

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790258

研究課題名(和文) 実験的脳虚血病態における血液脳関門(BBB)構成細胞の相互作用解析

研究課題名(英文) Interaction analysis of the blood-brain barrier (BBB) constitution cell in the experimental cerebral ischemia model

研究代表者

中川 慎介(Nakagawa, Shinsuke)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：10404211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：血液脳関門(Blood-brain barrier, BBB)は、脳毛細血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトの相互作用によって機能が維持されており、その機能不全は神経細胞障害の惹起と増悪に関与していると考えられる。病態時において、BBBの機能維持(BBB保護)は、脳保護(神経細胞保護)に繋がると考えられる。

本研究では、虚血と高血糖に起因するBBB障害モデルの作製に成功した。更に、高血糖時の虚血再還流障害にはBBB構成細胞から産生されるTGF- $\beta$ が関与することが判明した。また、シロスタゾールがBBB機能障害を軽減することを発見し、BBB保護薬としての可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The blood-brain barrier (BBB), a member of the neurovascular unit (NVU), functions in communication between brain capillary endothelium and other neighboring cells such as astrocytes and pericytes. BBB dysfunction plays a crucial role in brain edema formation and central nervous system disorders. Therefore, the experimental BBB dysfunction models under the pathological condition are applicable to search the protective agents against BBB dysfunction.

We have developed and characterized a new in vitro BBB model (BBB Kit) using primary cultures of the three main BBB-related cells obtained from rat brains. We attempted to make three types of BBB dysfunction models and succeeded in making following models: (i) hypoxia/reoxygenation model, (ii) hyperglycemia model, (iii) AGE-related ischemia model. We found that cilostazol protected the BBB against AGE-related ischemia, through an inhibitory mechanism on TGF- $\beta$  signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：血液脳関門 虚血再還流 高血糖 トランスフォーミング増殖因子- シロスタゾール

1. 研究開始当初の背景

(1) 血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) の機能的な構築には基本構成単位である脳毛細血管内皮細胞、アストロサイト及びペリサイト間の相互作用が不可欠である。この細胞間相互作用の変調は中枢神経疾患の発症と進展に関与する。虚血障害や高血糖による血管障害の発症基盤には、BBB 構成細胞間の相互作用が関与すると考えられるが、その詳細は検討されていなかった。

(2) 中枢神経疾患の発症または進展には BBB 機能障害が関与することが報告されており、BBB の機能障害を改善させる薬物 (BBB 保護薬) は、中枢神経疾患に対しても改善効果が期待できるが、BBB 保護薬の検討はあまり進んでいない。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、独自に開発した、3 種類の BBB 構成細胞を用いた in vitro BBB 再構成モデル (3 細胞系 BBB モデル) を用いて、脳血管障害時における BBB 構成細胞間の相互作用が BBB 機能制御にどのような役割を担うのかを解明することを目的とする。具体的な脳血管障害モデルとして、虚血再還流障害と、高血糖または高血糖により生成する後期糖化反応生成物 (AGE) 負荷を組み合わせた障害モデルで検討し、その相互作用因子の検討を行った。

(2) BBB 障害モデルを用いて、そのバリアー機能を指標として、障害を軽減できる薬物の検討を行った。また、BBB 障害を引起す相互作用因子に対する影響も合わせて検討した。

3. 研究の方法

(1) 初代培養細胞、in vitro BBB モデル  
Wistar ラットより、脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトを単離培養し Transwell® または Millicell® を用いて共培養し、in vitro BBB モデルとした。

(2) BBB 機能評価

EVOM 抵抗計 (Volt-Ohm resistance meter) を用いた、経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) 測定

sodium fluorescein (小分子 (376Da) の paracellular transport

Immunoblot, immunostaining 法にてタイトジャンクションタンパク (claudin-5, occluding, ZO-1) の発現解析。

(2) BBB 障害モデルの作製

脳虚血再還流 BBB モデルの作成

(a) Normoxia 群: 血清なしの DMEM (glucose 4.5g/L) に交換し、通常 (95% air-5% CO<sub>2</sub>) の培養環境で培養した。

(b) Hypoxia 群: 血清なしの DMEM (glucose

free) に交換し、酸素吸着剤 (Anaero Pack®) により低酸素負荷を行う。CO<sub>2</sub> インキュベーターで 3 ~ 6 時間インキュベートする。再還流は通常の培養液に交換する事で作製した。

高血糖負荷 BBB モデルの作成

グルコースを 0 ~ 55 mM で BBB モデルに負荷することで作製した。

後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproduct, AGE) と虚血を合わせたモデル

で示したの虚血モデルに BSA (bovine serum albumin) の後期糖化反応生成物である AGE-BSA を負荷することで作製した

4. 研究成果

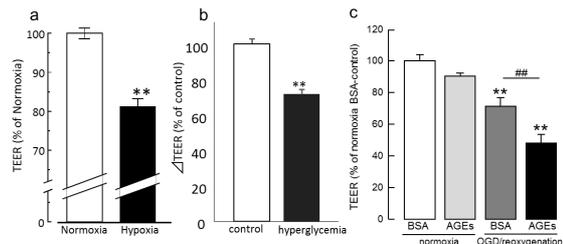
(1) BBB 障害モデルにおける BBB バリアー機能の低下

以下の ~ の BBB 障害モデルの作製に成功した。

BBB モデルに虚血再還流負荷を加えることで BBB 機能の指標である TEER の減少が観察された (図 1 a)、培養液に 55 mM のグルコースを加えることで TEER の減少が観察された (図 1 b)。

虚血 3 時間と AGE-BSA の共負荷により虚血のみの場合に比べ TEER の低下が増強された (図 1 c)。

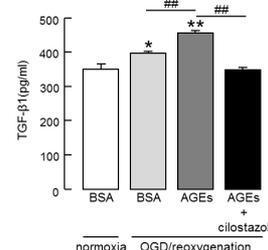
図1 In vitro BBB 障害モデルにおける BBB バリアー機能低下



(2) 虚血再還流と AGE-BSA の共負荷モデルにおける TGF-β の関与

虚血と AGE を組み合わせたモデルでは、BBB 機能の指標である TEER が減少したため、培養液中の液性因子が関与するかを検討した。

図2 In vitro BBB 障害モデルにおける TGF-β の関与



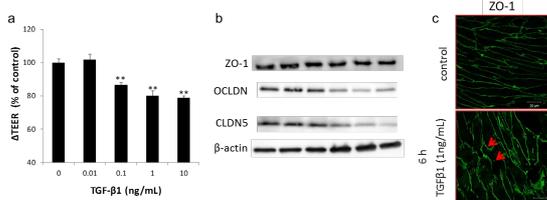
adrenomedullin (AM), nitrogen oxides (NOx),

reactive oxygen species (ROS) and transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )の産生を見たところ、TGF- $\beta$ の産生が増大していることが判明した(図2)。

### (3) TGF- $\beta$ のBBB機能への影響

TGF- $\beta$ は用量依存的にTEERを減少させた(図3a)。また、TGF- $\beta$ は、タイトジャンクションタンパク質の発現を減少させ(図3b)た。更に、蛍光免疫染色の観察から、TGF- $\beta$ により細胞間隙でのタイトジャンクションの発現に乱れが生じ、細胞形態が紡錘形から敷石状に変化した(図3c)。

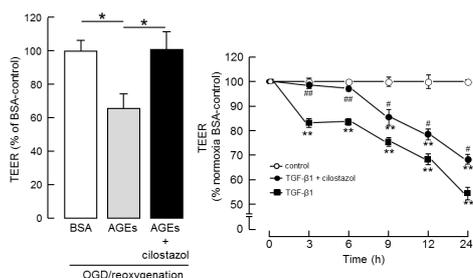
図3 TGF- $\beta$ がin vitro BBBモデルのBBBバリアー機能に与える影響



### (4) BBB障害モデルに対するシロスタゾールの保護作用

虚血とAGEの共負荷による、BBB機能障害はシロスタゾールにより改善することが判明した。シロスタゾールは、TGF- $\beta$ の産生抑制(図2)と、TGF- $\beta$ のシグナル阻害、TGF- $\beta$ シグナル非依存性の作用で改善効果を発揮していると考えられた(図4)。

図4 In vitro BBB障害モデルにおけるcilostazolの保護作用



以上の結果より、高血糖時の虚血再還流障害は、BBB構成細胞間のTGF- $\beta$ シグナルの亢進により、BBBのバリアー機能が低下するものと考えられた。また、この障害は抗血小板薬として臨床で用いられている、シロスタゾールにより改善することが判明した。

### 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7件)

1. Yamada N, Nakagawa S, Horai S, Tanaka K, Deli MA, Yatsunami H, Niwa M: Hepatocyte growth factor enhances the

barrier function in primary cultures of rat brain microvascular endothelial cells. *Microvascular Research* 92:41-49, 2014, 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2013.12.004>

2. Takeshita T, Nakagawa S, Tatsumi R, So G, Hayashi K, Tanaka K, Deli MA, Nagata I, Niwa M: Cilostazol attenuates ischemia-reperfusion-induced blood-brain barrier dysfunction enhanced by advanced glycation endproducts via transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* 60:1-9, 2014, 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2014.01.006>

3. 中川慎介, 丹羽正美: 血液脳関門(BBB)構成細胞の単離と in vitro BBBモデルの再構築. *日本薬理学雑誌* 143: 137-143, 2014, 査読無

4. 中川慎介, Mária A. Deli, Dinh Ha Duy Thuy, 相良真由美, 田中邦彦, 丹羽正美: 血液脳関門 in vitro 再構成モデル(BBBキット)と機能解明への活用. *脳循環代謝* 24, 71~74, 2013, 査読無

5. 中川慎介, Mária A. Deli, 巽理恵, 田中邦彦, 丹羽正美: 脳内移行型薬剤開発のための血液脳関門 in vitro 再構成モデル(BBBキット)の開発. *長崎市医師会報* 47(7): 13-16, 2013, 査読無

6. Horai S, Nakagawa S, Tanaka K, Morofuji Y, Couraud PO, Deli MA, Ozawa H, Niwa M: Cilostazol strengthens barrier integrity in brain endothelial cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 33: 291-307, 2013 査読有

<http://dx.doi.org/10.1007/s10571-012-9896-1>

7. Hellinger E, Veszelka S, Toth A, Walter F, Kittel A, Bakk ML, Tihanyi K, Hada V, Nakagawa S, Thuy DHD, Niwa M, Deli MA, Vastag M: Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2 and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm* 82(2): 340-351, 2012 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.07.020>

[学会発表](計7件)

1. 中川慎介, 竹下朝規, 山田成美, 丹羽正美: HGFとTGF-betaの血液脳関門への作用比較(ポスター) 第87回日本薬理学会年会 2014年03月 仙台市、仙台国

際センター

2. Shinsuke Nakagawa: In vitro reconstituted blood-brain barrier model and their application to drug discovery. The 1st international symposium Dejima challenge for therapeutic innovation. March 14th, 2014, Nagasaki, Japan
3. Shuji Fukuda, Shinsuke Nakagawa, Tomonori Takeshita, Kentaro Hayashi, Rie Tatsumi, Tanaka Kunihiko, Maria A. Deli, Izumi Nagata, Masami Niwa: Cilostazol improves the BBB barrier functions against AGEs-related ischemic damage via TGF- $\beta$  signaling. The 16th international symposium on "Signaling in the Blood-Brain Barriers" Sümeg, Hungary. 2013, 12-14, September
4. 中川慎介、竹下朝規、巽理恵、Thuy DHD、林健太郎、田中邦彦、永田泉、丹羽正美：実験的糖尿病性脳虚血障害に対するシロスタゾールの保護作用と TGF-シグナルの関与(ポスター) 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 03 月福岡市、福岡国際会議場
5. 中川慎介, Maria A. Deli, Dinh Ha Duy Thuy, 相良真由美, 田中邦彦, 丹羽正美：血液脳関門 In vitro 再構成モデル (BBB キット) と機能解明への活用(シンポジスト) 第 24 回日本脳循環代謝学会総会 2012 年 11 月 広島市、リーガロイヤルホテル広島
6. 中川慎介, Mária A. Deli, 巽理恵, Dinh Ha Duy Thuy, 相良真由美, 田中邦彦, 丹羽正美：血液脳関門 In vitro 再構成モデル (BBB キット) (シンポジスト) 第 14 回応用薬理シンポジウム 2012 年 09 月 甲府市、ベルクラシック甲府
7. 中川慎介, 丹羽正: In vitro 血液脳関門再構成モデル (BBB キット) を用いた BBB 機能の解析(招待講演) 第 5 回 Japanese Consortium for Age-related Neurodegenerative disorders (J-CAN 2012) 2012 年 08 月東京都中央区、八重洲ファーストファイナンシャルビル

〔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

中川 慎介 (Nakagawa Shinsuke)

所属：長崎大学 医歯薬学総合研究科

職名：講師

研究者番号：10404211