

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790999

研究課題名 (和文) くも膜下出血後の脳血管攣縮における脂質の役割

-血管の攣縮因子と拡張因子の解明-

研究課題名 (英文) Effect of cholesterol on sphingolipid-induced cerebral vasospasm

研究代表者

白尾 敏之 (SHIRAO SATOSHI)

山口大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70448281

研究成果の概要：

ラットのcranial window modelを用いることで、スフィンゴ脂質の一つである sphingosylphosphorylcholine (SPC) がin vivoの実験系においてもRho-kinaseの活性化を介する脳血管攣縮を引き起こすことが判明した。また、高コレステロール食 (F1飼料に1%コレステロールと1%コール酸を添加) で飼育した高脂血症ラットは、SPC刺激でコントロール群 (F1飼料で飼育) よりも強い血管攣縮が認められ、SPCが引き起こす血管攣縮機構がコレステロールによって制御されている可能性も示唆された。本研究はくも膜下出血後の脳血管攣縮のメカニズムの解明につながるものである。コレステロールによる血管攣縮の制御機構の存在を示唆する結果は、脳血管攣縮発症の予測や予防的治療に強く貢献し、臨床的にも極めて大きな意義を有すると思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

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：スフィンゴ脂質、cranial window法、脳血管攣縮、くも膜下出血

## 1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血後に発症する脳血管攣縮は患者の予後を決定する重要因子である。最近

の研究の結果、脳血管攣縮のメカニズムとして血管平滑筋の病的な血管収縮機構（カルシウム非依存性収縮機構）の存在が発見さ

れた。この病的な血管収縮機構において重要な役割をはたしているのが低分子量Gタンパク質 RhoA の標的タンパク質 Rho-kinase である。申請者らはこれまで in vitro の実験系において、(1) スフィンゴ脂質の一つである sphingosylphosphorylcholine (SPC) が Rho-kinase の上流因子として血管攣縮 (カルシウム非依存性収縮) を引き起こす事、(2) 多価不飽和脂肪酸の一つであるエイコサペンタエン酸 (EPA) が脳血管の正常収縮 (カルシウム依存性収縮) に影響を与えることなく、SPC が引き起こす血管攣縮を特異的に抑制する事、(3) 主要な細胞膜脂質成分であるコレステロールが SPC-Rho-kinase 系が関与する血管攣縮機構を制御する事、を発見した (Shirao S. et al.: Circ Res., 91: 112-119, 2002, Nakao F. et al.: Circ Res., 91: 953-960, 2002, Morikage N. et al.: Circ Res., 99(3): 299-306, 2006)。また、(4) タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて髄液中の SPC 濃度を測定し、ヒトくも膜下出血患者の髄液中で SPC 濃度が有意に高値となっている事や、イヌを使用した in vivo の実験系において、(5) SPC が脳血管攣縮を引き起こす事、(6) SPC 刺激やくも膜下出血モデルで発症する脳血管攣縮が EPA によって抑制される事も報告した (Shirao S. et al.: Cerebrovasc Dis., 26(1): 30-37, 2008)。これらの結果から、くも膜下出血による髄液中の SPC 濃度の上昇が脳血管攣縮を引き起こし、発症した脳血管攣縮は EPA によって改善する可能性が強く示唆される。今後は SPC が引き起こす血管攣縮を増強する因子の解明が脳血管攣縮発症の予測や予防的治療に強く貢献すると考えられ、従って SPC-Rho-kinase 系が関与する血管攣縮機構のコレステロールによる制御を in vivo の実験系で検討することは極めて重要と思われる。

る。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の仮説、すなわち、

- ① SPC は生体内 (in vivo 系) において Rho-kinase を介する血管攣縮を引き起こす、
  - ② SPC-Rho-kinase 系が引き起こす血管攣縮は、生体内 (in vivo 系) においてコレステロールによって制御される、
- を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ・通常の餌 (F1 飼料) で飼育したラット (コントロール群) を用いた実験

- 1) ラットの脳底部に設けた骨窓に Cranial window を設置する。右大腿静脈から採血を行い血清コレステロール値を測定する。
- 2) Cranial window 内に灌流させる人工髄液中の  $K^+$ 濃度を 118 (mM) に上昇させ、脳底部に設けた骨窓から経時的に脳底動脈径をモニターする。
- 3) 高  $K^+$ 刺激にて認められた脳底動脈径の変化に対して人工髄液中の  $Ca^{2+}$ 濃度を 0 (mM) に置換することでその抑制作用を検討する。
- 4) Cranial window 内に灌流させる人工髄液中に SPC を混入させ、脳底部に設けた骨窓から経時的に脳底動脈径をモニターする。
- 5) ラットへの SPC 投与が引き起こす脳底動脈径の変化に対して Rho-kinase 阻害剤 (Y27632) を Cranial window 内に灌流させることでその抑制作用を検討する。

### ・高コレステロール食 (F1 飼料に 1%コレステロールと 1%コール酸を添加) で飼育したラット (高コレステロール群) を用いた実験

- 6) ラットの脳底部に設けた骨窓に Cranial window を設置する。右大腿静脈から採血を行

い血清コレステロール値を測定する。

7) Cranial window 内に灌流させる人工髄液中に SPC を混入させ、脳底部に設けた骨窓から経時的に脳底動脈径をモニターする。

1)から 7)の実験では、直腸温を温マットを用い 37.0 (°C) に、動脈血中 CO<sub>2</sub>濃度を人工呼吸管理にて 40 (mmHg) 前後に調節する。また、右大腿動脈に動脈ルートを確保し、動脈圧を経時的にモニターする。

上記 1), 2), 3)から、本研究で使用した cranial window model において脳血管の生理的な収縮・弛緩機構が保たれていることを検討する。

上記 1), 4), 5)から、SPC がラットの生体内 (in vivo 系) において Rho-kinase を介する血管攣縮を引き起こす可能性を検討する。

上記 6), 7)から SPC がラットの生体内 (in vivo 系) において引き起こす血管攣縮が血清コレステロール値の上昇により増強する可能性を検討する。

#### 4. 研究成果

1) Cranial window内に灌流させる人工髄液中の K<sup>+</sup>濃度を 118 (mM) に上昇させた場合、非常に強い脳底動脈の収縮が認められた。高 K<sup>+</sup>刺激にて認められた血管収縮は人工髄液中の Ca<sup>2+</sup>濃度を 0 (mM) に置換することで抑制され、高 K<sup>+</sup>脱分極による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴った生理的な収縮と考えられた。以上のことから、我々が作成した cranial window model では主要脳血管において生理的な環境が保たれていることが示唆された。

2) Cranial window内に灌流させる人工髄液中に SPC を混入させたところ脳底動脈の収縮運動が認められた。SPC が引き起こす血管収縮は時間的変化が緩やかで、最大収縮は 0.5~1.0 (hr) にて得られた。また、SPC が引き起こす血管収縮は 3~300 (・M) の範囲で濃度依存

的に増強された。また、SPC (100・M) が引き起こす血管収縮は、選択的 Rho-kinase 阻害剤である Y27632 (10・M) の投与によってほぼ完全に抑制された。SPC や Y27632 の投与中に血圧の著明な変動は認められなかった。これらの結果から、SPC は in vivo の実験系においても Rho-kinase の活性化を介する脳血管攣縮を引き起こすことが判明した。

3) 高コレステロール食 (F1 飼料に 1% コレステロールと 1% コール酸を添加) で飼育した高脂血症ラットを用いた実験では、SPC (100・M) が引き起こす血管収縮と血清コレステロール値には正の相関が認められた (相関係数 : 0.736)。これらの結果から、SPC が引き起こす血管攣縮機構はコレステロールによって制御されている可能性が示唆された。

4) 本研究はくも膜下出血後の脳血管攣縮のメカニズムの解明につながるものである。コレステロールによる血管攣縮の制御機構の存在を示唆する結果は、脳血管攣縮発症の予測や予防的治療に強く貢献し、臨床的にも極めて大きな意義を有すると思われた。

#### 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)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

白尾 敏之, 米田 浩, 鈴木 倫保

Clinical Neuroscience 26, 1384-1386, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白尾 敏之 (SHIRAO SATOSHI)

山口大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70448281

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし