

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22249054

研究課題名（和文）G蛋白質共役型受容体を標的としたくも膜下出血後脳血管攣縮に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutic modality targeting G protein-coupled receptors for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

佐々木 富男（SASAKI TOMIO）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10134561

研究成果の概要（和文）：くも膜下出血（SAH）後の脳血管攣縮は、頭蓋内主幹動脈の遅発性持続性狭小化により脳虚血を引き起こし、SAH患者の予後を大きく左右する。しかし、脳血管攣縮発症の詳細な分子メカニズムは解明されていない。本研究では、くも膜下出血後のウサギ攣縮脳血管において、さまざまなアゴニストがもたらす共通の病態特異的な収縮性変化をとらえるとともに、それらの受容体であるG蛋白質共役型受容体（GPCR）を介した血管平滑筋収縮調節メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage (SAH) is characterized by delayed and prolonged contraction of cerebral arteries, which may cause cerebral ischemia, thereby determining the prognosis of both life and neurologic function of SAH patients. However, the molecular mechanisms of cerebral vasospasm remain to be elucidated. In this study, we investigated SAH-specific changes in the agonist-induced contraction in the rabbit spastic cerebral arteries and elucidated some regulating mechanisms underlying the increased vascular contractility in G protein-coupled receptor-mediated contraction after SAH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	20,800,000	6,240,000	27,040,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	28,400,000	8,520,000	36,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：脳血管障害学

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮はくも膜下出血患者の生命予後および機能予後の重要な決定因子であるが、その発生機序には未解明な部分が多く、画期的な治療薬も未だない。脳血管攣縮の発症メカニズムは、一般に、攣縮誘発物質の産生増大と血管反応性の増大という二つの側

面からとらえることができるが、血管反応性の増大は、病態特異的に関与する攣縮発症機序として、かつ、脳血管攣縮の遅発性発症の基盤として、重要な役割を果たしていると考えられる。従って、我々は、この血管反応性増大の分子機序を明らかにすることが、有効な予防法や治療を開発する上での重要課題

と考えている。我々はこれまでに、ウサギくも膜下出血モデルを用いて、正常血管ではほとんど収縮作用を示さないトロンビンと血小板由来増殖因子に対して、くも膜下出血後には強い収縮反応性が誘導されることを世界に先駆けて明らかにした。さらに、トロンビンに対する反応性増大はトロンビン受容体の発現亢進を伴うこと、選択的トロンビン受容体拮抗薬の投与により、受容体の発現亢進とトロンビンに対する収縮反応性の増大を予防できることを、初めて明らかにした。これらの結果は、受容体の発現亢進が、血管反応性増大に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。また、くも膜下出血後にトロンビンのみならず、フェニレフリンやエンドセリン1といったアゴニストに対する収縮反応性も増大し、これに伴い  $\alpha_1$  アドレナリン受容体及び  $ET_A$  受容体の発現も亢進することを明らかにした。これらの結果は、くも膜下出血における受容体の発現亢進と、それらの受容体に対するアゴニスト収縮反応性の増大が、G 蛋白質共役型受容体及びそのアゴニスト全般に共通して認められる現象である可能性を示している。よって、本研究では、GPCR を介した血管平滑筋収縮調節機構に着目し、SAH 後の血管反応性増大メカニズムの解明を試みた。

## 2. 研究の目的

くも膜下出血後の GPCR を介した脳血管平滑筋収縮性亢進メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

オス日本白色ウサギを用い、初日、2日目の2回、大槽内に自家血を投与し、くも膜下出血モデルを作成した。対照モデルは自家血の代わりに生食を大槽内に注入した。発症7日目に摘出した脳底動脈を用い、張力細胞質カルシウム濃度同時測定、免疫ブロット法およびリアルタイムPCR法による受容体および細胞内蛋白質の発現解析、ミオシン軽鎖および細胞内蛋白質のリン酸化レベル測定、等尺性張力測定、TBARS法による脳実質の酸化ストレス評価を行った。また、攣縮血管径の評価は直接観察法（顕微鏡下における外径測定）により行った。

## 4. 研究成果

本研究ではまず、ウサギ脳底動脈のトロンビン長時間刺激において、正常血管で一過性であった収縮が、くも膜下出血 (SAH) 後脳血管では持続性収縮に変化すること、および PAR1 活性化ペプチドによる反復刺激により、正常血管で認められた2回目の収縮の減弱が、SAH 後脳血管では認められないことを明らかにした (論文1)。こうした一過性から持続性への収縮性の変化は、SAH 後、トロンビ

ン受容体の不活性化が障害され収縮シグナルに対するフィードバック制御が破たんした可能性を示唆するものである。そこで、受容体の不活性化障害がトロンビン受容体以外の受容体にも波及するか否かを調べるため、エンドセリン1、TXA<sub>2</sub>、セロトニン、フェニレフリンにより長時間のアゴニスト刺激を行った。その結果、トロンビンと同様、一過性から持続性への収縮反応性の変化が観察された (論文1、2)。この結果、SAH 後、受容体の不活性化障害がトロンビン受容体以外の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) にも波及している可能性が強く示唆された。そこで、GPCR と共役している三量体 G 蛋白質の活性化が持続するか否かに関する検討を行った。SAH 後のエンドセリン、フェニレフリン、トロンビン収縮における収縮持続相において Gq 特異的阻害剤を投与したところ、いずれのアゴニストによる持続収縮も完全に抑制された。この結果から、SAH 後のアゴニストによる持続収縮には三量体 G 蛋白質の持続活性化が関与することが明らかとなった (論文1)。

SAH 後の GPCR アゴニスト刺激に対する血管収縮性増大におけるカルシウム感受性の役割を検討した。まず張力-細胞質カルシウム濃度同時測定を行い、エンドセリン、フェニレフリン、トロンビン刺激における張力-カルシウム関係を比較検討した。エンドセリン収縮では他のアゴニスト収縮と比べ有意に張力/ $Ca^{2+}$  が高く、収縮反応におけるカルシウム感受性の寄与が大きいことが明らかとなった。よってエンドセリン収縮におけるカルシウム感受性の役割を検討した。 $\alpha$  毒素脱膜化標本を用い、エンドセリン刺激を行ったところ、SAH モデルでは対照モデルと比べ有意に収縮反応性が亢進しており、SAH ウサギ脳血管においては収縮装置のカルシウム感受性が増大していることが明らかになった (論文3)。

そこで、主要なカルシウム感受性調節分子である、Rho-kinase (ROCK) および PKC を介した Myosin light chain phosphatase (MLCP) の抑制メカニズムの関与を検討した。 $\alpha$  トキシンにより脱膜化した脳底動脈リング条片を用いて細胞内カルシウム濃度固定下にエンドセリン刺激を行い、エンドセリン1の引き起こすカルシウム感受性増大に対する、ROCK 阻害薬および PKC 阻害薬の抑制効果を検討したところ、SAH モデルではいずれの阻害薬においても、対照モデルで濃度依存性に認められた収縮抑制効果が有意に減弱した。また、ROCK2 および PKC  $\alpha$  の蛋白質発現が SAH 後に有意に亢進することが明らかとなった (論文3)。

さらに、これらの下流で MLCP の活性調節を行っていると考えられるカルシウム感受性調節分子、MYPT-1 および CPI-1 に関する検討を行ったところ、MYPT-1 および CPI-17 の蛋白質発

現はSAH後に有意に亢進することが明らかとなった。また、MYPT-1のT696およびT853におけるリン酸化レベルおよび、CPI-17のT38におけるリン酸化レベルを測定したところ、SAH後、T853、T38のリン酸化レベルが有意に上昇し、T696のリン酸化レベルの上昇は認めなかった。以上の結果から、SAH後の脳血管では、ROCK2およびPKC $\alpha$ の発現亢進、MYPT-1(T853)およびCPI-17(T38)のリン酸化上昇を介したMLCPの抑制によりカルシウム感受性が増大し、血管反応性が亢進している可能性が示唆された(論文3)。

ET-1刺激後、0、1、5、20分におけるMYPT-1(T696)、MYPT-1(T853)、CPI-17(T38)のリン酸化レベルを測定したところ、CPI-17(T38)はET-1刺激1分後の早期をピークにリン酸化レベルの急速な上昇を認めた。このリン酸化は、対照モデルでは一過性であったが、SAHモデルでは持続性であった。MYPT-1(T696)は、ET-1刺激後、対照モデルではリン酸化レベルの上昇を認めなかったが、SAHモデルでは刺激5分後をピークとする持続的なリン酸化上昇を認めた。MYPT-1(T853)は、ET-1刺激後、対照モデルでは刺激5分後をピークとする一過性のリン酸化上昇を、SAHモデルでは刺激後経時的に上昇する持続的なリン酸化上昇を認めた。以上の結果から、SAH後の脳血管におけるET-1に対する収縮反応性亢進には、MYPT-1のリン酸化、CPI-17のリン酸化を介したカルシウム感受性増大が関与していることが明らかとなった(論文3)。

#### 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10件)

1. Kikkawa Y, Kameda K, Hirano M, Sasaki T, Hirano K

Impaired Feedback Regulation of the Receptor Activity and the Myofilament Ca<sup>2+</sup> Sensitivity Contributes to Increased Vascular Reactiveness after Subarachnoid Hemorrhage

*J Cereb Blood Flow Metab*, 2010; 30: 1637-50, 2010.09.

2. Kameda K, Kikkawa Y, Hirano M, Matsuo S, Sasaki T, Hirano K

Combined argatroban and anti-oxidative agents prevents increased vascular contractility to thrombin and other ligands after subarachnoid hemorrhage

*Br J Pharmacol*, 2012; 165(1): 106-119, 2012.01.

3. Kikkawa Y, Matsuo S, Kameda K, Hirano M, Nakamizo A, Sasaki T, Hirano K

Mechanisms underlying potentiation of endothelin-1-induced myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitization after subarachnoid hemorrhage

*J Cereb Blood Flow Metab*, 2012; 32: 341-352, 2012.02.

4. Sasaki T, Kikkawa Y

Proposed Mechanism of Cerebral Vasospasm: Our Hypothesis and Current Topics

*Acta Neurochir Suppl.*, 2013; 115: 53-56, 2012.07.

5. 吉川雄一郎、平野勝也、亀田勝治、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

くも膜下出血後の血管反応性亢進に、受容体活性および筋フィラメントのカルシウム感受性に対するフィードバック調節機構の障害が関与する

*脳血管攣縮*, 26, 73-78, (脳卒中の外科 38(suppl)), 2010.12.

6. 亀田勝治、吉川雄一郎、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

くも膜下出血後における脳血管のトロンビンに対する収縮反応性亢進の機序

*脳血管攣縮*, 26, 68-72, (脳卒中の外科 38(suppl)), 2010.12.

7. 吉川雄一郎、松尾諭、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

くも膜下出血後ウサギ脳血管のエンドセリンに対する平滑筋収縮装置のカルシウム感受性増大メカニズム

*脳血管攣縮*, 27: 47-53, 2011 (脳卒中の外科 39(suppl)), 2011.12.

8. 吉川雄一郎、佐々木富男、平野真弓、平野勝也

くも膜下出血後の脳血管平滑筋収縮性亢進の分子機構

*福岡医学雑誌*, 2011; 102(12): 325-332, 2011.12.

9. 吉川雄一郎

第11回国際脳血管攣縮学会報告記(2011年7月21~23日)

*No Shinkei Geka*, 2011; 39(12): 1206-1207, 2011.12.

10. 吉川雄一郎、松尾諭、黒木亮太、森恩、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

超高解像度 256 列多列検出器型 CT を用いたウサギくも膜下出血モデルにおける攣縮血管径の経時的評価  
*脳血管攣縮, 28: (脳卒中の外科 40(suppl)), (in press), 2012.12.*

[学会発表] (計 2 1 件)

1. 吉川雄一郎、亀田勝治、平野真弓、佐々木富男、平野勝也

Mechanisms underlying increased vascular contractility in subarachnoid hemorrhage  
第 87 回日本生理学会大会 2010 年 5 月 20 日 盛岡市民文化ホール

2. Sasaki T

Our hypothesis of the mechanism of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage

Japan-Asia Friendship Conference (The 69th annual meeting of the Japan neurological society) 2010 年 10 月 25 日 Hilton Fukuoka Sea Hawk (Fukuoka, Japan)

3. 亀田勝治、吉川雄一郎、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

くも膜下出血後の血管攣縮性亢進に及ぼすアルガトロバンおよびビタミン C の影響  
第 3 回 Kyushu CVD Conference 2010 年 11 月 20 日 ホテルニューオータニ博多 (福岡)

4. 亀田勝治、吉川雄一郎、平野真弓、佐々木富男、平野勝也

アルガトロバンとビタミン C の併用はくも膜下出血後のトロンビンに対する攣縮反応性亢進を予防する  
第 63 回日本薬理学会西南部会 2010 年 11 月 26 日 かごしま県民交流センター (鹿児島)

5. Sasaki T

Proposed Mechanism of Cerebral Vasospasm: Our Hypothesis and Current Topics  
11th International Conference on Neurovascular Events after SAH (Vasospasm 2011) 2011 年 7 月 21 日 Cincinnati (Ohio, USA)

6. Kikkawa Y, Matsuo S, Kameda K, Nakamizo A, Sasaki T

Potentiation of endothelin-1-induced myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitization following subarachnoid hemorrhage

11th International Conference on Neurovascular Events after SAH (Vasospasm 2011) 2011 年 7 月 21 日 Cincinnati (Ohio, USA)

7. Kameda K, Kikkawa Y, Matsuo S, Nakamizo A, Sasaki T

The combination of argatroban and vitamin C normalizes the increased vascular contractile response after subarachnoid hemorrhage

11th International Conference on Neurovascular Events after SAH (Vasospasm 2011) 2011 年 7 月 21 日 Cincinnati (Ohio, USA)

