

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15559

研究課題名(和文)脳血管攣縮の治療標的分子の同定

研究課題名(英文)Identification of therapeutic target molecules against cerebral vasospasm

研究代表者

森田 知佳 (Morita, Tomoka)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70763796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織・生体レベルで血管攣縮因子であるSPCがFyn/分子X/Rhoキナーゼ経路を介して血管異常収縮を惹起するか検証した。

マウス脳底動脈の等尺性収縮張力測定法、脳血管攣縮モデル作製法を確立した。野生型マウスの脳底動脈はSPC累積投与により濃度依存性に収縮した。週齢や性差は10 uM SPC単回投与による収縮に影響しなかった。Fyn KOマウスの脳底動脈の10 uM SPC単回投与による収縮は野生型マウスと比べ変化なかった。分子XのコンディショナルKOマウスの脳底動脈は野生型マウスと比べSPC誘発収縮の減弱傾向があったが更なる検討を要する。SPC誘発血管収縮はFynを介する以外の経路が存在する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの脳の動脈は極く微小であるためにその等尺性収縮張力の測定は世界的にも限られた研究室でしか実施されていなかったが、本研究において研究代表者はマウス脳底動脈の等尺性収縮張力測定法を確立した。またマウス脳血管攣縮モデルを作製することに成功した。これらの系の確立によって脳血管組織レベル・生体レベルでの検証を可能にし、脳血管攣縮メカニズム・治療標的・治療薬研究を可能にした。さらに本研究ではSPCによる血管異常収縮経路として既存であるFynを介する経路以外も検証する必要があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate whether a vasospasmogen, SPC could induce the abnormal contraction via Fyn/molecule X/Rho kinase signaling pathway in the tissue level or in vivo. In this study, we established both the measurement of isometric tension with mice's basilar artery and the vasospasm model. The cumulative application of SPC induced contraction in a dose-dependent manner in the basilar arteries of wild-type mice. The SPC (10 uM, single dose)-induced contraction was not affected by the sex and age. The SPC (10 uM, single dose)-induced contraction in the basilar arteries did not change between Fyn KO mice and wild-type mice. The SPC-induced contraction in basilar arteries were slightly decreased in molecule X conditional KO mice than in wild-type mice, however, it is required for further studies. In conclusion, other signaling pathways except for Fyn also contribute to the SPC-induced abnormal contraction.

研究分野：血管

キーワード：脳血管攣縮 マウス 脳底動脈 等尺性収縮張力 脳血流測定 スフィンゴシルホスホリルコリン 血管平滑筋

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患やくも膜下出血 (SAH) 後の脳血管攣縮などの疾患による死亡数は年間 7 万人以上にのぼる (厚生労働省 HP、令和 2 年 [2020] 人口動態月報年計 [概数] の概況)。これらの疾患は、急性発症の血管攣縮、血管平滑筋の異常収縮により起こると考えられている。SAH の 6-7 割がウィリス動脈輪を中心に発生し、SAH 後 4-14 病日に本部位を中心に発生する脳底部主幹動脈の狭窄は、遅発性脳血管攣縮 (Delayed cerebral vasospasm: DVS) と呼ばれ、患者の死亡や重篤な精神・身体的後遺症の原因となる。これまでに国内外で DVS の病因・メカニズムを解明しようと長年にわたり様々な研究が行われてきたが、現在もその全貌の解明には至っていない。

副作用なく SAH 後の DVS を治療するためには、DVS 特異的なシグナル経路を解明することが必須である。これまでに Ca^{2+} 非依存性の異常収縮を引き起こす血管攣縮因子の一つとして、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) が知られており、そのシグナル経路として SPC/Fyn/新規分子 X/Rho キナーゼ経路が知られていた。しかし SPC と Rho キナーゼを結ぶ Fyn と新規分子 X が、組織・生体レベルにおいて SAH 後の DVS を惹起するかの直接的な証拠はなかった。

2. 研究の目的

本研究では『野生型および 2 種類の遺伝子改変マウスの脳底動脈と SAH モデルを用いて、組織・生体レベルで、SPC/Fyn/新規分子 X/Rho キナーゼ経路が SAH 後 DVS の治療標的分子である可能性について検討する事』を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス脳底動脈および前腸間膜動脈の等尺性収縮張力の測定

