

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590228

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患の血液脳関門病変化とレニン・アンジオテンシン系阻害薬の保護作用

研究課題名(英文)Blood-brain barrier function change in the chronic obstructive pulmonary disease and protective effect of the renin-angiotensin system inhibitors

研究代表者

富永 宏治 (TOMINAGA, Koji)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10509623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)病態下における血液脳関門(BBB)機能の変化とメカニズム、レニン・アンジオテンシン系阻害薬による保護効果について検討を行った。その結果、COPDモデルマウスにおいてBBBのタイトジャンクション機能が低下すること、この機能低下には血液中のIL-13、MCP-2が関与すること、さらに機能低下はアンジオテンシン受容体拮抗薬であるロサルタンにより保護されることが示された。

研究成果の概要(英文)：We examined the change of the blood-brain barrier (BBB) functions and mechanism in the chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and BBB protective effect with the renin-angiotensin system inhibitor. As a result, BBB tight junction function decreased in the COPD model mouse, and serum IL-13, MCP-2 level is associated with for this functional decline. Also, this functional decline was protected by the losartan, angiotensin receptor blocker.

研究分野：医療薬学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 血液脳関門 レニン-アンジオテンシン系 副作用

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) は、根治を期待できない疾患とされていたが、近年の COPD 患者を対象とした薬剤介入大規模臨床試験により、予防と治療が可能な疾患として位置づけられるようになった。その背景には抗コリン薬の長時間作用型製剤の使用が大きく寄与している。

吸入抗コリン薬は COPD における可逆性気道収縮に対して単剤で最も有効とされ、総症例数約 6000 例の大規模臨床試験 (UPLIFT 試験) によりエビデンスも確立され、現在 COPD の第一選択薬として常用されている。

一方、抗コリン薬は薬剤性認知機能障害を惹き起こす原因薬剤である。脳組織は脳血管内皮細胞を実体とした血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) という脳の防御機構により、末梢の病的変化の影響から保護されている。しかし、炎症、薬剤、加齢など様々な要因により BBB 機能は低下する。抗コリン薬に関しては、BBB の透過性が亢進する高齢者の継続使用により認知機能の低下がさらに増悪するとの報告がある (BMJ.2006)。

(1) 近年 COPD 患者において認知機能が低下することが報告された (Am J Respir Crit Med.2009, 180, 134-137)。COPD 患者の認知機能障害が発現・進展する過程において BBB 脆弱化がどのように関与するかについては不明である。大規模 COPD 患者群の現状と高齢化による将来的増大を考慮すれば、COPD に伴う BBB 機能変容の解明は、病的依存的な薬物脳移行に基づく副作用発現の予測・回避に必要な不可欠である。

(2) レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の最終生成物であるアンジオテンシン II (AT-II) は、血圧調節や炎症反応に深く関与する生理活性物質であり、AT-II は血液脳関門を構成する血管内皮細胞、血管周囲細胞の機能障害や脳微小血管の炎症反応に関与する。また、肺にはアンジオテンシン変換酵素が多く存在するなど肺機能の障害によって影響を受けやすい物質である。このようにレニン・アンジオテンシン系は血管系の様々な疾患を制御していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究において、「COPD 患者における BBB 脆弱化は認知機能障害の危険因子となる」という仮説を立てた。さらに、「レニン・アンジオテンシン系関連物質を制御することにより COPD 誘発性 BBB 脆弱化が回避できる」と考えた。

以上の仮説を検証するため、以下の項目について検討を行った。

(1) エラスターゼ誘発 COPD モデルマウスによる COPD モデルマウスによる BBB 機能の評価

(2) BBB タイトジャンクション関連蛋白質の変動

(3) BBB 機能変化の要因物質の検討

(4) 抗コリン薬の脳内移行性

(5) AT-II 受容体拮抗薬 (ARB) の病態改善の有用性

3. 研究の方法

(1) エラスターゼ誘発 COPD モデルマウス 7 週齢の C57BL/6N マウスに気管内液体噴霧器 (PENN CENTURY 社製) を用いてブタ由来豚エラスターゼを気管内に投与し作成した。対照群として Phosphate buffer saline (PBS) を同様に気管内へ投与した。

(2) アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) 投与
ARB であるロサルタンは、エラスターゼ気管内投 2 週間後から皮下投与で一週間投与した。

(3) COPD モデルマウスの評価
エラスターゼの気管内投与後、モデル作成の成否の指標を検討するため、マウスの体重、トレッドミルによる走行量、マウス用パルスオキシメーター (PowerOxy900®) による SpO₂ を経時的に測定した。また、肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症性細胞数および肺組織切片を作成して平均肺胞間距離を測定し、それらの関連性について検討した。

(4) In vivo 脳血管透過性の評価
in situ 脳灌流法を用い、フルオレセインナトリウム (NaF) (経細胞間隙経路) およびエバンスブルー (EB) (経細胞経路) の脳移行量を測定し、COPD 病態下における BBB 機能変化を検討した。

(5) BBB タイトジャンクション関連蛋白質の変動
脳海馬領域におけるタイトジャンクション関連蛋白質である claudin-5, occludin, ZO-1 の発現の変化を免疫組織化学 (Immunohistochemistry; IHC) を用いて解析した。

(6) 血清中炎症性サイトカイン・ケモカインの測定

モデル動物から血液を採取し、血清中に含まれる炎症性サイトカイン・ケモカイン量をマルチプレックスアッセイを用いて網羅的に解析した。

(7) in vitro 脳血管内皮細胞への血清サイトカイン・ケモカインの影響

モデル動物の血液より分離した血清を、培養インサート (Coster Transwell®) を用いて培養したマウス脳血管内皮細胞 (in vitro BBB モデル) の血管側に添加し、NaF 透過性、エバンスブルーアルブミン (EBA) 透過性および電気抵抗値 (TEER; Transepithelial Electro Resistance 密着結合性) を測定した。

(8) 抗コリン薬の脳内移行性の検討

in situ 脳灌流法により抗コリン薬で4級アンモニウム化合物である³Hラベル化N-メチルスコポラミンの脳移行量を経時的に測定し、COPD病態下における抗コリン薬の脳透過性変化を検討した。

4. 研究成果

本研究では以下の知見が得られた。

(1) COPDモデルマウスの評価

現在、COPDモデル形成の成否はBALF、肺組織切片像から判断する方法が主流である。よって、この成否の判断は動物を安楽死した後でしか行えない。そこで殺処分する前に成否を判断できる指標があるかを検討した。その結果、対照群と比較してエラスターゼ投与群ではSpO₂の低下、平均肺胞間距離の拡大が相関した。また、エラスターゼ投与によるSpO₂の低下はロサルタン投与により改善された(図1)。この結果より、簡便なCOPDモデル形成の成否判断が可能となった。また、ロサルタンはCOPD病態下での呼吸能改善に有用である可能性が示された。

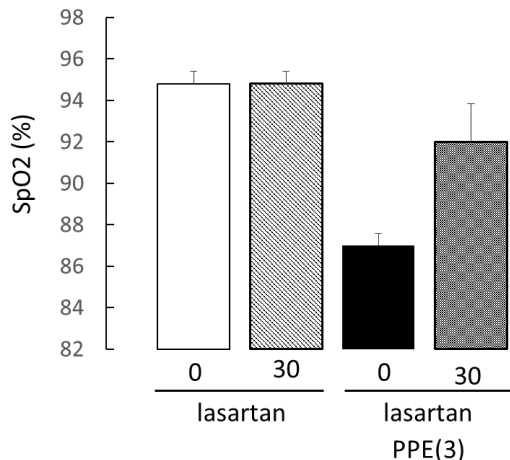


図1 .COPDモデルマウスでのSpO₂の変化

(2) In vivo 脳血管透過性の評価

COPDモデルマウスでは対照群と比較してエラスターゼの濃度依存的にNaF、EBの脳血管透過性が上昇した。この上昇はロサルタン投与により濃度依存的に抑制された。この結果より、COPD病態下ではBBB機能が脆弱化すること。ロサルタンはこのBBB脆弱化を防止することが明らかとなった。(図2)

