

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592094

研究課題名(和文) 高血圧ラットにおける血管原性脳浮腫の研究

研究課題名(英文) Vasogenic brain edema in the spontaneous hypertensive rat

研究代表者

林 健太郎 (HAYASHI, KENTARO)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：40404222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脳より内皮細胞，ペリサイト，アストロサイトを分離し，共培養して血液脳関門(BBB) in vitro modelを作成した．advanced glycation endproducts (AGEs)は normoxiaの条件下ではBBB機能に影響を与えなかったが，低酸素化再酸素化では有意にBBB機能を減少させた．一方，cilostazolはAGEs投与下の低酸素化再酸素化の条件でBBB機能を回復させた．AGEsは細胞外のTGF- $\beta$ 1の産生を上昇させ，cilostazolはその産生を抑制しtight junctionの統合性を回復した．

研究成果の概要(英文)：We used in vitro blood-brain barrier (BBB) models with primarily cultured BBB-related cells from rats. Treatment of AGEs did not affect the transendothelial electrical resistance (TEER) in the BBB model under normoxia, but there was a significant decrease in TEER under 3-h oxygen glucose deprivation (OGD)/24-h reoxygenation conditions with AGEs. Cilostazol inhibited decreases in TEER induced by 3-h OGD/24-h reoxygenation with AGEs. Furthermore, while AGEs increased the production of extracellular transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, cilostazol inhibited the production of extracellular TGF- $\beta$ 1 and restored the integrity of tight junctions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害 血液脳関門 血管原性脳浮腫

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病を合併した虚血性脳血管障害では梗塞巣や脳浮腫が増悪することが知られているが、脳浮腫発症の責任部位である血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) の機能障害に関する詳細なメカニズムは未だ不明である。近年の研究により糖尿病性網膜症や大血管障害では終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) が血管内皮細胞障害に関与することが指摘されている。

### 2. 研究の目的

実験的虚血再灌流条件下での AGEs の作用を BBB in vitro モデルを用いて検討し、そのメカニズムの解明を行った。また、BBB の機能障害を軽減する薬物 (BBB 保護薬) の検討も行った。シロスタゾール (cilostazol) はホスホジエステラーゼの選択的阻害薬であり細胞内サイクリック AMP を上昇させ、血管拡張作用や抗血小板作用を発揮する。また、BBB に対する保護的な効果を有することが報告されている。そこで、シロスタゾールを BBB 保護薬候補として検討を行った。

### 3. 研究の方法

ラット脳より分離した脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトをを用いて BBB in vitro モデルを作成した。虚血再灌流の条件下で AGEs が BBB に与える影響を調べるため、BBB モデルに BSA (bovine serum albumin) の糖化産物である AGE-BSA (200 µg/ml) を添加し、3 時間の oxygen-glucose deprivation (OGD) と、24 時間の再灌流を行った。Normoxia の条件では BSA (200 µg/ml) を添加した。BBB の機能評価は経内皮細胞電気抵抗 (TEER) 値を測定することで行った。また、tight junction (TJ) 蛋白である Zonula occludens-1, claudin-5 の発現を免疫染色法、ウエスタンブロット法を用いて検討した。また、作製した BBB 機能障害モデルに対するシロスタゾールの作用も検討した。虚血再灌流下での AGEs による BBB 機能障害メカニズムを検討する目的で、細胞外 TGF- $\beta$ 1 濃度を immunoassay 法にて測定し、TGF- $\beta$ 1 (1ng/ml) 添加による TEER 値の経時の変化を測定した。

### 4. 研究成果

BBB に対する AGEs の影響を TEER 値で確認すると AGEs は Normoxia の条件では TEER 値に変化を与えなかったが、虚血再灌流の条件下では有意な低下を示した。一方、cilostazol を投与すると、虚血再灌流及び AGEs 投与による TEER 値の低下を抑制した。この変化を免疫組織染色法、ウエスタンブロット法による tight junction 蛋白の発現で確認すると、虚血再灌流で AGEs を作用させたものでは claudin-5 の発現は低下したが、シロスタゾールの投与にてその低下は抑制された。また、AGEs は BBB モデルにおける細胞外 TGF- $\beta$ 1 の

産生を増加したが、シロスタゾールはその産生を抑制した。最後に TGF- $\beta$ 1 を直接 BBB モデルに投与すると経時的に TEER 値は低下したが、シロスタゾール投与によりその低下は抑えられた。虚血再灌流及び AGEs 添加で低下した TEER 値は TGF- $\beta$ 1 の受容体阻害剤である A83-01 の投与にて回復した。

### 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 24 件)

1. Hayashi K, Horie N, Nagata I. A case of unilateral moyamoya disease suffered from intracerebral hemorrhage due to the rupture of cerebral aneurysm, which appeared seven years later. Surg Neurol Int. 4:1, 2013 査読有

