

諸藤 陽一 論文内容の要旨

主 論 文

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

(ピタバスタチンは初代培養ラット脳内皮細胞の関門機能を強化する)

諸藤 陽一、中川 慎介、宗 剛平、日宇 健、蓬莱 彰士、林 健太郎、
田中 邦彦、陶山 一彦、マリア A. デリ、永田 泉、丹羽 正美

Cellular and Molecular Neurobiology (in press) 2010

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

様々な大規模臨床試験の結果より、脂質代謝異常症治療薬であるスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) は、脳卒中の一次予防と二次予防に有効であることが示唆されている。しかし、脳卒中の発症と予後に密接に関与する血液脳関門 (Blood-brain barrier ; BBB) に対するスタチンの作用は未だ判明していない。そこで、我々は *in vitro* BBB モデルを作製し、ピタバスタチンが BBB に与える影響を検討した。

対象と方法

3週令 Wistar rat より脳毛細血管内皮細胞を分離し、コーティングしたディッシュで培養した後、トリプシン処理を行い2腔培養系である Transwell を用いて内皮細胞単層の BBB モデルを作製した。

1. ピタバスタチンを 10^{-11} M から 10^{-6} M までの各濃度で添加し経内皮電気抵抗 (TEER) を測定し、タイトジャンクション機能を評価した。
2. Sodium fluorescein (NaF) と Evans-blue albumin (EBA) を使用し BBB 透過性を測定した。
3. タイトジャンクション蛋白の主要な構成要素であるクラウディン-5 の発現を蛍光免疫染色、ウェスタンブロッティングにて検討した。また、RT-PCR 法にて mRNA の発現も検討した。
4. スタチンはコレステロール生合成を抑制すると同時に中間産物であるイソプレノイドの生成を抑制するため、ファルネシルピロリン酸 (FPP), グラニルゲラニ

ルピロリン酸 (GGPP) を添加し、ピタバスタチンの効果に影響するかどうかを検討した。

結 果

ピタバスタチン投与により、TEER は有意に上昇し、その効果は 10^{-8}M で最大となった。傍細胞輸送の指標である NaF の透過性を有意に抑制していたが、経細胞輸送の指標である EBA の透過性に変化は認めなかった。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。

考 察

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。

スタチンは LDL-コレステロール低下作用ばかりでなく、多面的作用を持つ薬剤としてよく知られているが、BBB に与える影響についての報告は少ない。2006 年に Kuhlmann らが初めて *in vitro* の系でフルバスタチンが BBB 機能を強化することを報告したが、タイトジャンクション蛋白の評価は行われていない。今回の結果では、クラウディン-5 の蛋白量が増加することで TEER の上昇を認めていたが、mRNA のレベルは変化していなかったため、ピタバスタチンの BBB 機能強化にはクラウディン-5 の翻訳の亢進や分解の抑制といった転写後の因子が関わっていると考えられる。また、クラウディン-5 蛋白が細胞質から細胞膜へ移動する転位置の効率化が BBB 機能強化に関与している可能性もある。

本研究ではピタバスタチンの BBB 保護効果の機序として GGPP の関与が示唆された。GGPP は Rho A の活性化に関与するが、Rho A/Rho kinase の活性化が BBB 機能障害につながることで、さらに Rho kinase によってクラウディン-5 がリン酸化されるとバリア機能維持に貢献しなくなることも近年判明している。これらのことより、ピタバスタチンの BBB 保護効果は機能的なクラウディン-5 とリン酸化された非機能的なクラウディン-5 の比率が関与している可能性も示唆される。

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。