

平成21年 3月 31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19791005

研究課題名（和文） 高血圧ラットにおける血液脳関門障害の検討

研究課題名（英文） The blood-brain barrier function of the spontaneous hypertensive rat

研究代表者

林健太郎（HAYASHI KENTARO）

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：40404222

研究成果の概要：血液中の物質の脳への移行は限られており、血液脳関門という。血液脳関門は毛細血管内皮細胞やペリサイト、アストロサイトによって調節されている。それぞれの細胞をラットより分離培養し、実験モデルを作製し、高血圧や低酸素による変化を調べ、現在脳梗塞の治療に用いられている薬剤（抗酸化剤、血栓溶解剤、スタチン）の作用を評価した。低酸素・再酸素化によりバリア機能は低下し、抗酸化剤はそれを保護する作用がみられた。血栓溶解剤ではさらにバリア機能は低下した。スタチンはバリア機能を高める作用がみられた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,400,000 | 0 | 1,400,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 390,000 | 3,090,000 |

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：血液脳関門，ラット，高血圧，低酸素，脳梗塞，tissue plasminogen activator, super oxide, スタチン

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は高齢化社会を迎え、ますます増えつつある。高血圧は脳血管障害の最も重要な危険因子の一つであり、高血圧ラットが生み出され、研究されてきた。高血圧ラットは脳内出血を来し易いのに加えて脳虚血においては脳梗塞をきたしやすいため、これにはスーパーオキシドの過剰発生などの機序が考えられている。脳の微小循環はその他の臓器のものに比して、構造的及び機能的な特色がある。血管内を循環する物質が容易に脳に移

行できないようになっており、血液脳関門（blood-brain barrier; BBB）という。BBBは脳毛細血管内皮細胞、基底膜、ペリサイトおよびアストロサイト足突起より構成されるため、その機能障害をそれぞれの細胞レベルで分析する必要がでてきた。さらに脳梗塞の治療に血栓溶解剤や抗酸化剤が用いられており、BBBに対する作用を検証する必要がでてきた。

2. 研究の目的

高血圧ラットおよびそのコントロールである Wistar-Kyoto Rat (WKY)より内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを分離培養する。内皮細胞のバリア機能を評価し、Claudin-5, occludin, ZO-1 などの tight junction protein の発現を比較する。ペリサイトおよびアストロサイトを共培養することにより、それぞれの細胞が内皮細胞へ及ぼす機能的相違を検証する。

脳虚血においては BBB が障害され、血中の因子が脳組織に漏出し組織傷害性される。BBB モデルに低酸素負荷を加え、障害の有無を検討する。高血圧ラットではスーパーオキシドによる影響が大きいと考えられており、抗酸化剤エダラボンの効果を評価する。また、超急性期脳梗塞の治療薬として用いられている tissue plasminogen activator (tPA)の作用について評価する。さらに脂質低下作用の他に多彩な作用を有するスタチンを投与し、バリア機能に与える影響について評価する。

3. 研究の方法

細胞分離培養：2週令ラットをエーテル麻酔後に断頭、前脳を摘出し、細断後、酵素 (collagenase 2, collagenase-dispase)・遠心処理し、脳毛細血管片を分離した。fibronectin, collagen IVのコーティング dish に培養することにより、内皮細胞を培養し、コーティングされていない dish に培養することでペリサイトが overgrowth し、ペリサイトを分離した。アストロサイトは前脳を摘出し、homogenize した後にコーティングなしのフラスコにまき、増殖後に shake することで分離できた。

血液脳関門 in vitro モデル：分離された内皮細胞を2腔培養系 (Transwell) を用いて in vitro モデルを作成した。下の腔にペリサイトやアストロサイトを共培養することによりその影響を評価した。

透過性試験：経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance: TEER) を EVOM resistance meter (World Precision Instruments)を用いて測定した。また、内腔側に分子量 376 Da で低分子の指標となる sodium fluorescein と高分子の指標となる Evans blue-albumin (67 kDa) を投与し、それらの透過性を検討する。電気抵抗は $\Omega \cdot \text{cm}^2$ とし、sodium fluorescein には 525 nm, Shimazu RF-500 fluorometer (440 nm) を用い、Evans blue は 620 nm Labsystems multiplatereader より測定した。透過性は細孔膜のみでの透過度を 100%とした割合 (%) で表示した。

免疫染色：chamber slide に培養された細胞をエタノール固定し、比特的反応の

blocking を行ない、1次抗体を作用させ、さらに蛍光ラベルした2次抗体を作用させ、蛍光顕微鏡で観察する。occludin, claudin-5 といった tight junction 蛋白を染色し、発現レベルを比較した。顕微鏡画像をコンピューターに取込み、NIH image にて定量化し、統計学解析した。

Western blotting：細胞より蛋白を抽出し、ゲル上に電気泳動させた。ニトロセルロース膜に移し、細胞内情報伝達に関わる蛋白 (MAP-kinase) に対する抗体とそのリン酸化したものに反応する抗体を反応させ、酵素反応を用いてリン酸化を定量し、活性化を検出した。機器は主に Biorad 社の製品を使用した。

低酸素負荷：低酸素負荷はキットを用いて 6 時間の低酸素化、3 時間の再酸素化とした。薬剤投与：低酸素負荷と tissue plasminogen activator (tPA), エダラボン、スタチンの投与を組み合わせ、それらの薬剤のバリア機能に与える作用について評価した。

4. 研究成果

内皮細胞をペリサイト、アストロサイトと共培養し、その作用を TEER を用いて評価した。ペリサイトおよびアストロサイトはどちらもバリア機能を高める働きがあり、3種類を培養することで最もバリア機能が高まった。血液脳関門の形成には細胞間の作用が重要であることが明らかとなった。

低酸素・再酸素化により TEER は低下した。エダラボンの投与により、TEER の低下が抑制された。脳梗塞ではスーパーオキシドが生じ、2次的障害に関与している可能性があり、それに対してエダラボンの効果があることが示された。tPA は単独でも TEER を低下させ、透過性を亢進した。tight junction protein の免疫染色では claudin-5 が低下していた。低酸素・再酸素化によりその低下はさらに著明となった。tPA は急性期脳梗塞に対して閉塞血管を再開通させる効果があるが、それ自体はバリア機能を低下させ、出血性梗塞などをきたす危険性が示された。

ピタバスタチンの効果についてはピタバスタチン投与後 48 時間で約 30% TEER は上昇した。tight junction protein の Western blotting を用いた評価では claudin-5 の発現が有意に上昇していた。ピタバスタチンはバリア機能を高める効果があり、脳障害の予防効果があるものと考えられた。

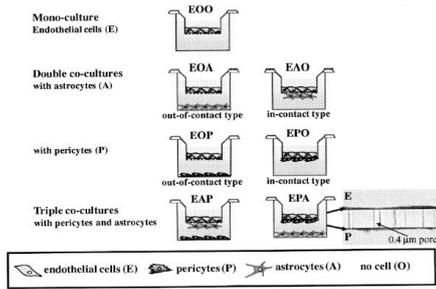


Fig. 1 A scheme of BBB models

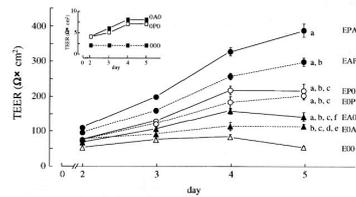


Fig. 2 Effect of co-culture on the induction of transendothelial electrical resistance (TEER) in brain capillary endothelial cell monolayers of in vitro BBB models. E00 (open triangles), E0A (filled triangles, dotted line), EAO (filled triangles), EOP (open circles, dotted line), EPO (open circles), EAP (filled circles, dotted line), EPA (filled circles). An inset graph (left upper panel) indicates a very low TEER of astrocytes (filled square, OAO) and pericytes (open square, OPO) cultured on the inserts. Results ($\Omega \times \text{cm}^2$) are presented as means \pm SEM, $n = 4$. * $P < 0.01$ was considered statistically significant difference in the TEER, as compared to E00, ^b $P < 0.01$ to EPA, ^c $P < 0.01$ to EAP, ^d $P < 0.01$ to EPO, ^e $P < 0.01$ to EOP, and ^f $P < 0.05$ to EPO, respectively

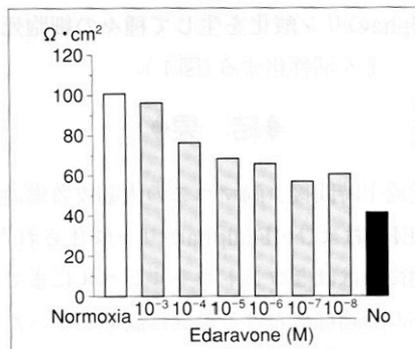


図 2. TEER

低酸素/再酸素化によりTEERは減少したが、エダラボンの投与によりその反応は軽減した。

□ : hypoxia/reoxygenation + edaravone.

■ : hypoxia/reoxygenation

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 20 件)

1. Hayashi K, Kitagawa N, Morikawa M, Horie N, Kawakubo J, Hiu T, Tsutsumi K,

Nagata I. Long-term follow-up of endovascular coil embolization for cerebral aneurysms using 3D time-of-flight MR angiography. *Neurol Res* (in press) 査読有

2. Hayashi K, Kitagawa N, Takai H, Nagata I. Carotid Artery Stenting via a Femoral Bypass Graft: Technical Note. *Surg Neurol* (in press) 査読有

3. Hayashi K, Kitagawa N, Morikawa M, Hiu T, Morofuji Y, Suyama K, Nagata I. Observation of the embolus protection filter for carotid artery stenting. *Surg Neurol* (in press) 査読有

4. Hayashi K, Kitagawa N, Morikawa M, Hiu T, Morofuji Y, Suyama K, Nagata I. MicroNester coil for neurointervention. *J Neurosurg*. 2009 110:40-3. 査読有

5. 一般的な脳動脈瘤手術、術中管理、手術成績: テント上 林健太郎, 永田 泉 *Clinical Neuroscience* 26:1355-1357, 2008 査読無

6. 脳動脈瘤の外科戦略「外科治療」 林健太郎, 永田 泉 *Pharma Medica* 26:27-29, 2008 査読無

7. 頸動脈ステント留置術時の血流遮断に不耐性で術後に一過性神経脱落症状をきたした1例. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉 *脳神経外科速報* 18:751-756, 2008 査読有

8. Embolus protection filter を用いたステント留置術中に filter obstruction を来した内頸動脈狭窄症の1例. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉 *No Shinkei Geka* 36:1133-1138, 2008 査読有

9. 脳神経外科穿頭術における burr-hole 用プローブを用いた術中エコーの有用性 林健太郎, 宗 剛平, 馬場史郎, 松尾孝之, 北川直毅, 陶山一彦, 永田 泉 *No Shinkei Geka* 36:879-883 2008 査読有

10. 周術期脳卒中の傾向と対策 林健太郎, 氏福健太, 日宇 健, 北川直毅, 陶山一彦, 永田 泉 *No Shinkei Geka* 36:409-416 2008 査読有

11. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉. 上眼静脈直接穿刺に難渋した海綿静脈洞部硬膜動静脈瘻の2例. *No Shinkei Geka* 36:165-170

2008 査読有

12. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 川久保潤一, 日宇 健, 堤 圭介, 永田 泉. 経上腕動脈法による頸動脈ステント留置術の1例. *No Shinkei Geka* 36:233-237 2008 査読有

13. Hiu T, Nakagawa S, Hayashi K, Kitagawa N, Niwa M. tPA enhances the hypoxial reoxygenation-induced impairment of the BBB in a primary culture of rat brain endothelial cell. *Cell Mol Neurobiol* 28, 1139-1146, 2008 査読有

14. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 川久保潤一, 日宇 健, 堤 圭介, 永田 泉. 経上腕動脈法による頸動脈ステント留置術の1例. *No Shinkei Geka* 36:233-237 2008 査読有

15. 林健太郎, 北川直毅, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 越智 章, 永田 泉. 軽微な外傷が原因と考えられた頸部内頸動脈解離の3例. *No Shinkei Geka* 35:1175-1181 2007 査読有

16. 林健太郎, 中川慎介, 川久保潤一, 日宇健, 本田 優, 北川直毅, 堤 圭介, 永田 泉, 丹羽正美. BBB in vitro モデルにおけるフリーラジカスカベンジャーの効果. *Pharma Medica* 25:201, 2007 査読無

17. Havashi K, Takahata H, Kitagawa N. Ruptured cerebral aneurysm complicated with rebleeding following thrombolysis during endovascular embolization: two case reports. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2007;47:261-4. 査読有

18. Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoka R, Kataoka Y, Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2007 Sep;27(6):687-94. 査読有

19. Andras IE, Deli M, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1431-1443, 2007 査読有

20. Pu H, Hayashi K, Andras IE, Eum S,

Hennig B, Toborek M. Limited role of COX-2 in HIV Tat-induced alterations of tight junction protein expression and disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res*. Dec 12;1184:333-44. 2007 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1. 日宇健, 中川慎介, 林健太郎, 諸藤陽一, 永田泉, 丹羽正美. tPA の血液脳関門に与える影響-in vitro 虚血モデルを用いて-第 20 回日本脳循環代謝学会総会 2008. 11. 6 東京

