

平成 22 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18209045
 研究課題名（和文）脳血管攣縮における PAR-1 の機能解析、および新規 G 蛋白質共役受容体の検索
 研究課題名（英文）Functional analysis of PAR-1 and search for novel G protein-coupled receptors in cerebral vasospasm
 研究代表者 佐々木 富男（SASAKI TOMIO）
 九州大学 大学院医学研究院 教授
 研究者番号：10134561

研究成果の概要（和文）：くも膜下出血（SAH）後のウサギ脳血管では、トロンビン受容体（PAR-1）の発現及びトロンビンに対する血管収縮反応性が亢進した。PAR-1 拮抗薬の予防投与は、SAH における PAR-1 の発現及びトロンビン反応性を低下させた。SAH では、トロンビンによる PAR-1 の活性化が PAR-1 の発現亢進を引き起こし、その結果トロンビンに対する収縮反応性が増大している可能性が示唆された。こうした受容体の発現亢進及び受容体に対するアゴニスト収縮反応性の増大は、さまざまな G 蛋白質共役型受容体及びそのアゴニストにおいても観察された。

研究成果の概要（英文）：The expression of PAR-1 was up-regulated and the contractile response to thrombin was markedly enhanced in the cerebral artery of rabbit subarachnoid hemorrhage (SAH) model. The intrathecal administration of a PAR-1 antagonist prevented the up-regulation of PAR-1 and the enhancement of the contractile responses to thrombin after SAH. Following SAH, thrombin activates PAR-1, thereby up-regulating the expression of PAR-1, which culminates in the increased contractile response to thrombin in the rabbit cerebral artery. The up-regulation of the receptor expression and the enhancement of the agonist-induced contraction were observed in various G protein-coupled receptors and these agonists.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	22,100,000	6,630,000	28,730,000
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学、脳血管攣縮、くも膜下出血、血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮は、くも膜下出血後数日を経て遅発性に生じる脳動脈の狭窄である。脳動脈狭

窄による脳虚血はさまざまな神経脱落症状を引き起こし、死亡率は 30% にのぼる。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い。脳血管攣縮の発症メカニズムは、攣縮誘発物質の産生増大および血管収縮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。これまで多くの物質が攣縮誘発物質として提唱されており、髄液中もしくは血中での増加や、動物モデルにおける強力な血管収縮作用が報告されている。一方、血管収縮反応性の増大は血管内皮障害あるいは平滑筋収縮性亢進に起因すると考えられる。収縮装置のカルシウム感受性増大やアゴニスト受容体の発現亢進は、平滑筋収縮性亢進に大きく関与していると考えられる。(論文3)

2. 研究の目的

くも膜下出血後の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

ウサギくも膜下出血モデル脳底動脈を用いた、張力細胞質カルシウム濃度同時測定、免疫プロット法による受容体の発現解析、ミオシン軽鎖リン酸化レベル測定、等尺性張力測定。選択的トロンビン拮抗薬 E5555 投与による治療モデルの作成および、張力測定および PAR-1 発現解析による治療効果の検討。

4. 研究成果

本研究ではまず、ウサギくも膜下出血モデルを用いてカルシウム-張力同時測定を行い、正常血管ではほとんど収縮作用を示さないトロンビンに対して、くも膜下出血後には攣縮反応性が誘導されることを明らかにした。(論文1) また、トロンビンに対する収縮反応性の亢進はトロンビン受容体 (PAR-1) の発現亢進を伴うことも証明した。(論文1, 論文2) さらに、選択的 PAR-1 拮抗薬の投与により、PAR-1 の発現亢進とトロンビンに対する収縮反応性の亢進が予防できることを初めて明らかにした。(論文2) すなわち、『くも膜下出血により髄液中のトロンビン活性が上昇し、その結果、脳血管平滑筋における PAR-1 の発現が亢進し、トロンビンに対する収縮反応性が亢進する』ことが、血管攣縮発症に重要な役割を果たすと考えられた。くも膜下出血の病態の基本は出血であり、出血により髄液中のトロンビン量は著しく上昇する。この点からも、トロンビンとその受容体 PAR-1 が関わる血管収縮反応性の増大が、脳血管攣縮発症に第一義的な役割を果たすと考えられる。

また、本研究の主題である新規 G 蛋白質共役型受容体の検索を行うにあたり、まず、そのリガンドとなりうる新しい攣縮誘発物質の検索を行った。その中で、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 Platelet-derived growth factor (PDGF) に対して、くも膜下出血後には攣縮反応性が誘導されることを初めて明らかにした。(論文4) また、この収縮機序にはカルシウム感受性増大作用をほとんど伴わないことを証明した。(論文4)

さらに我々は、フェニレフリンやエンドセリン1に対する収縮反応性も増大し、これに伴い、 α 1-アドレナリン受容体および ET_A 受容体の発現も亢進することを明らかにした。

(論文5) また、ウサギ脳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、くも膜下出血後脳血管では認められないことを明らかにした。(論文5)

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。また、トロンビン長時間刺激において認められた一過性から持続性への収縮性変化は、くも膜下出血後に収縮シグナルの調節機構において何らかの変化が生じている可能性を示唆するものであり、今後、くも膜下出血後脳血管平滑筋における細胞内収縮シグナル調節機構に関するさらなる基礎研究が必要である。

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)

Maeda Y, Hirano K, Kai Y, Hirano M,

Suzuki SO, Sasaki T, Kanaide H.

Up-regulation of proteinase-activated receptor 1 and increased contractile responses to thrombin after subarachnoid haemorrhage. *Br J Pharmacol*.

2007;152:1131-9. (論文1)

Kai Y, Hirano K, Maeda Y, Nishimura J,

Sasaki T, Kanaide H. Prevention of the

hypercontractile response to thrombin by proteinase-activated receptor-1 antagonist in subarachnoid hemorrhage. *Stroke*.

2007;38:3259-65. (論文2)

Kai Y, Maeda Y, Sasaki T, Kanaide H, Hirano K. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: the role of thrombin receptor in cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *J Pharmacol Sci*. 2008;108:426-32. (論文3)

Maeda Y, Hirano K, Hirano M, Kikkawa Y, Kameda K, Sasaki T, Kanaide H. Enhanced contractile response of the basilar artery to platelet-derived growth factor in subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2009;40:591-6. (論文4)

Kikkawa Y, Kameda K, Hirano M, Sasaki T, Hirano K. Impaired feedback regulation of the receptor activity and the myofilament Ca^{2+} sensitivity contributes to increased vascular reactivity after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* (in press) (論文5)

前田 善久, 甲斐 康稔, 宮城 靖, 詠田 眞治, 佐々木 富男. クモ膜下出血後の脳底動脈における血小板由来増殖因子による収縮機序の検討. *脳血管攣縮* 23 (脳卒中の外科 35(supple)) : 38-40, 2007

甲斐 康稔, 前田 善久, 宮城 靖, 詠田 眞治, 佐々木 富男. トロンピン受容体拮抗薬 E5555 の受容体特異性評価およびくも膜下出血後の脳底動脈収縮性亢進に対する予防効果. *脳血管攣縮* 23 (脳卒中の外科 35(supple)) : 45-48, 2007

甲斐 康稔, 平野 勝也, 亀田 勝治, 吉川

雄一郎, 前田 善久, 宮城 靖, 詠田 眞治, 佐々木 富男. ウサギ脳底動脈の Endothelin-1 における G_q 蛋白質の関与. *脳血管攣縮* 24 (脳卒中の外科 36(supple)) : 29-32, 2008

吉川 雄一郎, 平野 勝也, 亀田 勝治, 甲斐 康稔, 宮城 靖, 溝口 昌弘, 庄野 禎久, 佐々木 富男. くも膜下出血ウサギ脳底動脈における G 蛋白質共役型受容体脱感作機構の障害. *脳血管攣縮* 25 (脳卒中の外科 37 (supple)) in press.

亀田 勝治, 吉川 雄一郎, 甲斐 康稔, 前田 善久, 宮城 靖, 佐々木 富男. クモ膜下出血後脳血管収縮性亢進に対するトロンピン阻害剤アルガトロバンの予防効果. *脳血管攣縮* 25 (脳卒中の外科 37(supple)) in press.

[学会発表](計12件)
甲斐 康稔, 前田 善久, 宮城 靖, 詠田 眞治, 佐々木 富男. くも膜下出血後脳底動脈におけるトロンピン受容体発現と収縮性亢進に対するトロンピン受容体拮抗薬の役割. 第65回日本脳神経外科学会総会 京都 2006年10月

前田 善久, 甲斐 康稔, 宮城 靖, 佐々木 富男. ウサギクモ膜下出血モデルにおける血小板由来増殖因子による収縮反応の検討. 第23回スバズムシンポジウム 福岡 2007年3月

甲斐 康稔, 前田 善久, 宮城 靖, 詠田 眞治, 佐々木 富男. トロンピン受容体拮抗薬 E5555 の作用特性とくも膜下出血における脳底動脈収縮性亢進に対する予防効果. 第23回スバズムシンポジウム 福岡 20

07年3月

甲斐 康稔、亀田 勝治、吉川 雄一郎、前田 善久、宮城 靖、詠田 眞治、佐々木 富男 . ウサギ脳底動脈における Endothelin-1 収縮への Gαq の関与の検討
第24回スパズムシンポジウム 京都 2008年3月

甲斐 康稔、前田 善久、佐々木 富男、金出 英夫、平野 勝也 . シンポジウム「プロテイナーゼ活性化型受容体の基礎と臨床：新たな治療標的としての可能性を探る」
第81回日本薬理学会年会 横浜 2008年3月

亀田 勝治、吉川 雄一郎、甲斐 康稔、前田 善久、宮城 靖、佐々木 富男 . クモ膜下出血後脳血管収縮性亢進に対するトロンピン阻害剤アルガトロパンの予防効果
第25回スパズムシンポジウム 松江 2009年3月

吉川 雄一郎、亀田 勝治、甲斐 康稔、溝口 昌弘、庄野 禎久、佐々木 富男 . くも膜下出血ウサギ脳底動脈における G 蛋白質共役型受容体脱感作機構の障害 .
第25回スパズムシンポジウム 松江 2009年3月

亀田 勝治、吉川 雄一郎、甲斐 康稔、前田 善久、宮城 靖、佐々木 富男 . トロンピン阻害剤と抗酸化剤の併用によるくも膜下出血後脳底動脈のトロンピンに対する収縮反応性亢進の新しい機序 .
第68回日本脳神経外科学会総会 東京 2009年10月

吉川 雄一郎、亀田 勝治、宮城 靖、溝口 昌弘、庄野 禎久、佐々木 富男 . 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低分子量 G 蛋白質を介したシグナルに対するフィードバック調節機構の障害 .
第68回日本脳神経外科学会総会 東京 2009年10月

吉川 雄一郎、亀田 勝治、宮城 靖、溝口 昌弘、庄野 禎久、佐々木 富男 . くも膜下出血後の脳血管平滑筋収縮におけるフィードバック調節機構の障害 .
第6回九州山口脳循環代謝フォーラム 福岡 2009年12月

亀田 勝治、吉川 雄一郎、平野 真弓、佐々木 富男、平野 勝也 . トロンピン阻害剤と抗酸化剤の併用は、くも膜下出血後の脳底動脈の収縮反応性亢進を正常化する .
第83回日本薬理学会年会 大阪 2010年3月

吉川 雄一郎、亀田 勝治、平野 真弓、佐々木 富男、平野 勝也 . 受容体シグナルおよび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はくも膜下出血後の血管反応性を亢進させる .
第83回日本薬理学会年会 大阪 2010年3月

〔図書〕(計1件)
詠田眞治、佐々木富男. くも膜下出血. 必携脳卒中ハンドブック 編集：田中耕太郎、高嶋修太

〔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 大学院医学研究
院 教授）

研究者番号：10134561

(2) 研究分担者

庄野 禎久（九州大学大学院医学研究院
脳神経外科学 准教授）

研究者番号：00346793

溝口 昌弘（九州大学大学病院脳神経外
科学 講師）

研究者番号：50380621

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）

研究者番号：10380403

前田 善久（九州大学大学病院 助手
（～2007年3月））

研究者番号：30380455

(3) 連携研究者

該当なし