

蓬萊 彰士 論文内容の要旨

主 論 文

Cilostazol Strengthens Barrier Integrity in Brain Endothelial Cells
(シロスタゾールは脳内皮細胞のバリア機能を強化する)

蓬萊 彰士、中川 慎介、田中 邦彦、諸藤 陽一
ピエール-オリバー クーロ、マリア A. デリ、小澤 寛樹、丹羽 正美

Cellular and Molecular Neurobiology (in press) 2012

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：小澤 寛樹教授)

緒 言

ホスホジエステラーゼ 3 (PDE3) 選択的阻害薬であるシロスタゾールは血小板凝集阻害作用を持ち、脳梗塞再発予防に臨床応用されている。しかし、脳梗塞の発症と予後に密接に関与する血液脳関門 (Blood-brain barrier、BBB) に対するシロスタゾールの作用は不明である。そこで、我々はヒトとラット由来の BBB 関連細胞を用いて *in vitro* BBB モデルを作製し、シロスタゾールの BBB に与える影響を検討した。

対象と方法

1. 3 週令 Wistar ラットより脳毛細血管内皮細胞 (RBEC) を分離し、内皮細胞単層の BBB モデルを作製した。シロスタゾールを 10^{-8} M から 10^{-5} M の濃度で添加し、sodium fluorescein (NaF) の透過性と経内皮電気抵抗 (TEER) を測定することでタイトジャンクション機能を評価した。
2. ヒト不死化脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3) をシロスタゾール 10^{-8} M と 10^{-5} M で処置し、ローダミン 123 添加後の細胞内のローダミン 123 濃度を測定することで P 糖タンパクの排出機能を評価した。
3. 初代培養 RBEC、ペリサイト、アストロサイトからなる *in vitro* BBB モデル (BBB Kit) を用いて脳虚血/再灌流実験を行い、シロスタゾールの BBB 保護効果について評価した。
4. タイトジャンクションの主要な構成タンパクである claudin-5、ZO-1、occludin および細胞骨格を構成する F-アクチンの発現を蛍光組織細胞化学法で観察した。

結 果

RBEC における PDE3B mRNA の発現とシロスタゾールによる細胞内 cAMP の上昇を確認し、シロスタゾールが実際に RBEC に作用することが示された。シロスタゾール処置により RBEC の TEER は有意に上昇し、その効果は 10^{-6} M で最大であった。さらに傍細胞輸送の指標である NaF 透過性を有意に抑制した。hCMEC/D3 では細胞内のローダミン 123 の取り込みが有意に減少し、P 糖タンパクによる排出機能の亢進を認めた。それらの変化は PKA 阻害剤である H89 により抑制された。BBB Kit を用いた虚血再灌流実験では、虚血再灌流前後でシロスタゾール処置群で TEER が有意に高かった。蛍光染色においてタイトジャンクションタンパクである claudin-5 と ZO-1 の形態性状と蛍光強度には、シロスタゾール処置群およびコントロール群において有意な差を認めなかった。しかし、occludin と F アクチンでは、シロスタゾール処置群においてバリア機能の強化を示す細胞辺縁部の蛍光染色像所見が得られた。

考 察

シロスタゾールが RBEC において TEER の上昇と NaF 透過性の低下をもたらし、バリア機能を強化することが明らかになった。TEER は細胞接着の強度を表すもので、特に claudin-5 がタイトジャンクションを形成する主要なタンパクとして知られている。しかし、今回の実験では TEER の上昇を認めたにも関わらず claudin-5 の蛍光染色像には大きな差を認めなかった。Carman ら (2011) は、RBEC においてアデノシン受容体刺激による occludin の発現低下と TEER の低下を認め、一方では claudin-5 と ZO-1 には大きな変化はなかったと報告している。シロスタゾールによる cAMP/PKA の活性化によりリン酸化された occludin が減少し、蛍光染色像の改善と TEER の上昇がもたらされたと考えられる。また、シロスタゾールによるバリア機能の強化に関連する F アクチンの細胞辺縁への密集も観察され、PDE3B 阻害による内皮細胞内 cAMP/PKA と cAMP/EPAC1 シグナル経路の活性化によると考えられた。BBB Kit を用いた虚血再灌流実験では、そのバリア機能障害を減少させる効果が示された。シロスタゾールによる P 糖タンパクの排出機能強化は PKA 阻害剤である H89 により抑制されたことから、この変化も cAMP/PKA シグナル経路によると考えられた。

今後、シロスタゾールが中枢神経系疾患の治療へ BBB 保護薬として応用されるための研究展開が期待される。