

宗 剛平 論文内容の要旨

主 論 文

Candesartan Improves Ischemia-Induced Impairment of the Blood-Brain Barrier
In Vitro

カンデサルタンは生体外で虚血により引き起こされた血液脳関門の障害を改善する

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

Cellular and Molecular Neurobiology (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：松尾 孝之教授)

緒 言

体循環液量や血圧の調節を担うアンジオテンシンⅡ (AngⅡ) は、高血圧や心不全などの様々な病態と密接に関係することが知られている。高血圧治療薬であるアンジオテンシンⅡ受容体 (AT受容体) の拮抗薬 (ARB) は、降圧作用に加え、臓器保護作用が知られている。しかし、この臓器保護作用に関する細胞レベルでの作用機序は十分に解明されていない。我々は、ARBの臓器保護作用の中から、脳血管系への作用に注目し、血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) を構成する脳毛細血管内皮細胞の培養系を用いて、ARBの保護作用の機序を検討した。In vitro BBBモデルに虚血再灌流障害を加え、ARBの一つで、動物モデルおよびヒトでの脳虚血に対して保護的に働くことが報告されているカンデサルタンの保護効果を検討した。

対象と方法

Wistarラットより脳毛細血管内皮細胞を単離培養し、2腔培養系であるTranswellを用いて、内皮細胞の単層培養モデルを作製した。また、BBBの構成細胞の一つであるアストロサイト由来のAngⅡがBBBの機能調節に関与することが報告されているため、脳毛細血管内皮細胞とアストロサイトとの共培養系を作製し、カンデサルタンの影響を検討した。

虚血再灌流実験では内皮細胞の単層培養モデルを用い、6時間の虚血 (oxygen-glucose deprivation, OGD) と、24時間の再灌流 (reoxygenation) を負荷し、カンデサルタン (10 nM) は虚血開始時に添加した。虚血再灌流によるBBB機能への影響は、経内皮電気抵抗 (TEER) および sodium fluorescein (NaF) の透過性を指標に判定した。またタイトジャンクションタンパクである claudin-5 と occludin の発

現を免疫染色および免疫ブロットイングにより検討した。さらに酸化ストレスの指標である nitrate/nitrite および reactive oxygen species (ROS) を測定した。細胞生存について Cell Counting Kit 8 を用いて測定した。

結 果

虚血再灌流負荷を与えない、通常の培養状態では、カンダサルタンを投与すると TEER は単層モデルでは変化なく、共培養モデルでは上昇した。

虚血再灌流により、TEER の低下と NaF の透過性亢進を認め、BBB 機能の低下が観察されたが、カンデサルタンはこれらを有意に抑制した。

虚血再灌流により、タイトジャンクションタンパクである claudin-5 と occludin の発現量はカンデサルタンの投与の有無で変化はなかったが、内皮細胞の形態が敷石状に変化し、カンデサルタンはそれを抑制した。

虚血再灌流により、nitrate/nitrite および ROS はカンデサルタン投与の有無で変化はなかったが、虚血再灌流による内皮細胞の生存低下がカンデサルタン投与により有意に抑制された。

考 察

今回の結果より、カンデサルタンは虚血再灌流において内皮細胞の生存を改善し、内皮細胞の形態変化および paracellular transport の障害を抑制することで BBB の機能を強化することが示された。カンデサルタンは酸化ストレスを抑制するとの報告があるが、今回の結果でカンデサルタンは nitrate/nitrite の増加を抑制する傾向にあるものの有意ではなく ROS の産生にも影響しなかった。

その他に、カンデサルタンの作用点として虚血再灌流による内皮細胞での Ang II 産生増加や AT 受容体変化が可能性として考えられたが、Ang II の産生増加や BBB に保護的に働くとされる AT₂ 受容体は今回の実験では同定できなかった。

近年の研究により、ある種の受容体はリガンド非依存性に活性化していることが報告されており、AT 受容体もリガンド (Ang II) 非依存性に活性化することが知られている。カンデサルタンは、このリガンド非依存性の活性化を抑制するインバーサゴニストとしての作用を持つと考えられている。本研究においても、虚血再灌流により AT₁ 受容体が活性化され、カンデサルタンが活性化 AT₁ 受容体に結合することで、また AT₁ 受容体の下流のシグナルを制御することで内皮細胞保護効果を発揮したものと考えられた。

本研究により、カンデサルタンは虚血再灌流による BBB 機能障害を直接改善することが示され、今後虚血性脳卒中において有効な治療手段となる可能性が示唆された。