

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390409

研究課題名(和文) ライブセルイメージングによる脳微小循環制御機構の解明と麻酔薬及び遺伝子治療の研究

研究課題名(英文) Analysis of cerebral microcirculatory regulation in relation to anesthetics and gene therapy using the live-cell imaging

研究代表者

木下 浩之 (KINOSHITA HIROYUKI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70291490

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学

1. 研究計画の概要

本研究は、1) 脳の電氣的活動に伴う脳実質内微小循環の血流増大におけるアストロサイトの関与のうち、アストロサイト自身および脳微小血管平滑筋細胞のカルシウムあるいはカリウムチャンネル、一酸化窒素合成酵素や Rho-キナーゼ活性は重要な役割を果たすか否か、2) 脳微小血管攣縮には、カルシウムおよびカリウムチャンネル、一酸化窒素合成酵素や Rho-キナーゼ活性の変化が関与しているか否か、3) 麻酔薬による脳血管攣縮改善作用には麻酔薬間で相違があり、これはカルシウムあるいはカリウムチャンネル活性、一酸化窒素合成酵素活性、Rho-キナーゼのターゲティング機構に及ぼす麻酔薬作用の違いを反映しているか否か、4) Rho-キナーゼのターゲティング機構を制御する部位を抑制する siRNA のくも膜下投与は、くも膜下出血モデル動物の脳血流制御機構を回復させ、脳神経学のおよび生命予後を改善するか否かという 4 つの仮説を薬理学的手法のほか、細胞内のイオンあるいは活性化シグナルの移動や膜電位の変化をリアルタイムでとらえるライブイメージング法、さらには病態モデルや遺伝工学的手法を用いて明らかにするものである。

2. 研究の進捗状況

ビブラトームを用いて、ラット脳スライス標本(厚さ約 150 μm)を作成した。ついで、顕微鏡(オリンパスIX71-23DIC)でスライス標本内の脳実質内動脈(外径約 15-20 μm , 内径約 5-10 μm)を観察した。動脈の画像を現有の CCD カメラで撮影し、コンピュータに取り込んで、動脈径の変化をコンピュータ上で血管径測定用のソフトウ

エアを用いて解析した。先端径 25 μm の concentric bipolar 電極(FHS社製)を用いて、脳スライスを 400 μA で 20 秒間、刺激装置(DPS-07)で電気刺激した。電気刺激により、刺激中は血管収縮反応が、刺激後は逆に血管拡張反応が認められた。これら電気刺激による血管収縮および拡張反応は、テトロドトキシン(10^{-6} mol/L)で完全に抑制された。拡張反応は、一酸化窒素合成酵素阻害薬である L-NAME (3×10^{-4} mol/L) で完全に抑制された。したがって、この拡張反応には、神経細胞あるいは血管内皮細胞で合成された一酸化窒素が関与するものと考えられた。さらに 20-HETE 合成酵素阻害薬 HET0016 (10^{-5} mol/L) は電気刺激中の収縮反応を抑制した。外因性の 20-HETE (10^{-8} から 10^{-6} mol/L) も同様に脳実質内細動脈を収縮させた。現有の共焦点顕微鏡 FV300 でスーパーオキシドの測定のため、脳スライスをヒドロエチジン (2×10^{-6} mol/L) に 20 分間暴露した後、20-HETE (10^{-6} mol/L) を付加したところ、時間依存性にスーパーオキシドが発生し、この産生は、NADPH オキシダーゼ阻害薬 gp91ds-tat (10^{-6} mol/L) で抑制された。これらの結果から、20-HETE は、脳実質内微小血管で、スーパーオキシドを産生し、これらの血管を収縮させることが明らかになった。さらにこのスーパーオキシドの産生に、NADPH オキシダーゼの関与が示唆された。次いで、興奮性アミノ酸 NMDA (10^{-7} - 10^{-5} mol/L) を脳スライスに付加したところ脳微小血管の拡張反応が観察された。この拡張反応は、神経型一酸化窒素合成酵素抑制薬 SMTc (10^{-5} mol/L) で抑制され、臨床使用濃度のプロポフォル (3 \times

10^{-7} - 10^{-6} mol/L)で強く抑制された。現在その機序を検討するため、ヒドロエチジン (2×10^{-6} mol/L) を20分間暴露してNMDAによりスーパーオキシドが発生するか否かを検討している。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している
(理由)

現在までに、電気薬理学的手法を用いて麻酔薬の作用を含む多くの結果を得て、論文、学会に発表できた。一方で、FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) および脳室内 siRNA 投与については現在準備中であり、やや遅れがある。

4. 今後の研究の推進方策

当初計画していたFRETおよび脳室内 siRNA 投与については現在準備中であるが、脳室内に薬剤を投与しその効果をみるまでには時間がかかる可能性がある。まず脳室内への各種薬剤投与により、摘出後の脳スライス中の血管反応がどのように変化するかを観察する方法も考慮する予定である。

5. 代表的な研究成果

(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4件)

1. Haba M, Kinoshita H, Matsuda N, Azma T, Hama-Tomioka K, Hatakeyama N, Yamazaki M, Hatano Y: The beneficial effect of propofol on arterial adenosine triphosphate-sensitive K^+ channel function impaired by thromboxane. *Anesthesiology* 2009; 111: 279-286、査読あり

2. Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Azma T, Nakahata K, Matsuda N, Hatakeyama N, Kikuchi H, Hatano Y: The role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in cerebral arteriolar constriction and the inhibitory effect of propofol. *Anesth Analg* 2009; 109: 1935-1942、査読あり

3. Nakahata K, Kinoshita H, Azma T, Matsuda N, Hama-Tomioka K, Haba M, Hatano Y: Propofol restores brain microvascular function impaired by high glucose via the decrease in oxidative stress. *Anesthesiology* 2008; 108: 269-275、査読あり

4. Nakahata K, Kinoshita H, Hama-Tomioka K, Ishida Y, Matsuda N, Hatakeyama N, Haba M, Kondo T, Hatano Y: Cholinesterase inhibitor donepezil dilates cerebral parenchymal arterioles via the activation

of neuronal nitric oxide synthase. *Anesthesiology* 2008 109:124-129、査読あり

[学会発表] (計5件)

1. Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Hatano H: The role of NMDA receptors in rat cerebral microvessel dilation and the inhibitory effect of propofol, 2010 Annual Meeting of the International Anesthesia Research Society, March 20-23, 2010, Honolulu, Hawaii, USA

2. Kinoshita H, Hatakeyama N, Hatano Y: The Role of Superoxide in 20-HETE-Induced Vasoconstriction and the Effect of Propofol in the Brain, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 17-21, 2009, New Orleans, LA, USA

3. Hama-Tomioka k, Kinoshita H, Nakahata K, Hatakeyama N, Hatano Y: The inhibitory effect of propofol on the cerebral microvessel function via neurovascular coupling, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 18-22, 2008, Orlando, FL, USA

4. Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Hatakeyama N, Hatano Y: The role of 20-HETE in the cerebral microvessel function as consequences of neurovascular coupling, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 18-22, 2008, Orlando, FL, USA

5. Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Nakata R, Hatano Y: Constriction Followed by Dilation of Cerebral Microvessels as Consequences of Neurovascular Coupling, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 13-17, 2007, San Francisco, CA, USA

[図書] (計1件)

1. 木下浩之、克誠堂出版、1. 局所麻酔薬中毒の薬理-B. 心筋と血管平滑筋- 局所麻酔薬中毒・アレルギー、2008、24-39