2. Hayashi K, Horie N, Suyama K, Nagata I. An epidemiological survey of moyamoya disease, unilateral moyamoya disease and quasi-moyamoya disease in Japan. Clin Neurol Neurosurg. 115:930-933, 2013 査読有

3. 林健太郎, 平尾朋仁, 立石洋平, 堀江信貴, 出雲 剛, 辻野 彰, 永田 泉. 脳卒中診療に係る専門医の都道府県分布からの検討. Neurosurgical Emergency 18: 127-130, 2013 査読有

4. 林健太郎, 立石洋平, 平尾朋仁, 堀江信貴, 出雲 剛, 辻野 彰, 永田 泉. 脳神経外科診療におけるポケットサイズ超音波診断装置の有用性. Neurosonology 26:4-7, 2013 査読有

5. 林健太郎, 永田 泉. 合併症のシステムティックレビュー, 適切な Informed consent のために, 第9回 CEA 頸動脈内膜剥離術. No Shinkei Geka 41:529-539, 2013 査読有

6. 林健太郎, 永田 泉. 慢性期における外科的治療(血管内治療を含む). 最新医学 68: 86-89, 2013 査読有

7. 林健太郎, 永田 泉. クリッピング術とコイル塞栓術の使い分け. Clinical Neuroscience 31: 457-460, 2013 査読無

8. Toyoda K, Tanaka K, Nakagawa S, Thuy DH, Ujifuku K, Kamada K, Hayashi K, Matsuo T, Nagata I, Niwa M. Initial contact of glioblastoma cells with existing normal brain endothelial cells strengthen the barrier function via fibroblast growth factor 2 secretion: a new in vitro

blood-brain barrier model. Cell Mol Neurobiol. 33:489-501, 2013 査読有

9. Hayashi K, Matsuo T, Suyama K, Nagata I. Usefulness of ultrasonography with a burr-hole transducer during surgery through a burr hole. Neurol Med Chir (Tokyo). 52:165-68, 2012 査読有

10. Hayashi K, Horie N, Suyama K, Nagata I. Incidence and clinical features of symptomatic cerebral hyperperfusion syndrome after vascular reconstruction. World Neurosurg. 78:447-454, 2012 査読有

11. 林健太郎, 氏福健太, 馬場史郎, 立石洋平, 辻野彰, 堀江信貴, 陶山一彦, 永田泉. 脳神経外科診療における脳卒中ユニット, 集中治療室, 救命救急センターの役割. Neurosurg Emerg 17: 130-133, 2012 査読有

12. 林健太郎, 鎌田健作, 松尾孝之, 堀江信貴, 永田 泉. 内視鏡下脳内血腫除去術における burr-hole ultrasonography の有用性. Neurosonology 25:17-20, 2012 査読有

13. 林健太郎, 堀江信貴, 森川 実, 竹下朝規, 陶山一彦, 永田 泉. 塞栓術中にコイルが逸脱してきた内頸動脈瘤の1例. No Shinkei Geka. 40:271-276, 2012 査読有

14. 林健太郎, 堀江信貴, 陶山一彦, 永田泉. もやもや病, 片側型もやもや病, 類もやもや病に関する全国調査. 脳卒中の外科 40: 179-182, 2012 査読有

15. Hayashi K, Horie N, Suyama K and Nagata I. Aortic Dissection Complicated with Fatal Cerebral Infarction: Case Report and Review of Literatures. Open Journal of Modern Neurosurgery. 2: 21-24, 2012 査読有

16. 林健太郎, 永田 泉. 頸部頸動脈狭窄の治療 外科治療(CEA). 救急医学 36:937-939, 2012 査読無

17. Hayashi K, Horie N, Suyama K, Nagata I. Clinical features and long-term follow-up of quasi-moyamoya disease in children. Pediatr Neurosurg 47: 15-21, 2011 査読有

18. Hayashi K, Suyama K, Nagata I. Traumatic carotid cavernous fistula complicated with intracerebral hemorrhage: Case report. Neurol med-chir 51: 214-216, 2011 査読有

19. 林健太郎, 堀江信貴, 森川 実, 宗 剛

平, 竹下朝規, 陶山一彦, 永田 泉. 頸動脈ステント留置術中に回収されたデブリスの同定: 頸動脈内膜剥離術病理標本と対比して. Journal of Neuroendovascular Therapy 5: 99-105, 2011 査読有

20. 林健太郎, 松尾孝之, 堀江信貴, 陶山一彦, 永田 泉. 脳神経外科診療における小型超音波装置の有用性 テクニカルノート. Neurosonology 23: 112-115, 2011 査読有

