

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861156

研究課題名(和文)脳虚血時における血液脳関門の破綻及び修復機序の解明

研究課題名(英文)Statin ameliorates lipopolysaccharide-induced dysfunction of blood-brain barrier

研究代表者

諸藤 陽一 (MOROFUJI, Yoichi)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：40437869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞培養技術を駆使し、生体に近い血液脳関門モデルを作製した。このモデルに炎症刺激を加えると、炎症性サイトカインが上昇し、血液脳関門機能が低下することが確認された。更に脂質異常症治療薬であるスタチンを投与することで、このサイトカイン上昇が抑制されることを確認した。脳内炎症を抑えることは、脳梗塞のみならず、多くの中枢神経系疾患において重要であるため、今後そのメカニズム解明に着手する。

研究成果の概要(英文)：Statins have a neuroprotective effect in neurological diseases, a pleiotropic effect possibly related to blood-brain barrier (BBB) function. In this study, we investigated the effects of statin on lipopolysaccharide (LPS)-induced BBB dysfunction in vitro BBB model comprising co-culture of primary mouse brain endothelial cells, pericytes, and astrocytes. LPS (1 ng/ml, 24 hr) induced the impairment of permeability and transendothelial electrical resistance (TEER). Co-administration of statin alleviated the deleterious effects of LPS on BBB permeability and TEER. LPS increased IL-6, G-CSF, KC, MCP-1, RANTES release from our BBB model. Statin inhibited all these LPS-induced cytokine production. These data suggest that pitavastatin could ameliorate LPS-induced BBB dysfunction, which might be mediated by inhibiting LPS-induced cytokine production. Our present finding sheds light on the pharmacological significance of statins in various kinds of CNS diseases.

研究分野：脳神経外科学、血液脳関門学

キーワード：血液脳関門 スタチン 脳虚血

1. 研究開始当初の背景

本邦は高齢化社会を迎え、脳卒中はますます増えつつあり、なかでも脳梗塞患者が急増している。2005年にわが国でも脳梗塞急性期治療薬として tPA (tissue-type plasminogen activator) による血栓溶解療法が認可された。しかしその恩恵を受けることのできる患者は脳梗塞全体の 5% 以下に限られているため、脳梗塞に有効な治療薬の開発が期待されている。これまで、神経細胞をターゲットとした治療薬は基礎実験で有効であっても臨床試験では有効性は示されなかった。そこで我々は脳梗塞治療薬の検討を血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) 保護の観点から行ってきた (Honda M: *Cel Mol Neurobiol* 2006, Hiu T: *Cel Mol Neurobiol*, 2008)。申請者は特に HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) が BBB に与える影響に着目し、研究を行い、その一部はすでに論文報告している (Morofuji Y: *Cel Mol Neurobiol* 2010)。スタチンには本来の脂質低下作用だけでなく、血管内皮細胞機能改善作用、抗血栓作用、抗炎症作用などの効果が注目されており、このようなスタチンの多彩な効果は pleiotropic effects と呼ばれている (Libby P: *Nature*, 2002)。しかしながら、スタチンの中枢神経系 (脳) をはじめ各臓器での作用や至適投与量は判明しておらず、今後系統的に解明していく必要がある。そこで本研究では、脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト、ミクログリアを組み合わせ共培養した *in vitro* BBB モデルを用いて、スタチンが BBB に与える影響を多角的に評価する。更に虚血再灌流下及び炎症刺激下でのスタチンの作用機序解明に焦点を置き研究を行う。

2. 研究の目的

血液脳関門 (BBB) の機能的な構築には基本構成単位である脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイト間のクロストークが不可欠である。さらに脳虚血時や炎症下に

おいてはミクログリアの関与も注目されている。本研究ではこれら全ての細胞を組み合わせた複数の共培養 *in vitro* BBB モデルを用いて、虚血再灌流、炎症刺激を加えた病態モデルを作製し、neurovascular unit における細胞間相互作用を検討する。さらに多彩な作用をもつスタチンが BBB に与える影響及びその作用機序の解明を行う。これらのメカニズムを解明することにより全く新しい創薬概念である「BBB 保護薬」の開発につながると考えている。

3. 研究の方法

簡潔に次の 3 段階を計画した。

in vitro BBB モデルの作製方法はすでに確立しているため、虚血再灌流モデル、炎症モデルの確立が第一のステップであった。次に病態モデル及びスタチンが BBB 機能に与える影響の検討を行った。全ての研究はワシントン大学との discussion をもとに進めた。

(1) 病態モデルの確立: 虚血再灌流モデル、炎症モデル

(2) 病態モデルおよびスタチンが BBB 機能に与える影響の検討:

TEER、透過性、P 糖蛋白の機能検定、tight junction proteins の発現、サイトカインアッセイ

(3) メカニズムの解明

RAGE、LRP-1 の発現調節シグナル及びスタチンの分子生物学的機序の分析

4. 研究成果

in vitro BBB モデルとして多孔質 (0.4 μm 、3.0 μm pore size) の半透膜をもつ立体培養皿 (Transwell[®]) を用い共培養モデルを作製した。モデルは、液性因子のみの影響を受けるモデルと、内皮細胞とペリサイトまたはアストロサイトが接触できるモデルを作製し、更に 3 種類の細胞を同時に共培養したモデルも含め 7 種類のモデルを作製した。作製した複数の BBB モデル及び以下の病態モデルに 1 ng/mL の LPS (lipopolysaccharide) を添加し、

24 時間後に EVOM 抵抗計 (Volt-Ohm resistance meter) を用いた経内皮電気抵抗値 (transendothelial electrical resistance, TEER) 及び sodium fluorescein (小分子(376Da)の paracellular transport) の透過性試験を行った。また、培養液を血管腔側と脳側よりそれぞれ別に回収しサイトカインアッセイを行った。1 ng/mL の LPS 添加により、有意に TEER の低下及び透過性亢進が確認された。また IL-6、G-CSF、KC、MCP-1、RANTES といった炎症性サイトカインの上昇が確認された。これらのサイトカイン上昇はピタバスタチン 10nM を添加することで抑制されることを確認した。脳内炎症を抑えることは、脳梗塞のみならず、多くの中枢神経系疾患において重要であるため、今後そのメカニズム解明に着手する予定である。

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 6 件)

1. Current management for vasospasm following subarachnoid hemorrhage: endovascular option. Morofuji Y, Horie N, Hayashi K, Izumo T, Matsuo T. Neurovascular Event after Subarachnoid Hemorrhage. 141-144, Narnia Inc, 2017 査読無
2. One Cause of Secondary Hypertension: Neurogenic Etiology. Fujimoto T, Morofuji Y, Horie N, Izumo T, Hayashi K, Kawano H, Matsuo T, Nagata I. Circulation; 133(20): 1985-6, 2016. 査読有 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.021184.
3. Glucagon-Like Peptide-1 Strengthens the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells Under Basal and Hyperglycemia Conditions. Fukuda S, Nakagawa S, Tatsumi R, Morofuji Y,

Takeshita T, Hayashi K, Tanaka K, Matsuo T, Niwa M. J Mol Neurosci;59(2):211-9, 2016. 査読有

doi:10.1007/s12031-015-0696-1.

4. Computational and in vitro studies of blast-induced blood-brain barrier disruption. Mauricio J. Del Razo, Morofuji Y, James S. Meabon, B. Russell Huber, Elaine R. Peskind, William A. Banks, Pierre D. Mourad, Randall J. Leveque, David G. Cook. SIAM J. Sci. Comput., 38(3), B347-B374, 2016. 査読有 doi:10.1137/15M1010750
5. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, Meabon JS, Wing EE, Morofuji Y, Cook DG, Reed MJ. J Neuroinflammation;12:223, 2015. 査読有 doi: 10.1186/s12974-015-0434-1.
6. Candesartan improves ischemia-induced impairment of the blood-brain barrier in vitro. So G, Nakagawa S, Morofuji Y, Hiu T, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Matsuo T, Niwa M. Cell Mol Neurobiol;35(4):563-72, 2015. 査読有 doi: 10.1007/s10571-014-0152-8.

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸藤 陽一 (MOROFUJI, Yoichi)
長崎大学・病院 (医学系)・助教
研究者番号：40437869

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし