

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09531

研究課題名（和文）Rho kinase阻害薬fasudilが血液脳関門に与える影響とメカニズム解明

研究課題名（英文）Breakthrough of the effect and mechanism of Rho kinase inhibitor fasudil on blood-brain barrier

研究代表者

松永 裕希（Matsunaga, Yuki）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：80772136

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではRho kinase阻害薬であるfasudilのBBB保護効果が実証された。fasudilはタイトジャンクションタンパク質の発現を亢進することによりタイトジャンクション構造を維持、BBBの機能を向上させた。またfasudilは虚血再灌流によって引き起こされる損傷からBBBを保護することが確認された。この保護効果は内皮細胞のみの単培養モデルと、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトによる共培養モデルの両方で確認されたことから、fasudilが内皮細胞への直接的な作用と、ペリサイト、アストロサイトを介して内皮細胞へ間接的に作用する2つの経路でBBB保護作用を有していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rho kinase阻害薬であるfasudilは急性期脳梗塞治療で最も重要な虚血後8時間以内をピークとしてBBB機能を改善した。またこのBBB保護効果は既に実臨床で用いられている血中濃度レベルで濃度依存的に認められた。したがって、fasudilは急性期脳梗塞に対するBBB保護剤として有用であり、かつ安全に使用することが可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated the protective effect of the Rho kinase inhibitor fasudil on the BBB. Fasudil maintained the tight junction structure and improved the function of the BBB by enhancing the expression of tight junction proteins. Fasudil was also found to protect the BBB from damage induced by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation. This protective effect was confirmed in both monoculture model and co-culture model. It was suggested that it has a BBB-protective effect through two pathways that act indirectly on pericytes and astrocytes, and directly on endothelial cells.

研究分野：血液脳関門

キーワード：血液脳関門 Rho kinase阻害薬 脳卒中 ペリサイト アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

本邦は今後ますます高齢化が加速し、脳卒中、認知症、がんなど加齢に関連した疾患は激増することが予想される。なかでも脳卒中は死亡原因の第4位を占めているだけでなく、寝たきりの最大の原因となっており、莫大な医療費は国民に対する過大な負担となっている。急増している脳卒中患者の治療薬開発は緊喫の課題である。脳梗塞治療薬として2005年にわが国でも 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。そこで我々の研究グループ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, Takeshita T: *Mol Cell Neurosci* 2014)。我々は本研究において、中枢神経系 (脳) 保護の観点から、この課題に取り組みたいと考えている。

BBB は単に末梢 (血液) と中枢 (脳) を境界し、物質の移動を制限する関門として機能しているだけでなく、機能的な neurovascular unit を形成し、今まで考えられている以上に、ニューロン機能と一体化していることが理解され始めている。BBB の機能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。このクロストーク不全は中枢神経系疾患の発症と進展に関与する。事実、BBB の機能破綻が脳卒中やアルツハイマー病などの中枢神経疾患の発症と病状進展に関与していることが明らかにされている (Zlokovic BV: *Neuron*, 2008)。このため BBB 制御は中枢神経疾患治療の重要なターゲットの一つである。脳梗塞急性期治療のゴールは、閉塞血管を再開通させ神経細胞を保護することにある。しかし、脳虚血だけでなく治療後の再還流によって、過剰なフリーラジカル産生、蛋白合成の抑制、炎症が生じ神経細胞障害を引き起こす。神経細胞だけでなく脳梗塞進展に密接に関連しているミクログリア、アストロサイト、脳血管内皮細胞でも虚血侵襲により炎症反応が誘導される。脳虚血発症早期における血管内皮障害に Rho kinase pathway の活性化が関与していることが報告されており、Rho kinase と脳虚血、BBB との関連は非常に興味深いものである。Rho kinase は細胞運動・遊走・増殖・接着、遺伝子発現誘導など多面的に細胞の重要な生理機能を制御している。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、Rho kinase 阻害薬である fasudil 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 fasudil の作用機序解明に焦点を置き研究を行う。

## 2. 研究の目的

これまでの *in vitro* BBB モデルを用いた研究では、不死化した細胞を用いたものが多い。特に不死化内皮細胞を使用したモデルでは、BBB integrity の指標となる TEER 値が低く十分な tight junction 機能を有しているとは言い難い。さらに BBB は内皮細胞だけではなく、ペリサイト及びアストロサイトとのクロストークにより、その機能の成熟と維持が達成される。我々がすでに開発しているモデルは、これら全ての BBB 構成細胞をラット脳 (もしくはマウス脳) から分離培養し使用しており、より生体に近い環境を再現している。本研究ではこれまでほとんど解析されなかった neurovascular unit における細胞間相互作用の役割を複数の共培養モデルを組み合わせることによって解析が可能である。細胞間相互作用の解析は、虚血再灌流負荷時や炎症負荷などの

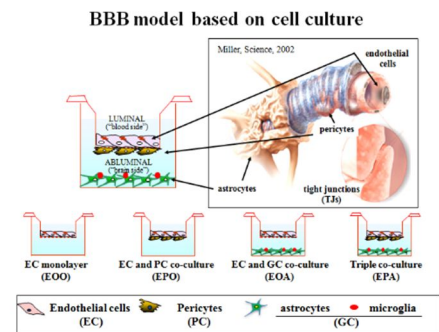
病態における BBB 機能低下のメカニズム解明の重要な手がかりを提供できる。さらに fasudil が BBB 機能を強化し、神経保護的に働くことが明らかになれば、そのメカニズムを解析することにより全く新しい創薬概念である「BBB 保護薬」の開発につながると考えられる。これは脳梗塞治療薬としての側面だけでなく、脳血管認知症予防、アルツハイマー型認知症予防といった中枢神経系疾患全体にインパクトを持つ薬剤の開発につながると期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞、in vitro BBB (血液脳関門) モデル

##### ・in vitro BBB モデル

右図のように多孔質 (0.4 $\mu$ m、3.0 $\mu$ m 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する。作製するモデルは、液性因子のみの影響を受けるモデルと、初代培養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する。



#### (2) Rho kinase 阻害薬が BBB 機能へ与える影響、分子生物学的機序の解明

ラット初代培養脳毛細血管内皮細胞(RBEC)、ペリサイト、アストロサイトを用いた in vitro BBB モデルを作成し、正常酸素下または 6 時間 OGD/24 時間後再酸素化条件で評価を行った。In vitro BBB モデルは RBEC のみによる単培養モデル、RBEC、ペリサイト、アストロサイトを用いた共培養モデルの 2 種類を使用した。BBB 機能に対する fasudil の効果を検証するため、リアルタイムインピーダンス、経内皮電気抵抗 (TEER)、ナトリウムフルオレセイン(Na-F)透過性、およびウエスタンブロッティングを使用したタイトジャンクション(TJ)タンパク質発現を評価した。また、fasudil によって観察された BBB 機能の保護メカニズムを理解するために、BBB 形成細胞におけるシクロオキシゲナーゼ-2 とトロンボキサン A2 受容体アゴニスト U-46619 の役割を調査した

### 4. 研究成果

#### (1) fasudil の BBB 保護効果

RBEC に fasudil 0.3~30  $\mu$ M を添加すると、4 時間をピークとして 24 時間にわたりインピーダンスが増加した。また濃度依存的に TEER の上昇、Na-F 透過性の低下が認められた。

#### (2) fasudil による TJ タンパク発現の亢進

fasudil は、RBEC における TJ タンパク質クローニン-5 の発現を増加させた。OGD/再酸素化による BBB 機能障害と、fasudil による BBB 保護効果単培養モデル、共培養モデルのいずれにおいても OGD/R 後に TEER の低下、Na-F 透過性の亢進が確認された。これらの変化は単培養モデルよりも共培養モデルで顕著であった。両モデルにおいて、fasudil での処理によって TEER の低下、Na-F 透過性が有意に抑制された。免疫染色では、OGD/R 群では TJ 構造が破綻しているのが確認されたが、fasudil 処理群では TJ 構造の連続性が保たれていた。

#### (3) U-46619

トロンボキサン A2 アゴニストである U-46619 による処理では、単一培養モデルでは TEER に有意な変化は見られなかったが、共培養モデルでは TEER に有意な減少が見られた。fasudil は、共培養モデルで U-46619 によって誘発される TEER の減少を大幅に改善した。また免疫染色において、U-46619 により TJ 構造の破綻が認められたが、fasudil 処理群では TJ 構造の連続性が維持された。

本研究では fasudil の BBB 保護効果が実証された。fasudil は TJ タンパク質の発現を亢進することにより TJ 構造を維持、BBB の機能を向上させた。また fasudil は虚血再灌流によって引き起こされる損傷から BBB を保護することが確認された。この保護効果は内皮細胞のみの単培養モデルと、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトによる共培養モデルの両方で確認されたことから、fasudil が内皮細胞への直接的な作用と、ペリサイト、アストロサイトを介して内皮細胞へ間接的に作用する 2 つの経路で BBB 保護作用を有していることが示唆された。また OGD/R 条件で単培養モデルと比較して共培養モデルの方が BBB 機能低下が顕著であり、これはペリサイト、アストロサイトは BBB 保護的に機能することが従来報告されているが、虚血超急性期には内皮細胞あるいは BBB 障害的に作用する可能性を示唆している。U-46619 による処理では単培養モデルは影響を受けなかったのに対して、共培養モデルでは顕著に BBB 機能低下が認められた。また fasudil を同時に処理することにより BBB 機能低下が低減され、内皮細胞の構造も維持された。これはペリサイト、アストロサイトによる内皮細胞障害を来す経路が存在することと、fasudil によりこの内皮細胞障害が保護されることを示唆している。fasudil は急性期脳梗塞治療で最も重要な虚血後 8 時間以内をピークとして BBB 機能を改善した。またこの BBB 保護効果は既に実臨床で用いられている血中濃度レベルで濃度依存的に認められた。したがって、fasudil は急性期脳梗塞に対する BBB 保護剤として有用であり、かつ安全に使用することが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsunaga Yuki, Nakagawa Shinsuke, Morofuji Yoichi, Dohgu Shinya, Watanabe Daisuke, Horie Nobutaka, Izumo Tsuyoshi, Niwa Masami, Walter Fruzsina R., Santa-Maria Ana Raquel, Deli Maria A., Matsuo Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 MAP Kinase Pathways in Brain Endothelial Cells and Crosstalk with Pericytes and Astrocytes Mediate Contrast-Induced Blood-Brain Barrier Disruption	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsunaga Yuki, Morofuji Yoichi, Horie Nobutaka	4. 巻 138
2. 論文標題 Delayed Vasospasm Associated with Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 197 ~ 199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.03.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松永 裕希、林 健太郎、岡村 宗晃、林 之茂、白川 靖、岩永 充人、松尾 孝之	4. 巻 47
2. 論文標題 副中大脳動脈に関連した塞栓性脳梗塞に対して急性期血行再建術を施行した1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 1165 ~ 1171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumo Tsuyoshi, Okamura Kazuaki, Takahira Ryotaro, Matsunaga Yuki, Sadakata Eisaku, Maeda Hajime, Yamaguchi Susumu, Baba Shiro, Morofuji Yoichi, Hiu Takeshi, Horie Nobutaka, Anda Takeo, Kitagawa Naoki, Tokunaga Yoshiharu, Hayashi Kentaro, Matsumoto Yasushi, Nagata Izumi, Matsuo Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Impact of Pre-operative Embolization With Onyx for Brain Arteriovenous Malformation Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 875260-875260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2022.875260	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Michiharu, Hiu Takeshi, Baba Shiro, Morikawa Minoru, Horie Nobutaka, Ujifuku Kenta, Yoshida Koichi, Matsunaga Yuki, Niino Daisuke, Xie Ang, Izumo Tsuyoshi, Anda Takeo, Matsuo Takayuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Ruptured aneurysm induced pituitary apoplexy: illustrative case	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/CASE21169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iki Yusuke, Morofuji Yoichi, Ozono Keisuke, Matsunaga Yuki, Tsunoda Keishi, Matsuo Takayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Concurrent Ossification of the Posterior Atlantoaxial Interlaminar Membrane and Atlas Hypoplasia: A Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 147 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmccrj.cr.2019-0249	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morofuji Yoichi, Matsunaga Yuki, Izumo Tsuyoshi	4. 巻 138
2. 論文標題 Carotid Carotid Bypass for a Carotid Artery Aneurysm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 7 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.02.113	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Nobutaka, Shobayashi Kazuya, Morofuji Yoichi, Sadakata Eisaku, Iki Yusuke, Matsunaga Yuki, Kanamoto Tadashi, Tateishi Yohei, Izumo Tsuyoshi, Anda Takeo, Morikawa Minoru, Tsujino Akira, Matsuo Takayuki	4. 巻 132
2. 論文標題 Impact of Mechanical Thrombectomy Device on Thrombus Histology in Acute Embolic Stroke	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e418 ~ e422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.08.130	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yuki Matsunaga, Shinsuke Nakagawa, Yoichi Morofuji, Shinya Dohgu, Daisuke Watanabe, Nobutaka Horie, Tsuyoshi Izumo, Masami Niwa, Fruzsina R. Walter, Ana Raquel Santa-Maria, Maria A. Deli, Takayuki Matsuo
2. 発表標題 MAP kinase pathways in brain endothelial cells mediate contrast-induced blood-brain barrier disruption
3. 学会等名 4rd Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松永裕希, 中川慎介, 諸藤陽一, 堀江信貴, 出雲剛, 陶山一彦, 松尾孝之
2. 発表標題 MAP kinase経路とペリサイト、アストロサイトのクロストークが造影剤誘発性血液脳関門障害に関与する
3. 学会等名 第37回NPO法人日本脳神経血管内治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永裕希, 定方英作, 出雲剛, 堀江信貴, 案田岳夫, 白川靖, 陶山一彦, 松尾孝之
2. 発表標題 頸動脈狭窄を背景に持つTandem閉塞に対する急性期血行再建術の戦略と治療成績: Retrograde reperfusionを主体とした治療
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永裕希, 佐藤慧, 諸藤陽一, 中川慎介, 出雲剛, 堀江信貴, 案田岳夫, 松尾孝之
2. 発表標題 造影剤が与える血液脳関門に対する影響
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松永裕希、定方英作、出雲剛、堀江信貴、案田岳夫、松尾孝之
2. 発表標題 頸動脈狭窄を背景に持つTandem閉塞に対する急性期血行再建術の戦略と治療成績: Retrograde reperfusionを主体とした治療
3. 学会等名 第36回日本脳神経血管内治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Matsunaga, Yoichi Morofuji, Shinsuke Nakagawa, Nobutaka Horie, Tsuyoshi Izumo, Takeo Anda, Masami Niwa, Takayuki Matsuo
2. 発表標題 Contrast-induced blood-brain barrier disruption
3. 学会等名 3rd Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Matsunaga
2. 発表標題 A cell culture based model of the blood-brain barrier to study brain metastatic potential of cancer cells
3. 学会等名 2nd Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Matsunaga
2. 発表標題 A cell culture based model of the blood-brain barrier to study brain metastatic potential of cancer cells
3. 学会等名 3rd joint symposium between Nagasaki University and Wurzburg university (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Yuki Matsunaga
2. 発表標題 Parent artery Occlusion for traumatic vertebral artery injury
3. 学会等名 The 15th congress of the World Federation of Interventional Therapeutic Neuroradiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中川 慎介 (Nakagawa Shinsuke)  (10404211)	福岡大学・薬学部・准教授  (37111)	
研究分担者	諸藤 陽一 (Morofuji Yoichi)  (40437869)	長崎大学・病院(医学系)・講師  (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------