

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791014  
 研究課題名（和文） くも膜下出血後の脳血管攣縮病態解明に未知なるカルシウムチャンネルより迫る  
 研究課題名（英文） The Analysis of mechanism of vasospasm after subarachnoid hemorrhage At the point of unknown calcium channel

研究代表者  
 藍原 康雄（AIHARA YASUO）  
 東京女子医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：50287372

研究成果の概要：脳血管攣縮はくも膜下出血後に生じる脳動脈壁の持続的収縮として、その重要な要素とされた血管平滑筋の収縮機能に関しては、多方面で数多くの研究がなされてきた。その結果、平滑筋弛緩収縮機構に関与しているとされる数多くの平滑筋膜イオンチャンネルが研究対象となり、分子生物学的に同定され薬剤的效果が試みられた。その中でも細胞膜電位依存性の Ca チャンネルは、最も注目されたターゲットであり機能解明も進み、多くの阻害薬が脳血管攣縮の治療薬として試みられてきたが、決定的な解決となるような効果は認められなかった。研究者自身、カルシウムチャンネルとは別のアプローチとして K チャンネルの発現レベルでの変化の解明を試み有意義な結果は得られたが、最終的な機能解明の結論には至らなかった。今回新たなステップとして、未知なるカルシウムチャンネルとして平滑筋収縮機能に関与するとして多分野で注目されている、受容体活性型カルシウム透過性 (TRP: transient receptor potential) チャンネルを脳血管攣縮解明の糸口として、これまでの自己データを基盤に推進する。現時点では、TRP チャンネルに関しては、機能レベルの点ばかりでなく薬剤的效果についても明らかでない部分が多いが、最終的目標は、これらの TRP チャンネル拮抗薬を用いて、脳血管攣縮を治療に一石を投じることにある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	270,000	2,870,000

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：vasospams, subarachnoid hemorrhage, calcium channel

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮は、くも膜下出血後に生じる脳動脈の持続的収縮であり、くも膜下出血患者の予後を左右する重要な病態である。しかし、

その発生機序かつ病態生理は未だ不明で、脳血管攣縮の抜本的治療法が確立していない大きな要因となっている。脳血管攣縮の病態に関する報告は多数あるが、単一の血管収縮分子に起因するのではなく複数の生理活性

物質の高次の相互作用により惹起されるという考えが主流である。それ以前に、「攣縮」という病態それ自体が、上記したように平滑筋細胞の収縮によるものなのか、個々の平滑筋細胞分化が活性化され細胞数増加による結果が動脈の収縮として現れているのかは不明であり、今日まで明らかにされてこなかった。平成 16 年からの 2 年間、我々は脳血管攣縮時の種々の Housekeeping gene の転写、蛋白レベルでの変化を、系統的かつ統括的に分析した。その結果、これまで影響を受けないとされていた、Housekeeping gene 自体くも膜下出血により発現量に影響を受けることを証明した。また、実際の攣縮血管病理標本を用いて血管壁内における平滑筋細胞核数、細胞分裂の割合を測定することにより、平滑筋細胞数それ自体には変化がなく、「攣縮」病態は平滑筋細胞の収縮によるものであることを改めて証明した。

## 2 . 研究の目的

研究者本人は、これまで血管平滑筋膜 K チャンネルの解析を中心に、Patch clamp 手技を用いるなど機能解析も含め多方面からのアプローチにて攣縮メカニズムの解明に努めてきた。今回新たなステップとして、平滑筋収縮機能に關与する新たなカルシウムチャンネルとして多分野において注目されつつある、未知なる受容体活性型カルシウム透過性 (TRP:transient receptor potential) チャンネルを糸口として、攣縮メカニズムの分子的解明に迫る。

## 3 . 研究の方法

イヌ脳血管攣縮モデルから経時的に血管組織を採取後既知、現在報告されている TRP チャンネル発現を定量し、いかなる反応が脳血管攣縮の発生機序および病態の持続に關与するかを検討する。これまで遺伝子発現の研究手法はノーザンブロッティングを用いた半定量的な解析が一般的であった。しかしながら遺伝子発現の変化が軽微なものや発現量が少ないものでは正確に捉えることは困難であった。近年、再現性かつ定量性に優れた方法として、蛍光色素を用いた Real-Time quantitative PCR (Sequence Detection System ABI PRISM TM 7700: Perkin-Elmer Applied Biosystems) が開発された。この方法は得られた mRNA 量を PCR サイクルごとに定量するもので、定量性の高い測定が可能となっている。本研究ではイヌくも膜下出血モデル (day 0, 2, 7, 14 model をそれぞれ 5 頭; 計 20 頭) を作成し、得られた脳底動脈組織

を種々の TRP チャンネルの mRNA 定量に用いる。研究者本人のこれまでの基礎研究技術を用い、攣縮血管において数多くある TRP チャンネルのサブタイプを全て同時期に検索し、有意差をもって発現量に変化を認めるサブタイプを絞り込むことが可能である。次に mRNA レベルでの発現量の変化を裏付けするため、くも膜下出血がターゲット TRP チャンネルに及ぼす機能レベルでの影響について、patch clamp 手技を用いての生理学的平滑膜電位測定を施行し、TRP チャンネル機能解析も含め、多方面からのアプローチにて攣縮メカニズムの解明に着手する。

## 4 . 研究成果

TRP チャンネルファミリー (TRP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) は各々特異な組織分布を示し、特に脳内分布でも特徴が見られた。TRP ファミリーは機能的にも多様性を有している。平滑筋においては TRP6 がアゴニスト刺激による収縮のトリガーとして働くことが示唆されていたが、その他に TRP1 に関しては、4 つ (alpha, beta, gamma, delta) の subtype が存在しており、その各々が独自の働きをしていることが (dominant negative 的な役割も示唆されている)。脳血管平滑筋細胞膜においても証明できた。それぞれの TRP チャンネルの発現量を RT-PCR にて定量し、次に Western blotting 法により蛋白レベルでの変化の裏づけまで出来た。

## 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 20 件) 全て査読有

Jahromi BS, Aihara Y, Ai J, Zhang ZD, Weyer G, Nikitina E, Yassari R, Houamed KM, Macdonald RL. Temporal profile of potassium channel dysfunction in cerebrovascular smooth muscle after experimental subarachnoid haemorrhage. *Neurosci Lett.* Jul 25;440(1):81-6. Epub 2008 May 10.

Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, Takahashi M, Macdonald RL: Induction of housekeeping gene expression after subarachnoid hemorrhage in dogs. *J Neurosci Methods* (2008) Jul 15;172(1):1-7. Epub 2008 Apr 10

Jahromi BS, Aihara Y, Ai J, Zhang ZD, Weyer G, Nikitina E, Yassari R, Houamed KM, Macdonald RL. Preserved BK Channel Function in Vasospastic Myocytes from a

Dog Model of Subarachnoid Hemorrhage. *J Vasc Res.* (2008) Apr 10;45(5):402-415  
Hori T, Kawamata T, Aihara Y, Amano K, Kubo O. Minimally invasive anterior interhemispheric lamina terminalis approach for craniopharyngiomas. Anatomical, hormonal, and neuropsychological considerations. *No Shinkei Geka.* (2007) Nov;35(11):1067-77.  
Jahromi BS, Aihara Y, Ai J, Zhang ZD, Nikitina E, Macdonald RL. Voltage-gated K(+) channel dysfunction in myocytes from a dog model of subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2007) Nov 7  
Xie A, Aihara Y, Bouryi VA, Nikitina E, Jahromi BS, Zhang ZD, Takahashi M, Macdonald RL. Novel mechanism of endothelin-1-induced vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2007) Mar 28  
Weyer GW, Jahromi BS, Aihara Y, Agbaje-Williams M, Nikitina E, Zhang ZD, Macdonald RL. Expression and function of inwardly rectifying potassium channels after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2006) Mar;26(3):382-91.  
Murakami T, Funatsuka M, Komine M, Hirayama Y, Suzuki H, Shishikura K, Aihara Y, Shibata K, Hori T, Kobayashi M, Osawa M. (2005) Oculomotor nerve schwannoma mimicking ophthalmoplegic migraine. *Neuropediatrics* Dec;36(6):395-8.  
Aihara Y, Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Macdonald RL, Hori T (2004). Induction of housekeeping gene expression in vasospastic arteries after experimental subarachnoid hemorrhage. *Proceeding of the 20<sup>th</sup> spasm symposium.* 32(Suppl):53-55  
Yassari R, Sayama T, Jahromi BS, Aihara Y, Macdonald RL (2004). Angiographic, hemodynamic and histological characterization of an arteriovenous fistula in rats. *Acta Neurochirurgica.* May; 146(5):495-504.  
Macdonald RL, Curry D, Aihara Y, Zhang ZD, Jahromi BS, Yassari R (2004). Magnesium and experimental vasospasm. *J Neurosurgery.* Jan;100(1):106-10  
Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, Nikitina E, Agbaje-Williams M, Macdonald RL (2004). Molecular profile of vascular smooth muscle ion channels following experimental cerebral vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab.* Jan; 24(1):75-83.  
Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, Sayama T, Macdonald RL (2003). Effect of nitric

oxide donor on and correlation of changes in cyclic nucleotide levels with experimental vasospasm. *Neurosurgery* 52(3):661-7.

Macdonald RL, Zhang ZD, Curry D, Elias M, Aihara Y, Halpern H, Jahromi BS, Johns L (2002). Intracisternal sodium nitroprusside fails to prevent vasospasm in nonhuman primates. *Neurosurgery* 51 (3): 761-768

Aihara Y, Kasuya H, Onda H, Hori T, Takeda J (2001). Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 32 (1): 212-217

Aihara Y, Onda H, Teraoka M, Yokoyama Y, Seino Y, Kasuya H, Hori T, Tomura H, Inoue I, Kojima I, Takeda J (2001). Assignment of SLC17A6 (alias DNPI), the gene encoding brain/pancreatic islet-type Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter to human chromosome 11p14.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 92 (1-2): 167-169

Sasahara A, Kasuya H, Kawashima A, Aihara Y, Izawa M, Hori T (2000). [The efficacy and safety of the nicardipine prolonged-release implant in a canine double hemorrhage model]. *No Shinkei Geka* 28 (12): 1071-1075

Kasuya H, Kikuchi K, Imamura T, Kawashima A, Aihara Y, Ochiai T, Yamaguchi K, Fukamachi K, Hori T, Shiseki M, Tozuka K (2000). [Two cases of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) sepsis following craniotomy]. *No Shinkei Geka* 28 (5): 429-434

Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J (2000). Molecular cloning of a novel brain-type Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem.* 74 (6): 2622-2625

Yamada S, Zhu Q, Aihara Y, Onda H., Zhang Z, Yu L, Jin L, Si YJ, Nishigori H, Tomura H, Inoue I, Morikawa A, Yamagata K, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Takeda J. (2000). Cloning of cDNA and the gene encoding human hepatocyte nuclear factor (HNF)-3 beta and mutation screening in Japanese subjects with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 43 (1): 121-124

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藍原康雄 ( AIHARA YASUO )

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 50287372

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし