

主 論 文

Cilostazol attenuates ischemia-reperfusion-induced blood-brain barrier dysfunction enhanced by advanced glycation endproducts via transforming growth factor- β 1 signaling.

トランスフォーミング増殖因子- β 1 を介した虚血再灌流条件下での終末糖化産物による血液脳関門障害に対するシロスタゾールの保護効果.

竹下朝規, 中川慎介, 巽理恵, 宗剛平, 林健太郎, 田中邦彦,
Maria A. Deli, 永田泉, 丹羽正美

Molecular and Cellular Neuroscience 2014 (in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永田泉教授)

緒 言

糖尿病を合併した虚血性脳血管障害では梗塞巣や脳浮腫が増悪することが知られているが、脳浮腫発症の責任部位である血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) の機能障害に関する詳細なメカニズムは未だ不明である。近年の研究により糖尿病性網膜症や大血管障害では終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) が血管内皮細胞障害に関与することが指摘されている。そこで我々は、実験的虚血再灌流条件下での AGEs の作用を BBB in vitro モデルを用いて検討し、そのメカニズムの解明を行った。また、BBB の機能障害を軽減する薬物 (BBB 保護薬) の検討も行った。シロスタゾール (cilostazol) はホスホジエステラーゼ III の選択的阻害薬であり細胞内サイクリック AMP を上昇させ、血管拡張作用や抗血小板作用を発揮する。また、BBB に対する保護的な効果を有することが報告されている。そこで、シロスタゾールを BBB 保護薬候補として検討を行った。

対象と方法

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を用いて BBB in vitro モデルを作成した。虚血再灌流の条件で AGEs が BBB に

与える影響を調べるため、BBBモデルにBSA (bovine serum albumin) の糖化産物であるAGE-BSA (200 µg/ml) を添加し、3時間のoxygen-glucose deprivation (OGD) と、24時間の再灌流を行った。Normoxiaの条件ではBSA (200µg/ml) を添加した。BBBの機能評価は経内皮細胞電気抵抗 (TEER) 値を測定することで行った。また、tight junction (TJ) 蛋白であるZonula occludens-1, claudin-5の発現を免疫染色法、ウエスタンブロット法を用いて検討した。また、作製したBBB機能障害モデルに対するシロスタゾールの作用も検討した。虚血再灌流下でのAGEsによるBBB機能障害メカニズムを検討する目的で、細胞外TGF-β1濃度をimmunoassay法にて測定し、TGF-β1 (1ng/ml) 添加によるTEER値の経時的变化を測定した。

結 果

BBBに対するAGEsの影響をTEER値で確認するとAGEsはNormoxiaの条件ではTEER値に変化を与えなかったが、虚血再灌流の条件では有意な低下を示した。一方、cilostazolを投与すると、虚血再灌流及びAGEs投与によるTEER値の低下を抑制した。この変化を免疫組織染色法、ウエスタンブロット法によるtight junction蛋白の発現で確認すると、虚血再灌流でAGEsを作用させたものではclaudin-5の発現は低下したが、シロスタゾールの投与にてその低下は抑制された。また、AGEsはBBBモデルにおける細胞外TGF-β1の産生を増加したが、シロスタゾールはその産生を抑制した。最後にTGF-β1を直接BBBモデルに投与すると経時的にTEER値は低下したが、シロスタゾール投与によりその低下は抑えられた。虚血再灌流及びAGEs添加で低下したTEER値はTGF-β1の受容体阻害剤であるA83-01の投与にて回復した。

考 察

今回我々はtriple co-culture modelであるBBBモデルを用いることで解剖学的、生理学的にも生体内の脳微小血管により近い状態で実験を行った。

今回の実験でAGEsは虚血再灌流障害を加えることでBBBの機能障害を増悪させる事が示され、虚血再灌流状態では内皮細胞におけるRAGEの発現が増加していた。つまり、RAGEの発現増加によってAGEsはRAGEを介する障害作用を亢進したと考えられた。BBBのバリアー機能に関する分子の中でもTJ蛋白であるclaudin-5が最も重要な分子であり、機能的実態と考えられているが、AGEsによって障害を受けた内皮細胞ではclaudin-5の発現が減少していた。一方、cilostazolはclaudin-5の発現を回復する事でBBB機能を維持していた。AGEsによって誘導される炎症性因子の中でもTGF-β1は全身の糖尿病性合併症を引き起こす原因と考えられているが、糖尿病によるBBB障害に関しては未

だそのような報告はない。今回の実験では TGF- β 1 を直接作用させることで BBB の機能は経時的に障害された。また、細胞外 TGF- β 1 濃度は AGEs 投与により増加したが、cilostazol はその産生を抑制し、さらに TGF- β 1 による BBB 障害も抑制した。以上のことから、糖尿病を合併した虚血性脳血管障害には、TGF- β 1 の産生亢進による BBB 機能障害が関与しており、その保護薬としてシロスタゾールが有用であることが示唆された。