21. 林健太郎, 森川 実, 竹下朝規, 堀江信貴, 陶山一彦, 永田 泉. 脳梗塞を合併した大動脈解離の診断にMRI/MRAが有用であった1例. 脳神経外科速報 21: 1046-1050, 2011 査読有

22. 林健太郎, 永田 泉. 血管内治療と動脈内膜剥離術の選択のしかた. Medical practice 28:705-708, 2011 査読無

23. 林健太郎, 永田 泉. 頸動脈狭窄の治療と脳梗塞の予防. Medicina 48: 1230-1232, 2011 査読無

24. 林健太郎, 永田 泉. 頸動脈狭窄症の治療~頸動脈内膜剥離術か?ステント留置術か?~実験治療 701: 8-11, 2011 査読無

[学会発表](計 16 件)

1. 林健太郎. アンギオガードによる血流障害はフィルターの目詰りで, フィルタワイヤーのそれは血管攣縮による. 第 29 回日本脳神経血管治療学会, 新潟, 2013.11.20-23, 抄録集 p145, 2013

2. 林健太郎. 脳血管攣縮に対する血管内治療は早期に施行した方が有効である. 全国調査の解析から. 第 72 回日本脳神経外科学会総会, 東京, 2013.10.15-18 抄録集 p182, 2013

3. Hayashi K. Nationwide survey on unilateral moyamoya disease. The 6th Korea-Japan Joint Stroke Conference, Osaka, 2013.10.5-6 Abstract A28, 2013

4. Hayashi K. Current status of endovascular treatment for acute ischemic stroke in Japan. The 6<sup>th</sup> meeting of east asia leadership in interventional therapy for cerebral vascular disease. Seoul, 2013.8.23-24, Abstract p3, 2013

5. Hayashi K. A case of cavernous sinus dural AVF. The 6<sup>th</sup> meeting of east asia leadership in interventional therapy for cerebral vascular disease. 2013.8.23-24, Seoul, Abstract p3, 2013

6. 林健太郎．頸動脈内膜剥離術周術期抗血栓療法の違いとそれに起因する合併症．第12回日本頸部脳血管治療学会 2013.6.27-29 東京，抄録集 p36, 2013

7. 林健太郎．脳卒中診療における脳神経外科医の役割．第18回日本脳神経外科救急学会．弘前．2013.2.7-9 抄録集 p59, 2013

8. 林健太郎．頸動脈ステント留置術中に回収されたデブリスの同定：頸動脈内膜剥離術病理標本と対比して．第28回日本脳神経血管内治療学会優秀論文賞発表，仙台，2012.11.15-17 抄録集 p76, 2012

9. Hayashi K. Usefulness of pushable coil for neurointervention. 11th Japanese & Korean Friend Friendship Conference on Surgery for Cerebral stroke 2012.9.13-15 Seoul, Abstract p107, 2012

10. 林健太郎．内視鏡的脳内血腫除去術における burr-hole ultrasonography の有用性．第31回日本脳神経超音波学会，大宮 2012.6.29-30，抄録集 p40, 2012

11. Hayashi K. Pathological analysis of the debris collected during carotid artery stenting and evaluation of distal protection filter. Asian Australasian Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology, Nagoya, 2012.6.13-15, Abstract p170, 2012

12. 林健太郎．脳卒中診療に係る専門医の都道府県分布からの検討．STROKE2012，福岡，2012.4.26-28 抄録集 p164, 2012

13. Hayashi K. Identification of the debris collected during carotid artery stenting, comparing with carotid endarterectomy specimen. 12th Young-Honam and Kyushu Neurosurgical Joint Meeting. Kokura, 2011.11.11-12 abstract p65, 2011

14. 林健太郎．脳梗塞の最新治療．第7回長崎脳卒中市民公開講座，長崎，2011.5.28、

15. 林健太郎．脳神経外科救急診療における小型超音波診断の有用性．第16回日本脳神経外科救急学会，名古屋，2011.1.29-30，抄録集 p23, 2011

16. 林健太郎．頸動脈ステント留置時に回収されたデブリスの観察．第11回長崎画像診断研究会，長崎，2011.1.14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

林健太郎 (HAYASHI, Kentaro)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：40404222

(2)研究分担者

竹下朝規 (TAKESHITA, Tomonori)  
長崎大学・大学病院・医員  
研究者番号：30597365

豊田啓介 (TOYODA, Keisuke)  
長崎大学・大学病院・医員  
研究者番号：40597366

馬場史郎 (BABA, Shiro)  
長崎大学・大学病院・助教  
研究者番号：30530430

出雲剛 (IZUMO, Tsuyoshi)  
長崎大学・大学病院・助教  
研究者番号：40343347

(3)連携研究者

( )

研究者番号：