

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791346

研究課題名（和文） くも膜下出血後の脳血管攣縮におけるコレステロールの役割

研究課題名（英文） Effect of Cholesterol on Sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase-mediated Cerebral Vasospasm

研究代表者

白尾 敏之 (SHIRAO SATOSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70448281

研究成果の概要（和文）：ラットの cranial window model を用いた研究結果から、sphingosylphosphorylcholine (SPC)-Rho-kinase 系が引き起こす脳血管攣縮は血清コレステロール値だけではなく血管平滑筋細胞内の総コレステロール濃度によって制御されていることが判明した。また、脳血管培養細胞を用いた研究結果から、本研究で用いたコレステロール除去刺激による血管平滑筋細胞内のコレステロールと血管平滑筋細胞膜におけるラフトの減少が確認された。以上の結果から、血管平滑筋の総コレステロール濃度の上昇がラフトの形成を誘導し、脳血管の攣縮機構を制御している可能性が示唆された。本研究結果は、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。

研究成果の概要（英文）：Lipid rafts are cholesterol-enriched membrane microdomains that influence signal transduction. In this study, hypercholesterolemia increased vascular smooth muscle (VSM) cholesterol (but not PC, a major component of nonraft membranes) and sphingosylphosphorylcholine (SPC)-Rho-kinase-mediated VSM contraction. Depletion of VSM cholesterol (but not PC) by β -cyclodextrin (β -CD) inhibited SPC-induced contraction. Treatment with β -CD decreased the mean % filipin III staining intensity of Human brain VSM cells. Depletion of VSM cholesterol by β -CD also decreased the raft marker ganglioside GM1 count per unit membrane length and inhibited SPC-induced contraction. These results indicate that cholesterol potentiates SPC-Rho-kinase-mediated contractions of importance in cerebral vasospasm and are compatible with a role for lipid rafts in this process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：ラフト、コレステロール、スフィンゴ脂質、脳血管攣縮

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。この疾患の本体は脳へ分布する血管の病的な収縮(攣縮)で、低分子量 G タンパク質 RhoA の標的タンパク質 Rho-kinase が重要な役割を果たしている (Sato M. et al.: Circ Res., 87: 195-200, 2000)。

申請者らはこれまで in vitro の実験系で、(1) スフィンゴ脂質の一つである sphingosylphosphorylcholine (SPC) が Rho-kinase の上流因子として脳血管攣縮を引き起こす事、(2) 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, Morikage N. et al.: Circ Res., 99(3): 299-306, 2006)。また、(3) ヒトくも膜下出血患者の髄液中で SPC 濃度が有意に上昇する事や、(4) イヌを使用した in vivo の実験系で、SPC 刺激が Rho-kinase を介する脳血管攣縮を引き起こす事も報告した (Kurokawa T. et al.: J Clin Neurosci., 16: 1064-1068, 2009, Shirao S. et al.: Cerebrovasc Dis., 26(1): 30-37, 2008)。

コレステロールやスフィンゴ脂質は細胞膜上に存在するラフトと呼ばれる膜ドメイン構造に存在し、多くの細胞内情報伝達に関与すると考えられている。申請者らは脳血管の攣縮機構はラフトの発現によって影響され、Rho-kinase を介するシグナル伝達が増強していると考えており、従って攣縮因子の一つである SPC が引き起こす脳血管攣縮のコレステロールによる制御機構とラフトとの関係を解明することは極めて重要と思われる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ラットを用いた in vivo の実験系にて SPC 刺激が引き起こす脳血管攣縮機構における血清コレステロールの関与、(2) ラットの血清コレステロールの上昇が血管平滑筋細胞内の総コレステロール濃度に及ぼす影響、(3) 脳血管平滑筋培養細胞においてコレステロールの除去がラフトに及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

<SPC 刺激による血管攣縮と血清コレステロール (Cranial window model)>

(1) SD ラット(5週)を通常の餌(F1 飼料)で飼育したコントロール群、高コレステロール食(F1 飼料に1%コレステロールと1%コル酸を添加)で飼育した高コレステロール群、 β -CD を5%添加した高コレステロール食で飼育したコレステロール除去群に分ける。各餌は10週間投与する。

(2) 各群のラットを用い、全身麻酔・人工呼

吸管理下に脳底部に骨窓を設け、Cranial window を設置する。また、右大腿静脈から採血を行い血清コレステロール値(mg/dl)を測定する。

(3) Cranial window 内に灌流させる人工髄液中に SPC(100 μ M)を混入し、脳底動脈径をデジタルカメラで経時的に測定し評価する。

上記(1)~(3)にて、血清コレステロール値の上昇やコレステロールの除去が SPC-Rho-kinase 系により引き起こされる血管攣縮にどのような影響を与えるかを検討する。

<血清コレステロール値の変化が及ぼす血管平滑筋細胞内コレステロールへの影響>

(4) SD ラット(コントロール群、高コレステロール群、コレステロール除去群)を用い、内頸動脈を採取する。また、右大腿静脈から採血を行い血清コレステロール値(mg/dl)を測定する。

(5) 採取した内頸動脈の外膜を丁寧に剥離・除去する。検体を均質化し、有機溶媒抽出後にガスクロマトグラフ法を用いて総コレステロール濃度(mg/g)を測定する。また、同じ検体に対して薄層クロマトグラフ法を用いて phosphatidylcholine 濃度(mg/g)を測定する。

コレステロールはラフトに多く認められるため、血管平滑筋内の総コレステロール濃度を測定することで血清コレステロール値の上昇やコレステロールの除去が血管平滑筋細胞内のラフト構成成分へ及ぼす影響を検討できる。phosphatidylcholine は細胞膜リン脂質の主成分であり、ラフト構成成分に対するコントロールとして評価する。

< β -CD 刺激が引き起こすコレステロールとラフトへの影響 -組織学的検討->

(6) 脳血管平滑筋培養細胞を用いて細胞内の非エステル化コレステロールを FilipinIII で標識し、蛍光顕微鏡で観察する。

(7) 脳血管平滑筋培養細胞に対して β -CD(5 mM) 刺激(2時間, 37°C)を加え、上記(6)の操作を行い β -CD 刺激による FilipinIII の細胞内分布の変化を検討する。

(8) 脳血管平滑筋培養細胞を用い、ラフトマーカー (GM1) を cholera toxin B subunit の biotin のコンジュゲートで標識し、gold particles (6 nm) の streptavidin のコンジュゲートで検出する。

(9) 上記(8)で作成した切片を透過型電子顕微鏡を用いて観察し、血管平滑筋細胞におけるラフトの分布を検討する。

(10) 脳血管平滑筋培養細胞に対して β -CD(5 mM) 刺激(2時間, 37°C)を加え、上記(8)

～(9)と同様の操作を行いβ-CD刺激によるラフトの細胞内分布の変化を検討する。

上記(6)～(7)にて、本研究で用いたコレステロール除去刺激による血管平滑筋細胞内のコレステロール除去効果を組織学的に検討する。また、上記(8)～(10)にて、コレステロールの除去が血管平滑筋細胞におけるラフトの分布に及ぼす影響を組織学的に検討する。

4. 研究成果

<血管攣縮と血清コレステロール>

(1) 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)。また、コレステロール除去剤(β-CD)を添加した餌で飼育した高脂血症ラットを用いた実験では、高脂血症により増強されたSPCが引き起こす脳血管攣縮は有意に抑制された(8.3±4.8% vs. 36.4±7.9%, p<0.05)。

<血管平滑筋細胞内コレステロールの解析>

(2) ガスクロマトグラフ法を用いた検討では、高脂血症群では内頸動脈平滑筋細胞内の総コレステロール濃度は正常群と比較して有意な上昇が認められた(0.49±0.09mg/g, vs. 0.82±0.24mg/g*)。一方、コレステロール除去群では高脂血症が引き起こす総コレステロール濃度の上昇は有意に抑制された(0.47±0.06mg/g, vs. 0.82±0.24mg/g*)。薄層クロマトグラフ法を用いてphosphatidylcholine濃度(mg/g)を測定したところ、3群間に有意差は認められなかった。(mean±sd, * p<0.05)

上記(1)～(2)の結果から、SPCが引き起こすRho-kinaseを介する脳血管攣縮は血清コレステロール値だけではなく、血管平滑筋細胞内のラフトの構成成分である総コレステロール濃度により制御される可能性が示唆された。

<β-CD刺激が引き起こすコレステロールとラフトへの影響>

(3) FilipinIIIを用いたコレステロールの標識の結果、非刺激下ではコレステロールは血管平滑筋細胞内にほぼ均一に分布していた。β-CD刺激(5mM)を行うと、細胞内のFilipinIIIによるコレステロールの標識がほとんど認められなくなった。

(4) 透過型電子顕微鏡を用いた検討ではβ-CD刺激により血管平滑筋細胞膜に分布するGM1の減少が確認され(1.8 vs. 0.76 GM1/μm**), コレステロール除去により細胞膜のラ

フトが減少する可能性が示唆された。(mean±sd, ** p<0.05)

FilipinIIIを用いた上記(3)の結果からは本研究で使用したβ-CDがコレステロール除去剤として作用していることが示された。また、上記(4)の結果から、血管平滑筋細胞においてコレステロールの除去が細胞膜のラフトの減少を引き起こす可能性が示唆された。

細胞膜のコレステロールは主にラフトと呼ばれる膜ドメイン構造に存在しており、本研究の実験結果を総合すると、SPC刺激が引き起こす脳血管攣縮の細胞内情報伝達はコレステロールに富んだ膜ドメイン構造であるラフトによって制御されている可能性が示唆された。

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2件)

①Satoshi Shirao, Hiroshi Yoneda, Mizuya Shinoyama, Yoshihiko Maeda, Hiroyasu Koizumi, Hideyuki Ishihara, Fumiaki Oka, Hirokazu Sadahiro, Sadahiro Nomura, Koji Kajiwara, and Michiyasu Suzuki. Sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase-mediated smooth muscle contraction in the rat basilar artery is regulated by the serum total cholesterol or vascular tissue cholesterol level: a mechanistic role for lipid rafts. Stroke, 査読有, 42(3), 2011, e134

②白尾敏之、米田 浩、篠山瑞也、藤井正美、野村貞宏、加藤祥一、鈴木倫保、Sphingosylphosphorylcholineが引き起こす脳血管攣縮におけるコレステロールの役割、脳血管攣縮、査読有、26巻、2010、79-81

[学会発表](計3件)

①白尾敏之、コレステロールの役割について、日本脳神経外科学会総会、2011年10月14日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜)

②Satoshi Shirao, Sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase-mediated smooth muscle contraction in the rat basilar artery is regulated by the serum total cholesterol or vascular tissue cholesterol level: a mechanistic role for lipid rafts International Stroke Conference, 2011年2月9日, Los Angeles, California, USA

③米田 浩、白尾敏之、石原秀行、末廣栄一、加藤祥一、鈴木倫保、くも膜下出血後の脳血管攣縮に対する前向き実態調査 STROKE 2010

(第 26 回スパズム・シンポジウム)2010 年 4
月 15 日、岩手県民会館(岩手県盛岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白尾 敏之 (SHIRAO SATOSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70448281