

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861284

研究課題名(和文) 高血糖負荷による血液脳関門障害に対するシロスタゾールの作用

研究課題名(英文) The effect of cilostazol for hyperglycemia-induced BBB damage

研究代表者

福田 修志 (FUKUDA, Shuji)

長崎大学・病院(医学系)・医員

研究者番号：40646577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳血液関門に対する高血糖障害とその保護薬の検討を行った。BBBモデルに対して、高血糖(55mM)を負荷して、BBBの障害を再現した。シロスタゾール、ピタバスタチン、カンデサルタン、EPA、DHAを投与して保護効果を検討すると、ピタバスタチン、カンデサルタンはBBBの障害に対して保護作用を認めたが、シロスタゾールは認めなかった。ピタバスタチン、カンデサルタンは高血糖によるBBBの障害に対して保護作用を有する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Blood-brain barrier disruption represented a key feature in hyperglycemia (HG)-induced cerebral damage. The neuroprotective effect of cilostazol, pitavastatin, candesartan, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) has been demonstrated in animal models and clinical studies. However, it remained unclear whether they were effective for HG-induced BBB damage. We investigated the effect of cilostazol, pitavastatin, candesartan, EPA and DHA on HG-induced BBB damage. We used in vitro BBB models with primarily cultured of rat brain capillary endothelial cells (RBEC), and subjected cells to HG (55mM D-glucose). There was a significant decrease in transendothelial electrical resistance (TEER) under HG. There was not a significant decrease in cell viability under HG. Pitavastatin and candesartan inhibited decreases in TEER induced by HG. HG compromised the barrier integrity of the in vitro BBB model. Pitavastatin and Candesartan improved HG-induced BBB damage.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：BBB hyperglycemia candesartan pitavastatin

1. 研究開始当初の背景

1) 末梢と中枢を隔てる血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) は、単に物質の移動を制限する関門として機能しているだけではなく、機能的な neurovascular unit を形成し、今まで考えられていた以上に、ニューロン機能と一体化されていることが理解され始めている。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。したがって、BBB 機能の制御は、neurovascular unit の制御に繋がると考えられ、中枢神経系関連の創薬にとって極めて今日的な課題ということが出来る。

2) 私たちはラット初代培養の脳毛細血管内皮細胞の単層培養系や、ペリサイト、アストロサイトを含めた 3 種類の細胞を in vitro で立体的に共培養した細胞間クロストークを考慮できるモデルを用いて、実験的虚血再還流 BBB 障害モデルを作製し、その機能検定および BBB 保護薬の検討を行ってきた。最近、我々は、糖尿病患者では加齢に伴い脳卒中の危険性が増加し、脳血管障害性認知症の発症が増加するとの報告を背景に、糖尿病性脳虚血再還流モデルの作製を行ってきた。その結果、軽度の低酸素と後期糖化反応生成物 (Advanced glycation end product : AGE、高血糖状態では循環血液中に増加する事が知られており、内皮細胞障害を示す事が報告されている) を組み合わせることで、BBB 機能障害が増悪することを確認している。

2. 研究の目的

高血糖負荷時の BBB 病態、BBB 構成細胞による調節機構の解明を進める予定である。また、BBB 保護薬の探索も行う。候補薬としては、これまでの我々の検討より BBB 保護作用が判明しているシロスタゾール (cilostazol) やピタバスタチン

(Pitavastatin) を予定している。

3. 研究の方法

初代培養脳毛細血管内皮細胞を我々が開発した方法で、2~3 週齢ラットより単離培養する。puromycin を用いることにより内皮細胞の純度をほぼ 100% にすることに成功した。初代培養ペリサイトは同様に 2~3 週齢ラットより単離培養する。ペリサイトは、内皮細胞を単離する操作の過程で単離できる。初代培養アストロサイトは 1~2 日齢ラットより shaking method で単離培養する。多孔質 (0.4 μ m、3.0 μ 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、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し、更に 3 種類の細胞を同時に共培養したモデルも含め 7 種類のモデルを作製する。これらのモデルを用いて高血糖が BBB 機能の電気抵抗値に与える影響を検討し、また細胞数や活性酸素を測定した。また、高血糖による障害に対する保護薬を検討するため、臨床で神経保護効果を報告されているシロスタゾール、ピタバスタチン、カンデサルタン、EPA、DHA を使用してさらなる保護効果を検討した。

4. 研究成果

糖尿病は脳内の血流を変化させ、脳血液関門の透過性を亢進させ、内皮の異常な増殖をおこし、機能に影響を与え、脳血管障害を起こすことが知られている。シロスタゾール、ピタバスタチン、カンデサルタン、EPA、DHA は神経保護効果が報告されているが高血糖による障害に対しての保護効果についてはまだはっきりしていない。今回われわれは、

BBB モデルを用いて高血糖による脳障害に対するシロスタゾール、ピタバスタチン、カンデサルタン、EPA、DHA の保護効果を検討した。ラット初代培養の脳毛細血管内皮細胞を用いて BBB モデルを作成し、高血糖 (55mM) を負荷した。高血糖を負荷すると電気抵抗値の有意な低下を認めた。細胞数を検討したが、高血糖では細胞数に対しては影響は認めなかった。ピタバスタチン、カンデサルタンは高血糖による障害を阻害した。

糖尿病が末梢の血管障害を起こしたり、神経系のイベントを増加させることは報告されている。高血糖により脳血液関門が障害をうけることは臨床、基礎の報告からも報告されている。本報告では、BBB モデルを作成し、*in vitro* のモデルで高血糖による障害を作成した。高血糖 (55mM) を加えることで高血糖障害を BBB モデルで再現することができた。これは臨床や *vivo* での過去の報告をサポートするデータであり、簡易に使用できる BBB モデルで再現できたことで高血糖による障害の原因解明についてよりアプローチしやすくなったと考えられた。

シロスタゾールは選択的な PDE3 の阻害剤であり、細胞内の cAMP を上昇させ、PKA を活性化させることが報告されている。当施設の報告でも細胞内の cAMP を上昇させ、脳血液関門を強固にすることを報告している。しかし、本研究ではシロスタゾールの高血糖による脳血管障害に対する保護効果は認めなかった。高血糖による障害については関与していない可能性があると考えられた。

スタチンについての神経保護効果については過去にも報告されており、当施設の報告でもピタバスタチンが脳血液関門をクラウディン 5 の発現を上昇させることで脳血液関門を強固にすることを報告している。本研究でもピタバスタチンは高血糖による脳血管障害に対して保護効果を認め、ピタバスタチンは脳血液関門の機能に対して保護効果

を持つことをサポートする結果となった。

アンギオテンシン受容体拮抗薬については、糖尿病性腎症に対する保護効果などは報告されている。本研究では、カンデサルタンは高血糖による脳血管障害に対する保護効果を示し、カンデサルタンに神経保護効果を有する可能性が示唆された。

EPA と DHA の神経保護効果については過去にも報告されているが、本研究では保護効果は認めなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

福田 修志 ピタバスタチンとカンデサルタンは高血糖による脳血液関門の障害を改善させる. 日本脳神経外科学会第 73 回学術総会 2014.10.9 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

福田 修志 (FUKUDA,Shuji)

長崎大学・病院 (医学系)・医員

研究者番号：40646577

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし