

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007-2008
課題番号：19591659
研究課題名（和文）クモ膜下出血後のリモデリングによる主幹動脈と穿通枝の血管収縮機構の特異的機序解明
研究課題名（英文）Specific mechanism of remodeled cerebral arteries and perforators after subarachnoidal hemorrhage
研究代表者
高橋 和孝（TAKAHASHI MASATAKA）
秋田大学・医学部・助教
研究者番号：60321999

研究成果の概要：

脳血管攣縮の原因・機構において、血管平滑筋の収縮・緊張を制御することが知られているCaイオンに着目し、クモ膜下出血後のリモデリングによる主幹動脈と穿通枝の血管収縮機構の特異的機序解明を行った。しかし、クモ膜下出血モデルの作製が進まず、直接脳内用血液注入法では動物への侵襲が強いため、定位的前大脳縦裂注入モデルに変更し、脳圧モニタリング、手術手技の改善、体温の維持、麻酔法なども検討したが、安定したモデルの確立には至らなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2600000	780000	3380000
20年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

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

キーワード：クモ膜下出血 脳血管攣縮

1. 研究開始当初の背景

(1)クモ膜下出血の原因のほとんどは脳動脈瘤の破裂である。脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血において、脳虚血を引き起こす血管攣縮は臨床死亡・後遺機能障害の主因であり、医学的管理や手術手技が近年向上してい

るにもかかわらず、未解決な課題である。脳血管攣縮の原因・機構を明らかにし、予防法や治療法を確立することを目的とした研究が世界的に行われている。脳血管攣縮はクモ膜下出血の血腫によって引き起こされ、血腫からのヘモグロビンが脳血管攣縮に対して

重要な要因であることが知られているが、脳血管攣縮を引き起こす真の原因物質は不明である。多様な要因が複雑に関連しており、結果として血管平滑筋の持続的な収縮がおこると考えられている。

(2)申請者のこれまでの研究では、クモ膜下出血後の脳血管攣縮は主幹動脈には発生したがその穿通枝（直径約 10 分の 1 以下）では発生しなかった。しかし同時に、KCL による血管収縮性は主幹動脈では減少したのに対して穿通枝では増強していた

(3)クモ膜下出血の影響により、穿通枝においては主幹動脈とは全く逆のリモデリングが起きていることが示唆され、その原因としては、第一に血管の緊張・収縮を制御する Ca 制御系が変化している可能性が挙げられる。血管平滑筋細胞は、機械的刺激、血管内皮からの作用あるいは血管運動神経からの刺激を受け、収縮する。細胞内外には、1 万倍の Ca 濃度差があり、細胞外からの流入や Ca 貯蔵庫として機能している小胞体からの放出によって、平滑筋細胞内 Ca 濃度が上昇することで、血管は収縮する。細胞外からの Ca 流入経路は主に膜電位依存性 Ca チャンネルであり、L 型や T 型などがあり、両者には膜電位依存性や平均開口時間などに違いがある。血管平滑筋における膜電位依存性 Ca チャンネルでは広く L-type が存在するが、T-type, P/Q-type など存在することが報告されている。また、クモ膜下出血の小血管には R-type が発現することが報告されている⁹。また、高血圧動物モデルにおいても血管平滑筋の L-type Ca チャンネルの upregulation が報告されている。

2. 研究の目的

(1)脳血管攣縮の原因・機構を明らかにし、予防法や治療法を確立することを最終目的と

し、本研究では特に血管平滑筋の収縮・緊張を制御することが知られているCaイオンに着目し、クモ膜下出血後のリモデリングによる主幹動脈と穿通枝の血管収縮機構の特異的機序解明することを目的とした。クモ膜下出血の病態において、血管平滑筋のCa動員制御機構とCaチャンネルの分布・発現の変化、すなわち血管平滑筋のリモデリング様式が主幹動脈と穿通枝では異なり、そのため脳血管攣縮の発生に関する筋収縮・筋緊張の程度も異なるという仮説を実証したい。

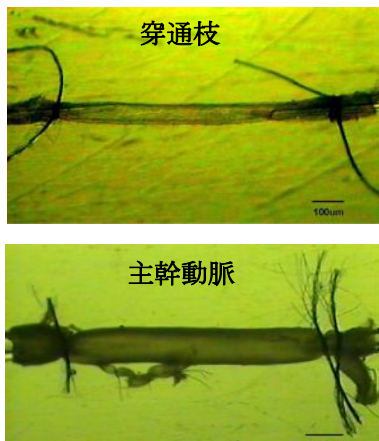
この期間内には主幹動脈と小動脈での脳血管攣縮発生の相違機構の解明のために第一に膜電位依存性Caチャンネル（L型とT型）に着目して、膜電位依存性Caチャンネルの分布・発現を主幹動脈と穿通枝において比較し、その相違点・類似点について検討したい。その結果を踏まえて、穿通枝の血管攣縮に対しての抵抗性発現機序についての研究をさらに発展させる。

穿通枝の特性や各種薬剤に対する反応性は、主幹血管群と比べても、コントロール群の穿通枝と比較しても異なっていると予想される。血管平滑筋の収縮・緊張を制御している Ca イオンの細胞内濃度はクモ膜下出血後の主幹動脈では上昇している可能性が高く、穿通枝ではコントロール群と比較して低下ないし同程度と予想している。そして、クモ膜下出血後の Ca チャンネルの分布・発現性が穿通枝と主幹動脈とでは変化していると予想される。穿通枝では脳血管攣縮が発生せず主幹動脈とは逆の収縮性の増大という血管リモデリングの発生機序を解明することで、穿通枝にはクモ膜下出血の影響を打ち消すような機構が働いている可能性を指摘できることとなる。その解明の結果を脳血管攣縮の治療に応用することを最終目標としている。

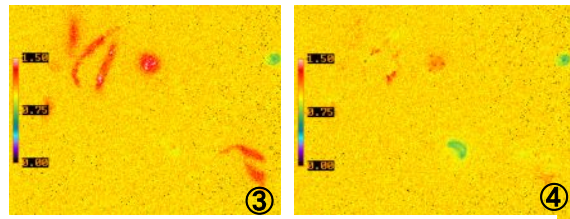
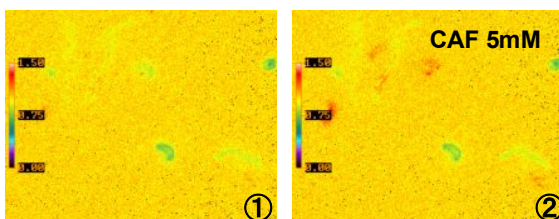
3. 研究の方法

(1)クモ膜下出血モデルの作製 SD ラットに吸入麻酔後、仰臥位で大腿動脈から自己動脈血を採取して、直接脳幹周囲あるいは大槽から 0.5mg/kg の自己動脈血を注入してモデルを作成する。モデルより脳・血管組織を摘出し、脳・脊髄を摘出して 4°C PBS で保存する。脳動脈を顕微鏡下に摘出して mRNA, Protein 解析用にはドライアイスで冷却し冷凍保存する。免疫染色標本は 4%パラフォルムアルデヒド PBS に浸し固定する。Ca イメージングおよび Pressurized artery 用には 4°C、Krebs-Henseleit 緩衝液に保存する。

(2)組織免疫学的手法による検討、RT-PCRおよび Western blotting 法による検討、Pressurized artery 法による検討、Fura-2 による Ca ライブセルイメージング法による検討を行う予定であった。



Pressureized artery 法のビデオ画像



Fura-2 による平滑筋細胞内 Ca 濃度測定法

4. 研究成果

(1)クモ膜下出血モデルの作製 はじめに SD ラットに吸入麻酔後、仰臥位で大腿動脈から自己動脈血を採取して、前方から直接 cllivus を経由して脳幹前方硬膜にアプローチする方法で直接脳幹前方から 0.5mg/kg の自己動脈血を注入してモデルを作成した。実際にこの方法を行って検討すると、アプローチの方法が動物への侵襲がつよく、死亡することが多く、安定したモデルを作製することが困難なことからこの方法を断念した。

(2)これに変わり、定位的に針を前大脳縦裂に刺入して自己動脈血を注入したモデルを作成することとした。このモデルは当初のモデルが脳底動脈に脳血管れん縮を作成するモデルであったのに対して、前頭蓋底に血液を注入するため、中大脳動脈、前大脳動脈を中心に脳血管れん縮が作成するモデルである。作成手順は体温を 37°C に保ちながら、腹腔麻酔下に SD ラット頭部を定位置置に固定する。次に穿頭術を施行し、針を前大脳縦裂に刺入する。ここで、あらかじめラット大腿動脈に確保しておいたラインから動脈血を採取して、200ul の動脈血をゆっくりと注入する方法である。

(3)このモデルにおいても、SD ラットの生存率が低かったため、低体温であることが一因と考えられたため、術中だけではなく術後の体温維持を行い死亡率は改善した。また、脳圧の亢進もラットモデルの生存に強く影響していたため、新たに脳圧モニタリング機器

を購入して、脳圧を上昇を起こさないようにしなら、モデルを作成した。

(4) その他、手術手技の改善や麻酔の変更なども行ったが最終的に安定したモデルの確立に至らず、予定していた実験が進展しなかった。

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0件)

該当なし

[学会発表] (計0件)

該当なし

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 和孝 (TAKAHASHI MASATAKA)

秋田大学・大学院医学系研究科・脳神経外
科学講座・助教

研究者番号：60321999

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし