Neuroimmunol* 47 : 133-140
25. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Hayakawa T, Kagawa H, Nishikawa M, Inada M, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S (1998) Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Thromb Haemost* 80 : 388-392
26. Omi H, Okayama N, Shimizu M, Fukutomi T, Nakamura A, Imaeda K, Okouchi M, Itoh M (2004) Cilostazol inhibits high glucose-mediated endothelial-neutrophil adhesion by decreasing adhesion molecule expression via NO production. *Microvasc Res* 68 : 119-125