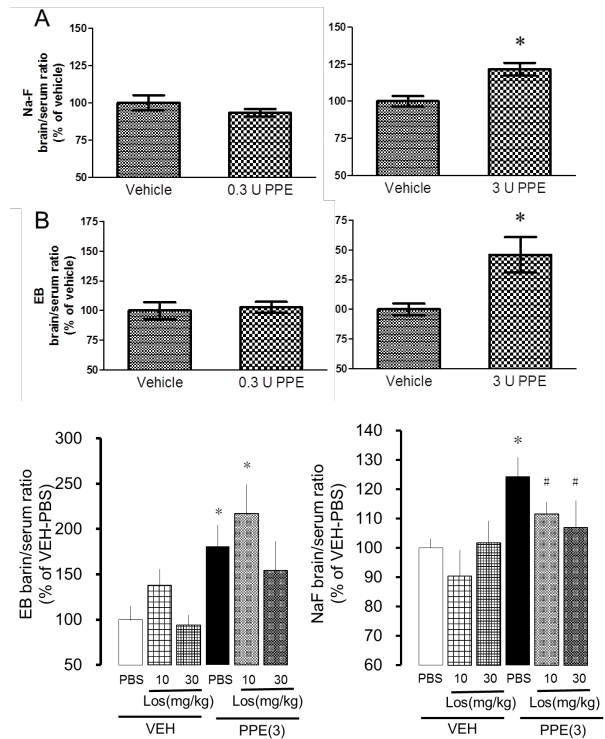


図2 . COPDモデルマウスにおける脳血管透過性の変化

(3) タイトジャンクション関連蛋白質の変動

BBBを構成するタイトジャンクション関連蛋白質であるclaudin-5, occludin, ZO-1の発現の変化を、認知機能に関連が深い脳海馬領域においてIHCにより検討した。その結果、COPDモデルではoccludinの発現が減少していることが明らかとなった。

(4) in vitro 脳血管内皮細胞への血清サイトカイン・ケモカインの影響

COPDモデルマウスより採取した血清をマウス脳血管内皮細胞に添加し、NaF透過性、EBA透過性およびTEERを測定したところ、COPDモデルでは対照群と比較してEBA透過性の上昇が認められた。ロサルタン投与群ではエラスターゼによるEBA透過性は抑制された。

(5) 血清中サイトカイン・ケモカインの測定

COPD モデルマウス血清中のサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。その結果、対照群と比較して IL-1 α 、IL-13、MIP-2、RANTES、IL-9 が上昇していることが明らかとなった。(表 1)

表 1. COPD モデルマウスの血中炎症性サイトカインの変化

	Vehicle (pg/mL)	3 U PPE (pg/mL)
IL-1 α (pg/mL)	5.79 \pm 2.5	116.9 \pm 40.9*
IL-13 (pg/mL)	26.65 \pm 5.7	42.66 \pm 3.6*
MIP2 (pg/mL)	5.68 \pm 2.6	30.86 \pm 6.4*
RANTES (pg/mL)	5.52 \pm 1.2	9.79 \pm 1.7*
IL-9 (pg/mL)	9.07 \pm 3.0	34.59 \pm 11.1*

これらの炎症性サイトカイン・ケモカインに対するロサルタンの効果については現在検討中である。

(6) 抗コリン薬の脳内移行性の検討

4 級アンモニウム化合物で抗コリン薬の ³H ラベル化 N-メチルスコポラミンを用いて抗コリン薬の脳内移行性について検討した。その結果、COPD モデルでは時間経過とともにメチルスコポラミンの脳内移行・蓄積が認められた。ロサルタン投与群ではエラスターゼ投与によるメチルスコポラミンの脳内移行・蓄積に影響を与えなかった。この結果より COPD 病態下では抗コリン薬の BBB 透過性が亢進することが明らかとなったしかしこの亢進はロサルタンで抑制されなかったことから抗コリン薬の脳内移行には別の機構の関与が示唆された。(図 3)

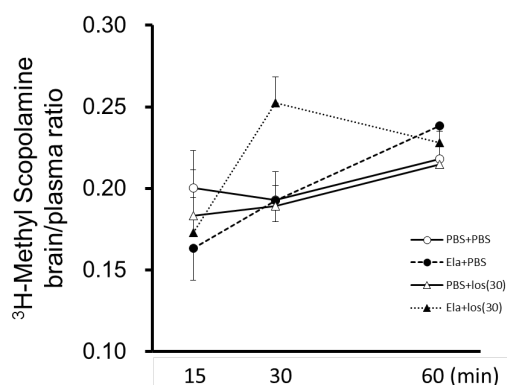


図 3. 抗コリン薬の脳内移行性

本研究より、COPD 病態下では IL-1 α 、IL-13、MIP-2、RANTES、IL-9 の循環血液中の濃度が上昇することにより、脳海馬領域でタイトジャンクション構成蛋白質である

occludin が減少し、BBB 機能が脆弱化することが明らかとなった。これは本研究の仮説を裏付けるものであると考えられる。さらに RAS は BBB 機能脆弱化を制御できる可能性を示した。この成果に加え、RAS による BBB 機能制御について細胞内シグナル伝達機構を含めてさらに研究を進めることで病的依存的な薬物脳移行に基づく副作用発現の予測・回避に貢献できると考える。

なお、これらの研究結果については現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

富永宏治、慢性閉塞性肺疾患モデルマウスにおける血液脳関門機能脆弱化にはアンジオテンシン II が関与する、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日、(熊本県・熊本市・熊本市総合体育館)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 宏治 (TOMINAGA, Koji)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10509623

(2)研究分担者

山内 敦史 (YAMAUCHI, Astushi)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：90341453

松本 純一 (MATSUMOTO, Junichi)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10550064

(3)連携研究者

なし