2. 諸藤陽一, 中川慎介, 林健太郎, 永田泉, 丹羽正美. スタチンが血液脳関門に与える影響第 67 回日本脳神経外科学会総会 2008. 10. 1 岩手

3. Kentaro Hayashi, Naoki Kitagawa, Minoru Morikawa, Takeshi Hiu, Yoichi Morofuji, Kazuhiko Suyama, Izumi Nagata. Observation of the embolus protection filter for carotid artery stenting. 9th Japanese and Korean Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke 2008. 6. 6-8, Daegu, Korea

4. Kentaro Hayashi, Naoki Kitagawa, Minoru Morikawa*, Yoichi Morofuji, Gohei So, Takayuki Matsuo, Kazuhiko Suyama, Izumi Nagata. Preoperative embolization for the cranio-cervical tumor using Gelpart. The 3rd international neurosurgical joint symposium Fudan-Nagasaki-Keimyung universities 2008. 10. 31 Nagasaki

5. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 諸藤陽一, 宗 剛平, 陶山一彦, 永田 泉. Gelpart を用いた頭頸部腫瘍塞栓術. 第 24 回日本脳神経血管内治療学会総会 2008. 11. 13-15 名古屋

6. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉. Angioguard 用いたステント留置術にて shower embolism を来した内頸動脈狭窄症の1例第 7 回小倉脳神経 IVR カンファレンス 2008. 3. 15-16 小倉

7. 林健太郎, 宗剛平, 馬場史郎, 溝田新吾, 松尾孝之, 北川直毅, 陶山一彦, 永田 泉. 脳神経外科穿頭術における burr hole 用プローブを用いた術中エコーの有用性. 第 27 回日本神経超音波学会 2008. 4. 23-25 東京

8. 林健太郎, 広瀬誠, 諸藤陽一, 氏福健太, 北川直毅, 陶山一彦, 永田 泉. ラット頸動脈を用いた脳神経外科顕微鏡手術トレーニング. 第 17 回脳神経外科手術と機器学会 2008. 4. 11-12 長崎

9. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実*, 日宇健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉. Embolus protection filter の術後病理学的検討. 第 7 回日本頸部脳血管治療学会 2008. 6. 13-14 長崎

10. 林健太郎, 上之郷真木雄 *, 北川直毅, 陶山一彦, 永田 泉. 自己免疫疾患を合併したくも膜下出血例の検討. 第 67 回脳神経外科学会総会 2008. 9. 30-10. 3 盛岡

11. 林健太郎, 氏福健太, 北川直毅, 日宇 健, 陶山一彦, 永田 泉. 周術期脳卒中の傾向と対策. 第 33 回日本脳卒中学会総会 2008. 3. 20-22 京都

12. 林健太郎, 北川直毅, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉. Angioguard による distal protection にて non-flow を来した内頸動脈狭窄症の 1 例. 第 7 回日本脳神経血管内治療学会九州・山口地方会 2008. 2. 9 福岡

13. 林健太郎, 北川直毅, 日宇 健, 陶山一彦, 永田 泉. 周術期脳卒中予防と治療のスタンダード. 第 66 回日本脳神経外科学会総会 2007. 10. 3-10. 5 東京

14. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉. Micronester Coil を用いた脳神経血管内治療. 第 23 回日本脳神経血管内治療学会総会 2007. 11. 15-11. 17 神戸

15. 林健太郎, 北川直毅, 森川 実*, 日宇健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田 泉. 血流遮断に不耐性な症例に対する血管拡張術. 第 6 回小倉 IVF カンファレンス 2007. 9. 22 小倉

16. 林健太郎, 北川直毅, 川久保潤一, 日宇健, 堤圭介, 永田泉. 類もやもや病 8 症例の検討と文献的考察. 第 32 回日本脳卒中学会総会 2007. 3. 21-23 福岡

17. Kentaro Hayashi, Naoki Kitagawa, Takeshi Hiu, Yoichi Morofuji, Kazuhiko Suyama, Izumi Nagata. Long-term follow-up of moyamoya syndrome: Report of eight cases
The 2nd Meeting of Asian Stroke Forum

2007. 9. 26-28Kyoto

18. 林健太郎, 北川直毅, 日宇 健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 越智章, 永田 泉. 頸部頸動脈解離の 3 例. 第 6 回日本頸部脳血管治療学会 2007. 6. 14-16 福岡

19. 林健太郎, 北川直毅, 森川実, 日宇健, 諸藤陽一, 陶山一彦, 永田泉. 上眼静脈直接穿刺に難渋した海綿静脈洞部硬膜動静脈瘻の 2 例. 第 8 回脳神経血管内治療琉球セミナー 2007. 6. 29-7. 1 沖縄

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林健太郎 (KENTARO HAYASHI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 40404222

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

