

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790127
 研究課題名 (和文) 血液脳関門プロスタグランディン輸送と薬剤誘発性血管障害機構の解明
 研究課題名 (英文) Involvement of prostaglandin transport system at the blood-brain barrier in the drug-induced vascular disorder in the brain.

研究代表者
 伊藤 慎悟 (ITO SHINGO)
 東北大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：20466535

研究成果の概要 (和文)：

脳内prostaglandin E2 (PGE2) は消失半減期12分で血液脳関門 (BBB) を介して脳から循環血液中へ排出された。一方、PGE2は脳毛細血管内皮細胞増殖を促進させた。PGE2輸送を阻害するNSAIDsであるindomethacinおよびdiclofenacは脳毛細血管細胞増殖を低下させ、PGE2はそれを見かけ上抑制させた。以上の結果から、脳内PGE2クリアランスにBBBを介した排出輸送が関与すること、PGE2濃度の増加は脳毛細血管新生を促進させること並びにNSAIDsによるPGE2排出輸送阻害は脳毛細血管障害を悪化させる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Using Brain Efflux Index method, prostaglandin E2 (PGE2) was eliminated from mouse brain with a half-life of 12 minutes. By contrast, PGE2 increased brain capillary endothelial cell proliferation and slightly recovered from NSAIDs mediated cytotoxicity. These results demonstrate that BBB efflux transport system is involved in the PGE2 clearance in mouse brain and suggest that PGE2 stimulate vascularization and remodeling of brain capillary endothelial cells and NSAIDs itself exert significantly cytotoxicity against brain capillary endothelial cells. Therefore, NSAIDs mediated reduction of PGE2 clearance and cytotoxicity against brain capillary endothelial cells may cause severe angiopathy in brain inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：薬物動態学, 血液脳関門, プロスタグランディン E2, 薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ脳炎・脳症を発症した患者では、NSAIDs である diclofenac の投与によって死亡率が上昇し、死亡例では脳血管の障害が顕著に認められることが報告されている。Prostaglandin E2 (PGE2) は炎症時に産生量が増加し、炎症、発熱、血管透過性亢進などの血管内皮細胞に対する障害を亢進させることが知られる。脳内には PGE2 分解酵素が存在しないことが報告されていることから、血液脳関門 (BBB) を介した脳から血液方向への排出輸送が脳内 PGE2 クリアランスに大きく関与すると考えられた。BBB には PGE2 輸送に関与する MRP4 などのトランスポーターが発現しており、さらに、NSAIDs はこれらトランスポーターの基質または阻害剤になることが報告されていた。以上の知見から、PGE2 は BBB を介して脳から血液方向へ排出され、その排出輸送に MRP4 が関与する」さらに「NSAIDs が MRP4 による PGE2 排出輸送を阻害した結果、脳毛細血管内皮細胞及び脳内の PGE2 レベルが上昇し、脳血管障害を誘発する」仮説を構築した。

2. 研究の目的

本研究は、「PGE2 の脳から血液方向への排出輸送に関与する血液脳関門排出輸送分子機構を解明し、NSAIDs による阻害効果を介した薬剤誘導性脳血管障害の分子機構を解明すること」を明らかにすることを目的として、(1) PGE2 の脳内から血液方向への BBB 排出輸送特性 (2) NSAIDs による BBB を介した PGE2 排出輸送阻害に基づく血管障害の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Brain Efflux Index 法を用いた in vivo PGE2 排出輸送解析を行い、BBB を介した PGE2 排出輸送特性を解析する。
(2) In vitro 脳毛細血管内皮細胞モデル細胞 (以下 TM-BBB 細胞) と高効率でかつ細胞毒性が小さい siRNA 導入法を用いて、BBB における主要な PGE2 輸送分子を同定する。
(3) TM-BBB 細胞に PGE2 および NSAIDs を処理し、細胞増殖の変化を測定することで、脳毛細血管内皮細胞に対する PGE2 および NSAIDs の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) In vivo BBB を介した脳から血液中への PGE2 排出輸送を Brain Efflux Index 法を用いて解析したところ、マウス脳に投与された [³H]PGE2 は少なくとも投与後 60 分まで経時的に脳から消失し、その消失半減期は 12 分と算出された (図 1)。一方、反投与側大脳、小脳および脳脊髄液からは投与した [³H]PGE2 の 0.5% 以下しか検出されなかった。従って、[³H]PGE2 は BBB を介してマウス脳から消失することが示唆された。

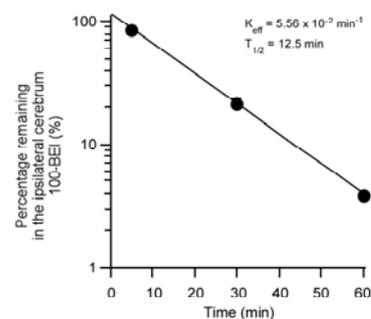


図1 [³H]PGE2をマウス大脳皮質に投与後の時間に対する脳内残存率のプロット
([³H]PGE2は消失半減期12分で脳内から循環血液中に排出輸送されることが示唆された。)

(2) TM-BBB 細胞における siRNA 導入効率の検討

BBB における詳細な PGE2 排出輸送分子を同定するには BBB の実体である脳毛細血管内皮細胞の in vivo 特性を反映したモデル細胞 (TM-BBB 細胞) を用いるのが有用である。そこで PGE2 排出輸送分子候補である MRP4 の細胞膜におけるタンパク質発現を Western blot 法を用いて検討した。TM-BBB 細胞の細胞膜は Surface biotinylation 法を用いて回収した。Surface biotinylation 処理によって回収された sample から抗 MRP4 抗体によってバンドが検出された (図 2)。一方、本処理を行っていない sample からはバンドは検出されなかった。MRP4 と同様に、細胞膜に発現することが知られている Na⁺-K⁺ ATPase は Surface biotinylation 処理サンプルからのみ検出された (図 2)。以上の結果から、MRP4 は TM-BBB4 細胞の細胞膜に発現していることが示唆された。

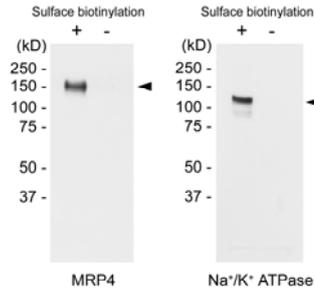


図2 TM-BBB4細胞の細胞膜におけるMRP4タンパク質発現 (Surface biotinylation処理したsampleからのみMRP4由来のバンドが検出されたことから、MRP4がTM-BBB4細胞の細胞膜に発現していることが示唆された。)

(3) TM-BBB 細胞への siRNA 導入法の確立

TM-BBB 細胞への高効率 siRNA 導入法を確立するために、内因性タンパク質である GAPDH 活性を指標に TM-BBB 細胞に対する siRNA 導入法を検討した。その結果、5 nM の化学修飾 siRNA と 0.25 μ L RNAiMAX (liposome) を用いることによって TM-BBB 細胞における GAPDH 活性を最大 60% 抑制させることができ (図 3)、本条件が最も高効率でかつ細胞毒性の小さい siRNA 導入条件であることが分かった。以上の結果から、TM-BBB 細胞への siRNA 導入法を確立した。

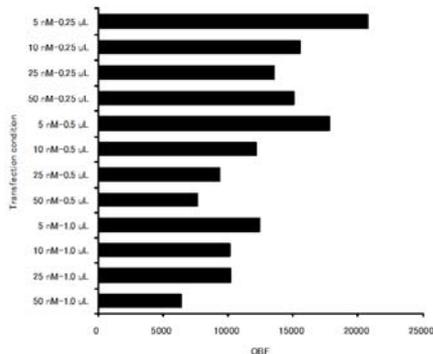


図3 TM-BBB4細胞におけるsiRNA導入効率の検討 (GAPDH siRNA処理によるGAPDH活性の低下率からTM-BBB4細胞へのsiRNA導入効率を検討し、siRNA 5 nM, RNAiMAX 0.25 μ L /wellが最もsiRNA導入効率が高いことが示唆された。)

(4) TM-BBB4 細胞における PGE2 受容体発現解析

炎症時などに大量に産生された PGE2 が脳毛細血管に傷害を与え、これが BBB 崩壊につながるということが考えられた。PGE2 は PGE2 受容体 (EP) を介して作用を示し、これまでに EP1 から EP4 まで報告されている。そこで RT-PCR 法を用いてそれらの発現を検討したところ、TM-BBB4 細胞において EP-1 および EP-4 mRNA 発現が確認された (図 4)。

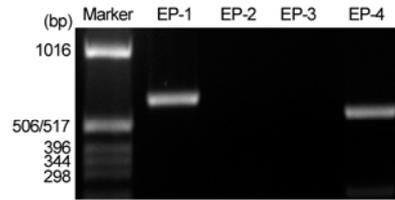


図4 TM-BBB4細胞におけるEP発現解析 (TM-BBB4細胞にはEP-1およびEP-4 mRNAが発現していることが示唆された。)

(5) TM-BBB4 細胞の細胞増殖に対する PGE2 の影響

PGE2 が脳毛細血管内皮細胞に対して細胞毒性を示すかを検討するために、PGE2 が TM-BBB4 細胞の細胞増殖に与える影響を検討した。その結果、PGE2 処理後 24 時間において TM-BBB4 細胞の細胞増殖は PGE2 濃度増加によって増加した (図 5)。処理後 48 時間および 72 時間では、24 時間処理に比べて細胞増殖速度は低下した (図 5)。従って、PGE2 は脳毛細血管内皮細胞の細胞増殖を促進させることが示唆された。

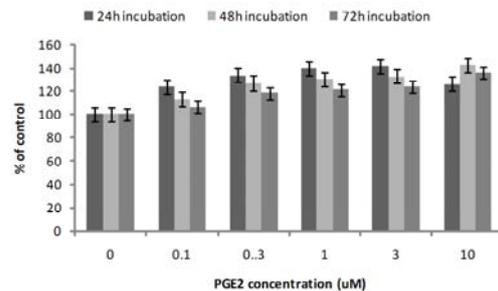


図5 PGE2がTM-BBB4細胞の細胞増殖に与える影響 (処理24時間後においてPGE2濃度依存的にTM-BBB4細胞の細胞増殖速度は増加し、48および72時間後において増殖増加作用が低下することが示唆された。)

(6) TM-BBB4 細胞の細胞増殖に対する PGE2 および NSAIDs の影響

NSAIDs は MRP4 に対する阻害剤である indomethacin と diclofenac を検討した。PGE2 と indomethacin 同時処理時においては 72 時間後に細胞増殖抑制効果が観察され、PGE2 と diclofenac 同時処理時においては 24 時間後から時間依存的に細胞増殖抑制効果が観察された (図 6)。一方、indomethacin および diclofenac 単独処理時における細胞増殖抑制効果は PGE2 存在下よりも大きい傾向にあった (図 6)。以上の結果から、NSAIDs が脳毛細血管内皮細胞に対して細胞毒性を示し、PGE2 は NSAIDs による細胞増殖抑制効果を減少させることが示唆された (図 6)。

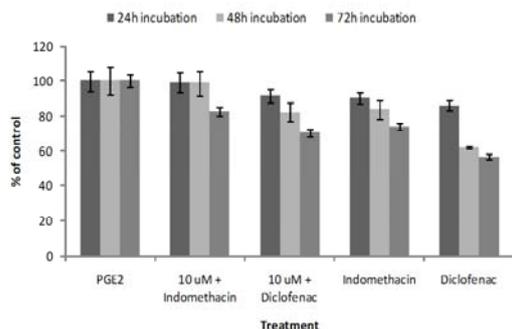


図6 PGE2とNSAIDsがTM-BBB4細胞の細胞増殖に与える影響 (PGE2はindomethacinおよびdiclofenacによる細胞増殖速度の低下を抑制させること並びにindomethacinおよびdiclofenacはTM-BBB4細胞の細胞増殖を抑制させることが示唆された。)

(7) 考察・結論・展望

脳内 PGE2 は BBB を介して速やかに脳から循環血液中へ排出されたことから、脳内 PGE2 クリアランスに BBB を介した排出輸送が関与することが示唆された。脳内には PGE2 代謝酵素が発現していないことが報告されていることから、この排出輸送機構は脳内 PGE2 濃度の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、PGE2 は脳毛細血管内皮細胞の増殖を促進させたことから、PGE2 は脳毛細血管内皮細胞の EP-1 および EP-4 を刺激して血管新生を促進させることが推察された。血管新生によって血管の機能は低下することから、PGE2 濃度の増加が BBB の機能異常を促進させることが考えられる。PGE2 輸送を阻害する NSAIDs である indomethacin および diclofenac は脳毛細血管細胞に対して細胞毒性を示し、PGE2 はそれを抑制させた。これは PGE2 による脳毛細血管内皮細胞増殖効果と NSAIDs による抑制効果が同時に起こったために、見かけ上、PGE2 が NSAIDs による細胞毒性を減少させたように観察されたと考えられる。従って、NSAIDs による BBB における PGE2 排出輸送阻害は NSAIDs による細胞毒性と PGE2 による血管新生促進によってより強い脳毛細血管障害が引き起こされる可能性があることが推察された。以上の結果から、脳内炎症においては MRP4 を阻害しない NSAIDs を投与し、また、PGE2 を正常レベルに維持することが脳毛細血管障害を抑制するためには必要だと考えられる。

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 1 件)

Shin-ichi Akanuma, Ken-ichi Hosoya, Shingo Ito, Masanori Tachikawa, Tetsuya Terasaki, Sumio Ohtsuki

Involvement of multidrug resistance-associated protein 4 in efflux transport of prostaglandin E₂ across mouse blood-brain barrier and its inhibition by intravenous administration of cephalosporins
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2010 E-Pub (査読有り)

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 慎悟 (ITO SHINGO)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20466535

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：