

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 5月24日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790177

研究課題名（和文）

慢性閉塞性肺疾患の血液脳関門病態－吸入抗コリン薬の中枢性副作用対策の構築－

研究課題名（英文）

Blood brain barrier state of a disease the chronic obstructive pulmonary disease
－ Central side effect measures of the inhalational anti-cholinergic drugs

研究代表者

富永 宏治 (TOMINAGA KOJI)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10509623

研究成果の概要（和文）：

慢性閉塞性肺疾患（COPD）病態下における血液脳関門（BBB）機能の変化と抗コリン薬の中枢移行性について検討した。その結果、COPDモデルマウスにおいてBBBのタイトジャンクション機能が低下すること、それにより抗コリン薬が脳内へ移行する可能性が示された。このことからCOPD病態下では、BBB機能低下により薬物の脳内移行が促進し、認知機能障害などの中枢性副作用が発現し易くなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We examined a change of the blood-brain barrier (BBB) function and the central nerve transition of the anticholinergic drugs in the chronic obstructive pulmonary disease (COPD). As result, in COPD model mouse, tight junction function of the BBB was decreased, and there is possibility that the intracerebral transmissiveness of the anticholinergic drug were aggravated. Therefore, in COPD, the brain internal transmigration of drugs are accelerated by BBB disfunction, and it was thought that expression of the central side effects such as cognitive function disorders are easy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学、COPD、BBB、中枢性副作用、炎症

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は有毒粒子・ガス (タバコ、大気汚染など) の吸入によって生じた肺の炎症反応に基づく進行性の呼吸障害疾患である。欧米での有病率は 6%前後とされ、3 大死因に匹敵する死亡率となる可能性が指摘されている。日本での有病率は 8.5%で、40 歳以降に多く、加齢に伴い増加する。COPD では肺組織以外の循環血中の炎症性刺激因子(TNF- α 、IL-8、IL-6)が上昇する。このため、COPD は肺に限局した疾患ではなく、全身性の慢性炎症性疾患と考えられ、最近、COPD 患者において認知機能が低下することが報告された (Am J Respir Crit Care Med. 2009)。脳組織は脳血管内皮細胞を実体とした血液脳関門(BBB) という環境整備機構により、末梢の病的変化の影響から保護されているにもかかわらず、COPD 患者では脳血管障害や中枢神経障害が発症し易いことから、COPD 患者の BBB 機能異常が推測される。COPD は根治を期待できない疾患とされていたが、近年の COPD 患者を対象とした薬剤介入大規模臨床試験により、「予防と治療が可能な疾患」として位置づけられるようになった。その背景には、気管支拡張薬である抗コリン薬の長時間作用型製剤の使用が大きく寄与している。吸入抗コリン薬は COPD の第一選択薬として繁用されているが、抗コリン薬は薬剤性認知機能障害を惹き起こす原因薬剤であり、特に BBB 機能が低下する高齢者が継続使用すれば認知機能の低下がさらに増悪するとの報告がある (BMJ. 2006)。しかし、吸入抗コリン薬服用 COPD 患者の認知機能障害が発現・進展する過程において BBB 脆弱化や抗コリン薬の脳移行性変化がどのように関与するかについては不明である。大規模 COPD 患者群の現状と高齢化による将来的増大を考慮すれば、COPD に伴う BBB 機能変容の解明は、病態依存的な薬物脳移行に基づく副作用発現の予測・回避に必要不可欠である。

本研究者の所属する研究チームでは、これまでに (1) 炎症病態下でのリポポリサッカライド (LPS) によって誘導される炎症病態下において、BBB 機能障害に付随して BBB を構成する脳ペリサイトが脳毛細血管から脱落することを明らかにした (Cell. Mol. Neurobiol. 2009)。また、(2) 脳ペリサイトは LPS 刺激にตอบสนองし、サイトカインや MCP-1 および IL-8 のケモカインを産生することを明らかにした (投稿準備中)。さらに、

(3) 脳ペリサイトは TNF- α にตอบสนองして MMP-9 を産生する (申請者ら予備データ)。そこで、本研究者は COPD 患者の循環血中のケモカイン (IL-8 など) や TNF- α の増加に

対する BBB 構成細胞間の応答が BBB 機能脆弱化の鍵となると考え、COPD 患者では、血中炎症性刺激因子の長期慢性的な BBB 暴露により脳ペリサイトが最初に病変化する。病変化した脳ペリサイトは、①MMP 産生を増大・放出し、②ケモカイン刺激により脳血管内皮細胞から脱離し遊走する。その結果、BBB 機能低下をきたす。という独自の仮説を立てた。

以上、本申請者は「COPD 患者の循環血中の炎症性刺激因子が脳ペリサイト病変化を誘発し、BBB 機能を脆弱化する」さらに「COPD 患者における BBB 脆弱化は抗コリン薬の脳移行性を増大させ、認知機能障害の危険因子となる」という仮説を提起する。

2. 研究の目的

- (1) COPD 病態下における BBB 機能障害
- (2) COPD 病態下での脳ペリサイトの機能的・形態学的変化及びこれに伴う脳血管内皮細胞機能の変化。
- (3) COPD 病態下における抗コリン薬の脳透過性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) COPD モデルマウスの作製：①エラスターゼ誘発 COPD マウス：マウスに、エラスターゼ 30 μ g を気管内注入し、3 週間放置し、COPD モデルを作製する。気管支肺胞洗浄液 (BALF) のリンパ球および好中球数の増加、組織学的観察による平均肺胞間距離の増加、を確認し COPD モデルとする。②LPS 誘発 COPD マウス：エラスターゼ COPD モデルは作製完了までに時間を要するため、短期間で作製可能な LPS の気管内暴露法を用いて予備実験を行う。モデルの評価は、エラスターゼ誘発 COPD モデルと同様とする。

(2) COPD マウスにおける BBB 機能変化の評価：BBB では脳血管内皮細胞間隙のタイトジャンクションにより物質の移行が制限されている。タイトジャンクション機能を評価するために、in situ 脳灌流法を用い、フルオレセインナトリウム (NaF) およびエバンスブルー (EB) の脳移行量を測定し、COPD 病態下における BBB 機能変化を検討する。タイトジャンクション関連蛋白質 (claudin-5, occludin, ZO-1) の発現量の変化を western blotting 法を用いて解析する。

(3) COPD の治療に繁用されている抗コリン薬のチオトロピウムは第 4 級アンモニウム化合物であり、脳へ移行しない。そこで、COPD

マウスにおいて、in situ 脳灌流法により同じ抗コリン薬で4級アンモニウム化合物である3Hラベル化N-メチルスコポラミンの脳移行量を測定し、COPD病態下における抗コリン薬の脳透過性変化を検討した。

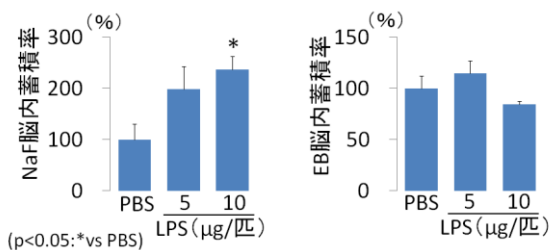
4. 研究成果

(1) COPDモデル形成の可否

①LPS (5, 10 μ g/匹) 気管内投与24時間後にBALF中の炎症性細胞および平均肺胞間距離について検討した。その結果、炎症性細胞は濃度依存的に増加し、平均肺胞間距離も増大した。②エラスターゼ 3 μ g/匹を気管内投与3週間後の炎症性細胞および平均肺胞間距離について検討した。その結果、LPS投与モデルと同様の結果を得た。これらの結果は、臨床におけるCOPDの肺組織像、BALF検査結果と類似しており、このモデルはCOPDモデルとして有用であることが判った。

(2) COPDモデルマウスにおけるBBB機能変化

①LPS (5, 10 μ g/匹) 気管内投与24時間後にin situ脳灌流法によりNaFおよびEB脳移行量を検討したところ、NaFはLPS濃度依存的に移行量が増加した。一方、EBでは変化が認められなかった。さらに、LPS 7 μ g/匹において時間経過を検討したところ、LPS投与7日目ではNaF移行量の増加は認められなかった。

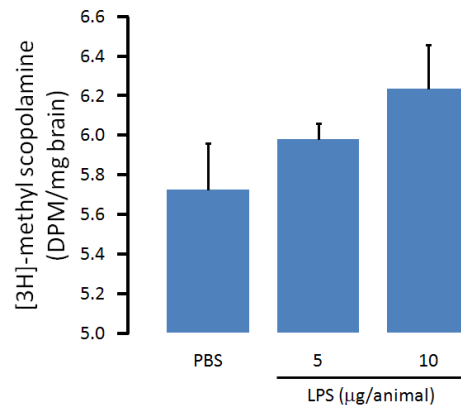


②エラスターゼ 3 μ g/匹を気管内投与3週間後においてNaFの脳移行量は優位に増加した。一方、EBでは変化が認められなかった。LPS投与7日後でNaF移行量が回復したことから急性の炎症では一過性にBBB機能が低下することが示唆された。一方、エラスターゼでは3週でも脳透過性が増加しており、LPSとは異なる。これはエラスターゼにより慢性的に炎症が起きている事が考えられる。EBの移行量は全ての検討において変化が認められなかった。このことからCOPDではBBBを構成する細胞の欠落は起きていないことが推察される。よってBBBを構成する細胞間隙のタイトジャンクション機能が低下する

ことが示唆された。これはCOPDという末梢での疾患が中枢神経障害を引き起こす事を示すものとして注目すべきデータである。BBBへ影響を及ぼす機序についてはいくつか考えられるため、今後さらにBBB構成細胞の炎症性液性因子への応答、タイトジャンクション構成タンパクの変化を検討することにより、中枢性副作用発現のメカニズムが明らかにしたい。さらに、それらのメカニズムの時間経過による変化について検討することで、副作用発現の危険性に治療開始時期や、治療期間などどのような要因があるか検討を行う必要があると考える。

(3) 抗コリン薬の脳透過性

①LPS (5, 10 μ g/匹) 気管内投与24時間後にin situ脳灌流法により[3H]-メチルスコポラミンの脳透過性を検討したところ、LPS濃度依存的に透過量の増加傾向が認められた。



②同様にエラスターゼ 3 μ g/匹を気管内投与3週間後において[3H]-メチルスコポラミン透過量の増加傾向が認められた。

この結果より、COPDモデルマウスにおいて、抗コリン薬の脳透過性が亢進する可能性が示された。

今回の検討では単一時間での検討であるが、COPDの治療では抗コリン薬を長期に継続使用することから、抗コリン薬の中枢性副作用である認知障害が起きる可能性が高いと考えられる。今後は他の抗コリン薬での検討の他、抗コリン薬の気管内投与による検討などより臨床に近い条件下での検討を行う事で中枢性副作用防止の為のエビデンスを提供できると考える。

以上、COPDモデルマウスにおいてタイトジャンクション機能低下によりBBBは脆弱化し、抗コリン薬の中枢性副作用発現の可能性が示唆された。

以上の結果については、現在論文投稿準備中である。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 宏治 (TOMINAGA KOJI)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10509623

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：