① Ca^{2+} を加えていない Krebs 液を氷冷し 5% CO_2 と 95% O_2 でバブリングした。マウスをイソフルラン深麻酔後、断頭により安楽死させ、頭蓋骨を外した後、抜脳した。脳はただちに Ca^{2+} を加えていない Krebs 液に移し、4 mm 程度の長さの脳底動脈を摘出した。摘出した脳底動脈の外膜/くも膜を除去し、半分の長さに切った。これにより 2 mm 程度の 2 つの脳底動脈サンプルが得られる。次にワイヤーミオグラフ (DMT610M) のチャンバーに Ca^{2+} を加えていない Krebs 液を 5 mL 加え、用意した脳底動脈の管内に 2 本の直径 25 μm のワイヤーを通し、脳底動脈をチャンバー内に設置した。Krebs 液を灌流しチャンバー内の液を交換後、静止張力を 0.85 mN に設定し、15-20 分安定化させた。その後、一酸化窒素合成酵素阻害薬である L-NAME (100 μM) を 15 分間処置した。100 μM L-NAME 存在下、60 mM K^+ による収縮を 100% として SPC による収縮張力を測定した。

② 前腸間膜動脈は直径 45 μm のワイヤーを用いてワイヤーミオグラフへ設置された。静止張力は、徐々に張力をあげながら 80 mM K^+ による収縮張力を測定し、その収縮張力が最大となるポイントを静止張力とした。等尺性収縮張力は 100 μM L-NAME 存在下、80 mM K^+ による収縮を 100% として SPC による収縮張力を測定した。

(2) 脳血管攣縮モデルの作製とオメガゾーンによる脳血流の測定

野生型マウスは isoflurane により導入麻酔をかけた後、MMF 麻酔 (midazolam (5 mg/kg)、medetomidine (0.5 mg/kg)、fentanyl (0.05 mg/kg)) を腹腔内投与した。痛覚反射・正向反射の消失後、頭頂部の皮膚を正中切開し、頭蓋骨を露出した。露出した頭蓋骨の上に乾燥防止のため生理食塩水を垂らした後に、露出した頭蓋骨にラップをかけた。その後、マウスを 2 次元レーザー血流画像装置 OMEGAZONE のカメラとレーザーユニット下、小動物体温保持装置 & モニター装置 BWT-100 の保温マットの上に腹臥位で配置し、直腸温を測定し、体温を 37 $^{\circ}C$ 付近で維持した。中大脳動脈灌流域付近の脳血流量を約 2 分間測定し、その後、頭頂部の皮膚を縫合した。背側の頭頸部の皮膚を正中切開し、環椎後頭膜の剖出後、マウスを仰臥位にし、頸部の皮膚を切開し外頸静脈を露出した。自家血 0.2 mL を採取した。腹臥位に体位を変換後、環椎後頭膜を 34G 針で穿孔し、大槽付近の脳脊髄液を綿棒で吸収した。その後 0.06 mL の自家血を大槽内にゆっくりと注入した。血液がクモ膜下腔にとどまるように頭部を 10 分間下げた後、皮膚を縫合した。その約 6 時間後、同マウスに前述同様に MMF 麻酔を処置し脳血流を測定した。

4. 研究成果

(1) ①野生型マウスの脳底動脈は 10 nM - 30 μM SPC 累積投与によって濃度依存性に収縮を惹起し、Vehicle Control と比較して 10 μM において SPC は有意に収縮を惹起した (10 μM SPC: 47.8 ± 4.8 %, Vehicle control: 22.7 ± 9.0 %). SPC 誘発収縮の雌雄差はなかった。また SPC 誘発収縮の週齢差はなかった (6-44 週齢)。

②野生型マウスを用いた血管攣縮モデルにおいて、自家血注入前、自家血注入約 6 時間後に、2 次元レーザー血流画像装置を用いて中大脳動脈灌流域周囲の脳血流量を測定した。自家血注入後の脳血流量は、注入前に比べて有意に低下した (n=6)。

(2) ①これまでに SPC 処置により Fyn は膜へトランスロケーションすることが知られており、その後 Rho キナーゼが活性化することによって異常収縮が引き起こされると考えられていた。したがって Fyn KO マウスの血管は SPC 誘発収縮を惹起しないと予想された。しかしながら Fyn KO マウスの脳底動脈は 10 μM SPC 単回投与によって収縮を惹起した (図 2)。そしてその程度は野生型マウスと変化がなかった [(野生型: 46.5 ± 3.44, n=50)、(Fyn KO: 37.8 ± 7.02, n=12)]。脳底動脈はその緊張度が変化しやすく水位の変化や温度といった刺激にも敏感に反応し、安定した測定をすることが難しいため、次に前腸間膜動脈を用いて SPC 誘発収縮を検討した。野生型マウスにおいて、10 μM SPC は収縮を惹起し (野生型: 111.7 ± 18.5%, 54-65 週齢、n = 5-6)、Fyn KO マウスにおいても同様であり有意な差は見られなかった (Fyn KO: 109.8 ± 9.67%, 53-56 週齢、n=4)。このように Fyn KO マウスの動脈は SPC によって収縮することが明らかとなった。

②エイコサペンタエン酸 (EPA) は Fyn の膜へのトランスロケーションを抑制することによって血管の異常収縮を抑制すると考えられてきた。もしこの EPA の作用によってのみ血管異常収縮を抑制するならば、EPA は Fyn KO マウスの SPC 誘発収縮を抑制できないと考えられた。そこで Fyn KO マウスの前腸間膜動脈に 30 μM EPA を前処置したところ、SPC 誘発収縮を有意に抑制した (SPC: 92.5 ± 17.9 %, SPC+EPA: 7.38 ± 2.02%)。

③Tamoxifen 投与により新規分子 X のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。Tamoxifen 投与後約 30 日後-約半年後、脳底動脈・前腸間膜動脈を採取し、それぞれ動脈において、Tamoxifen 処置群は非処置群と比較し SPC 誘発収縮を比較検討したが、今後も例数を重ねて検討する必要がある。

(4) 以上の結果より、組織レベルにおいて、SPC 誘発収縮には Fyn を介する経路のみではなく他の経路も関与している可能性が高い。今後の展望として実際に Fyn をはじめとする Src Family kinases (SFK) が本経路に真に作用しているかどうか検証するためには、活性化型 Csk を発現する血管平滑筋を用いて SPC 誘発収縮が観察されるか検証する必要がある。SFK は 10 種のメンバーが存在するため、血管平滑筋で発現している SFK を同定しそれらの血管異常収縮に及ぼす影響を検討する必要がある。

マウスの脳の動脈は極く微小であるためにその等尺性収縮張力の測定は世界的にも限られた研究室でしか実施されていなかったが、本研究において研究代表者はマウス脳底動脈の等尺性収縮張力測定法を確立し、マウス脳血管攣縮モデルを作製することに成功した。これまでにマウスを用いた SPC の血管収縮反応性についての報告は 1 報のみ (Hedemann J., et al, Auton Autacoid Pharmacol. 2004)、腸管近傍の腸間膜動脈が用いられたが、その SPC に対する反応性は比較的小さく、マウスを用いて血管攣縮のメカニズムを追求する事は困難と考えられてきたが、本実験系をもちいることにより血管異常収縮および血管攣縮の分子メカニズムを組織・生体レベルで検証できるようになった。またプレリミナリーなデータではあるが、前腸間膜動脈の SPC に対する反応性は週齢によって変化する可能性が示唆された。おそらくこれは脳コレステロール代謝と末梢コレステロール代謝の相違に起因するものと考えられ、末梢側の血管を使用する場合には LDL 受容体 KO マウスや ApoE KO マウスを用いる工夫が必要と考えられた。

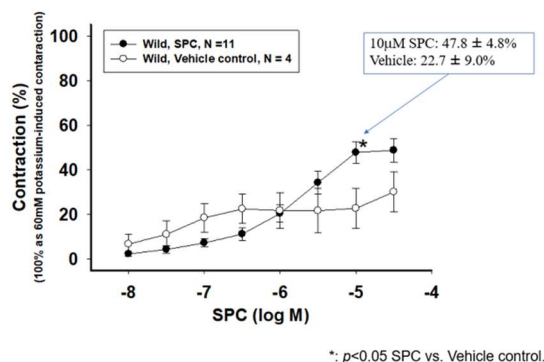


図 1 SPC は野生型マウス脳底動脈において濃度依存性に収縮を惹起する

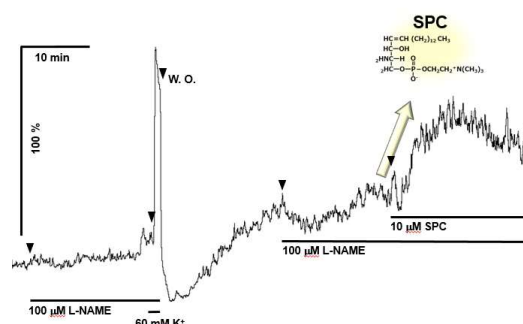


図 2 Fyn KO マウスの脳底動脈は SPC によって収縮する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計30件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森田 知佳、張 影、岸 博子、小林 誠
2. 発表標題 Fynノックアウトマウスの脳底動脈はsphingosylphosphorylcholineにより収縮する
3. 学会等名 第98回日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 知佳、張 影、岸 博子、小林 誠
2. 発表標題 Fyn KOマウスの脳底動脈と前腸間膜動脈のスフィンゴシルホスホリルコリンに対する反応性について
3. 学会等名 第63回 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第63回日本平滑筋学会総会 一般演題賞受賞

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------