8. 吉川雄一郎、松尾諭、亀田勝治、中溝玲、佐々木富男

くも膜下出血後ウサギ脳血管のエンドセリン 1 に対する攣縮性増大メカニズム  
第 27 回スパズムシンポジウム 2011 年 7 月 31 日 京都国際会議場 (京都)

9. 吉川雄一郎、松尾諭、亀田勝治、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

くも膜下出血後ウサギ脳血管のエンドセリンに対する攣縮装置のカルシウム感受性増大メカニズム  
第 70 回日本脳神経外科学会総会 2011 年 10 月 14 日 パシフィコ横浜 (横浜)

10. 松尾諭、吉川雄一郎、外間政朗、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

くも膜下出血後ウサギ脳血管における発現変動遺伝子の機能解析  
第 70 回日本脳神経外科学会総会 2011 年 10 月 14 日 パシフィコ横浜 (横浜)

11. Kameda K, Kikkawa Y, Hirano M, Matsuo S, Sasaki T, Hirano K

Oxidative Stress Impairs Desensitization of the G-protein Coupled Receptors (GPCRs) and Increases Vascular Reactivity by Prolonging the Contractile Responses in the Cerebral Arteries after Subarachnoid Hemorrhage

Scientific Sessions 2011 of the American Heart Association 2011 年 11 月 16 日 Orlando (Florida, USA)

12. 松尾諭、吉川雄一郎、外間政朗、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

くも膜下出血後ウサギ脳血管における発現変動遺伝子の機能解析～くも膜下出血後脳血管における遺伝子発現 profile～  
第 4 回九州 CVD カンファレンス 2011 年 11 月 19 日 ホテルニューオータニ福岡 (福岡)

13. 吉川雄一郎、松尾諭、亀田勝治、平野真弓、佐々木富男、平野勝也

くも膜下出血ウサギ脳底動脈における受容体活性および攣縮装置のカルシウム感受性

に対するフィードバック調節機構の障害  
第64回日本薬理学会西南部会 2011年11月  
20日 KKR博多(福岡)

14. Kikkawa Y, Hirano K, Matsuo S, Kameda K, Nakamizo A, Sasaki T  
Potentiation of Endothelin-1-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of Myofilament after subarachnoid hemorrhage  
International Stroke Conference 2012  
2012年2月1日 New Orleans (Louisiana, USA)

15. 吉川雄一郎、松尾諭、亀田勝治、平野真弓、佐々木富男、平野勝也  
くも膜下出血後のエンドセリンによる筋フィラメントのカルシウム感受性亢進の増強作用とその機序  
第85回日本薬理学会年会 2012年3月14日 京都国際会議場(京都)

16. 吉川雄一郎、松尾諭、森恩、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男  
超高解像度256列MDCTを用いたウサギくも膜下出血モデルの攣縮血管径評価  
第28回スパズムシンポジウム 2012年4月26日 福岡国際会議場(福岡)

17. 松尾諭、吉川雄一郎、外間政朗、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男  
くも膜下出血後ウサギ脳血管における遺伝子発現プロファイリング  
第28回スパズムシンポジウム 2012年4月26日 福岡国際会議場(福岡)

18. 吉川雄一郎、松尾諭、黒木亮太、森恩、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男  
超高解像度256列MDCTを用いたウサギくも膜下出血モデルの脳血管攣縮評価  
第71回日本脳神経外科学会総会 2012年10月14日 大阪国際会議場(大阪)

19. 松尾諭、吉川雄一郎、外間政朗、黒木亮太、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男  
ウサギ SAH モデルの脳血管における遺伝子発現の経時的変化とその意義  
第71回日本脳神経外科学会総会 2012年10月14日 大阪国際会議場(大阪)

20. 松尾諭、吉川雄一郎、黒木亮太、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男  
ウサギくも膜下出血後脳血管における relaxin の発現とその意義  
第29回スパズムシンポジウム 2013年3月20日 グランドプリンスホテル新品川(東京)

21. 黒木亮太、吉川雄一郎、松尾諭、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男  
くも膜下出血後ウサギ脳血管における細胞外基質関連タンパク質の発現とその役割  
第29回スパズムシンポジウム 2013年3月20日 グランドプリンスホテル新品川(東京)

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木富男(九州大学・医学研究院・教授)  
研究者番号：10134561

(2) 研究分担者

溝口昌弘(九州大学・大学病院・講師)  
研究者番号：50380621  
吉本幸司(九州大学・大学病院・講師)  
研究者番号：70444784  
中溝玲(九州大学・医学研究院・講師)  
研究者番号：80529800  
吉川雄一郎(九州大学・大学病院・助教)  
研究者番号：80423515  
宮城靖(九州大学デジタルメディシンイニシアティブ 准教授(～2010年9月30日))  
研究者番号：10380403

(3) 連携研究者  
該当なし