

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：87301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591848

研究課題名（和文） スタチンが血液脳関門に与える影響

研究課題名（英文） Effect of statins on the blood-brain barrier

研究代表者

諸藤 陽一（MOROFUJI YOICHI）

独立行政法人国立病院機構・長崎医療センター・臨床研究センター・客員研究員

研究者番号：40437869

研究成果の概要（和文）：

ピタバスタチンが脳血管内皮細胞においてクラウディン-5 の発現を介して血液脳関門機能を強化していることが判明した。その機序として、メバロン酸カスケードの中間代謝産物であるイソプレノイド群が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今回の実験で使用したピタバスタチンの濃度は臨床上、ヒトで得られる血中濃度と同等であり、今後スタチンが様々な中枢神経系疾患の治療へ応用される可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the effect of pitavastatin on barrier functions of an in vitro BBB model with primary cultures of rat brain capillary endothelial cells (RBEC). Our data indicate that pitavastatin strengthens the barrier integrity in primary cultures of RBEC. The BBB-stabilizing effect of pitavastatin may be mediated partly through inhibition of the mevalonate pathway and subsequent up-regulation of claudin-5 expression.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：スタチン、血液脳関門、タイトジャンクション、脳卒中

1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患における大規模臨床試験を詳細に検討した結果、スタチンのコレステロール低下作用のみでは説明できない心血管保護作用があることが近年明らかになりつつ

ある。また、脳卒中においてもこれまでの観察研究では、必ずしもコレステロール値が低いほど脳卒中死が少ないという直線的な関係は示されていない。そのため、スタチンに

はコレステロール低下効果だけでなく、直接的な神経保護作用が存在する可能性がある。基礎的研究からも、スタチンには本来のコレステロール低下作用だけでなく、血管内皮機能改善作用、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 (Nat Med, 2002)。

近年、スタチンが血管内皮細胞において eNOS (endothelial nitric oxide synthase) を誘導し、内皮機能を改善することが報告された (Atherosclerosis, 2001)。pleiotropic effects の分子機序としては、PI3K/Akt 経路の活性化とイソプレノイド産生低下による低分子量 GTP 結合タンパク質の活性制御などが注目されている。しかしながら、スタチンの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。そこで我々はスタチンが血液脳関門 (BBB) に与える影響を *in vitro* の実験系で検討することとした。

2. 研究の目的

独自に開発している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 に与える影響及びその作用機序について研究を行う。

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用いて *in vitro* BBB モデルを作成し、スタチンが BBB への影響を検討した。BBB 機能の評価は経内皮細胞電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance; TEER) 値測定及び透過性試験にて行った。さらに免疫染色、Real-time PCR 法にて、claudi-5, occludin, ZO-1 など重要な tight junction proteins の

発現、遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

ピタバスタチン投与により、経内皮電気抵抗 (TEER) は有意に上昇し、その効果は 10^{-8} M で最大となった。ピタバスタチン投与群では、蛍光免疫染色にてクラウディン-5 は細胞膜上に強く発現しており、ウェスタンブロッティングでもその蛋白量レベルは有意に上昇していた。しかし、クラウディン-5 の mRNA レベルに変化は認めなかった。ピタバスタチン投与による TEER 上昇は、GGPP を添加することで消失したが、FPP 投与では消失しなかった。今回の結果より、ピタバスタチンが脳血管内皮細胞においてクラウディン-5 の発現を介して BBB 機能を強化していることが明らかとなった。その機序として、メバロン酸カスケードの中間代謝産物であるイソプレノイド群の中でも GGPP が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

更に内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを共培養した *in vitro* BBB モデルを作製し、advanced glycation end products (AGE) を投与し糖尿病の病態を再現することで内皮細胞障害を評価した。虚血再灌流後の経内皮電気抵抗は AGE 群 (400 μ g/ml) ではコントロール群に比べ 6 時間後に 40%、24 時間後では 30% の低下を示した。この結果を国際学会にて発表した。現在、*in vitro* BBB モデルを用いて虚血負荷、高血糖負荷など様々な病態モデルを作製し、脳卒中治療に有益な薬剤の検索を継続して行っている。

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 8 件)

① 頸動脈血行再建術における術前血小板凝集能測定の有用性 No Shinkei Geka. 2011 May;39(5):459-63.

諸藤 陽一、宗 剛平、日宇健、川久保潤一、林健太郎、北川直毅、森川実、陶山一彦、永田泉

② 進行する脊髄症を呈したテント部硬膜動静脈瘻の一例

竹下 朝規、宗 剛平、諸藤 陽一、堀江信貴、林 健太郎、北川 直毅、陶山 一彦、永田 泉

Brain and Nerve、63・6・P611-615、2011

③ 破裂急性期にバルーン閉塞試験を行い母血管閉塞が可能であった錐体部巨大内頸動脈瘤破裂の1例

竹下朝規、堀江信貴、宗剛平、氏福健太、林健太郎、森川実、陶山一彦、永田泉

No Shinkei Geka, 40 (1) P61-66, 2012

④ Pitavastatin Strengthens the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells.

Morofuji Y, Nakagawa S, So G, Hiu T, Horai S, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Niwa M:

Cell Mol Neurobiol 2010

Jul;30(5):727-35.

⑤ Significance of the T2*-weighted gradient echo brain imaging in patients with infective endocarditis

Yoichi Morofuji, Minoru Morikawa, Yohei Tateishi, Naoki Kitagawa, Kentaro Hayashi, Tomonori Takeshita, Kazuhiko Suyama, Izumi Nagata

Clinical Neurology and Neurosurgery,

2010 Jun;112(5):436-40

⑥ Recurrence of subarachnoid hemorrhage due to the rupture of cerebral aneurysms in a patient with Sjögren's syndrome. Case report.

Hayashi K, Morofuji Y, Suyama K, Nagata I. Neurol Med Chir (Tokyo) 2010;50(8):658-61.

⑦ 前大脳動脈解離性動脈瘤を合併した Rubinstein-Taybi 症候群の1例

石坂 俊輔、宗 剛平、諸藤 陽一、林健太郎、北川 直毅、立石 洋平、森川実、陶山 一彦、永田 泉

BRAIN and NERVE 62(10)1083-1088, 2010

⑧ 頸動脈ステント留置術でデバイスを用いた穿刺部止血後に総大腿動脈閉塞をきたした1例

林 健太郎、森川 実、堀江 信貴、諸藤 陽一、宗 剛平、陶山 一彦、永田 泉
BRAIN and NERVE 62(2)173-176, 2010

[学会発表] (計 10件)

①Cilostazol rescues AGE-related ischemic BBB damage

Tomonori Takeshita他12名

14th Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers (Sep 18, 2011, Istanbul, Turkey)

② The Effects of Statins on Blood-Brain Barrier -Possibility of therapeutic option for stroke- (oral presentation)
Y. Morofuji, S. Nakagawa, S. Horai, G. So, K. Tsutsumi, H. Baba, K. Suyama, I. Nagata, M. Niwa

3rd International Conference on Hypertension, Lipids, Diabetes and Stroke Prevention (March 4-6, 2010, Berlin, Germany)

③ スタチンが血液脳関門に与える影響

諸藤 陽一、中川 慎介、宗 剛平、林 健太郎、陶山 一彦、永田 泉、丹羽 正美
第 35 回脳卒中学会総会 (2010. 4. 15-17, 岩手)

④ 脳神経外科手術における抗血小板薬の評価-血小板凝集能測定の有用性- (シンポジウム)

諸藤 陽一、宗 剛平、堀江信貴、林 健太郎、陶山 一彦、永田 泉
第 39 回脳卒中の外科学会総会 (2010. 4. 15-17, 岩手)

⑤ くも膜下出血後早期のウロキナーゼ脳槽洗浄が続発性正常圧水頭症に与える影響

諸藤 陽一、堤 圭介、高嶋 英昭、平尾朋仁、戸田 啓介、馬場 啓至、米倉 正大
第 39 回脳卒中の外科学会総会 (2010. 4. 15-17, 岩手)

⑥ 脳動脈瘤クリッピング術後に Orbital Infarction Syndrome をきたしたと考えられる 2 症例

諸藤 陽一、堤 圭介、高嶋 英昭、平尾朋仁、川原 一郎、戸田 啓介、馬場 啓至、米倉 正大
第 105 回日本脳神経外科学会九州支部会、2010 年 6 月 26 日、長崎

⑦ STA-MCA 吻合術後に進行した外頸動脈起始部狭窄症に対しステント留置術を行った症例

諸藤 陽一、高嶋 英昭、川原 一郎、戸田 啓介、堤 圭介、馬場 啓至、米倉 正大
第 106 回日本脳神経外科学会九州支部会、2010 年 9 月 25 日、宮崎

⑧ Preoperative Platelet Aggregation

Predicts Periprocedural Complications in Neuroendovascular Surgery

Yoichi Morofuji, Gohei So, Takeshi Hiu, Junichi Kawakubo, Nobutaka Horie, Kentaro Hayashi, Hideaki Takahata, Naoki Kitagawa, Kazuhiko Suyama, Izumi Nagata
The 10th Korean and Japanese Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke
Huis Ten Bosch, Sasebo, Nagasaki, Japan, October 8-9, 2010

⑨ 脳血管内治療における抗血小板療法の評価-血小板凝集能測定の有用性- (シンポジウム)

諸藤陽一、宗 剛平、堀江信貴、林健太郎、川久保潤一、高嶋英昭、堤 圭介、北川直毅、陶山一彦、永田 泉
第 69 回日本脳神経外科学会総会 (2010. 10. 27-29, 福岡)

⑩ 脳血管内治療における抗血小板療法の評価-血小板凝集能測定の有用性- (シンポジウム)

諸藤陽一、宗 剛平、堀江信貴、林健太郎、高嶋英昭、堤 圭介、北川直毅、陶山一彦、永田 泉
第 26 回日本脳神経血管内治療学会 (2009. 11. 19-21, 北九州)

〔その他〕

Medical Tribune (2010年5月27日号、p.26)

新技術により確実な手術を実現

術前凝集能測定で周術期合併症を予防

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸藤 陽一 (MOROFUJI YOICHI)

独立行政法人 国立病院機構・長崎医療
センター・臨床研究センター・客員研究
員

研究者番号：40437869

(2) 研究分担者

林 健太郎 (HAYASHI KENTARO)

長崎大学・医学部歯学部付属病院・
助教

研究者番号：40404222

宗 剛平 (SO GOHEI)

長崎大学・医学部歯学部付属病院・
医員

研究者番号：80530427

高島 英昭 (TAKAHATA HIDEAKI)

独立行政法人 国立病院機構・長崎医療
センター・脳神経外科・医師

研究者番号：80607854

竹下 朝規 (TAKESHITA TOMONORI)

長崎大学・医学部歯学部付属病院・医員

研究者番号：30597365