

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462218

研究課題名(和文)脳血管攣縮のシグナル伝達-Rho-kinaseのラフトへの細胞内転位-

研究課題名(英文)Signal transduction in cerebral vasospasm -Molecular mechanism of Rho-kinase translocation to lipid rafts-

研究代表者

白尾 敏之 (SHIRAO, Satoshi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70448281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SPH刺激やくも膜下出血モデルが引き起こす脳血管攣縮機構におけるラフトやカベオラの関与を検討した。血管平滑筋の総コレステロール濃度の変化がラフトやカベオラの発現を誘導しているだけでなく、そのシグナルの核への伝達によるラフトとカベオラの発現制御メカニズムの存在も示唆された。さらに、くも膜下出血後の血管平滑筋細胞内のABCA1の発現量を解析し、ABCA1を介するHDL新生反応が引き起こすCa²⁺感受性機構増強のメカニズムを検討したところ、SAH後では細胞増殖刺激の惹起により、細胞膜にコレステロール供給が促進される状態となっている可能性が高い事がわかった。

研究成果の概要(英文)：Rafts are cholesterol-enriched membrane microdomains that influence signal transduction. The SPC-induced VSM contraction measured using a cranial window model was reversed by Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, in rats fed a control diet. The extent of SPC-induced contraction correlated with serum total cholesterol. Total cholesterol levels in the internal carotid artery were significantly higher in rats fed a cholesterol diet compared with a control diet or a α -cyclodextrin diet, which depletes VSM cholesterol. Subsequently, I conducted by creating in vitro SAH model using the oxyhemoglobin. Oxyhemoglobin, to induce Toll like receptor 4, which is thought to be related to the development of vasospasm have also been reported, known as primary vasospasm factor. Using Western blot, and compared to the difference in amount of ABCA1 in the control group and the SAH group, towards the SAH group has resulted in a small ABCA1 weight than the control group.

研究分野：脳血管障害

キーワード：ラフト カベオラ コレステロール

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 を介する Ca²⁺ 感受性機構が重要な役割を果たしている (Circ Res., 87: 195-200, 2000)。

現在、我が国では Rho-kinase 阻害剤が脳血管攣縮の予防および治療薬として用いられているが、脳血管攣縮の克服には至っていない。脳血管攣縮の治療を妨げる原因として、一定期間(スパズム期: くも膜下出血発症後 3 日目~14 日目)に限局して出現する攣縮血管の Ca²⁺ 感受性機構の増強が引き起こす血管攣縮の重症化が報告されているが (J Cereb Blood Flow Metab., 30: 1637-1650, 2010)、その詳細な機序は不明である。

申請者らはこれまで、(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)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を発見した (Shirao S. et al.: Circ Res., 91: 112-119, 2002, Kurokawa T. et al.: J Clin Neurosci., 16: 1064-1068, 2009)。また、(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、も報告した (Morikage N. et al.: Circ Res., 99(3): 299-306, 2006, Shirao S. et al.: Circulation. 120: S1157-1158, 2009, Shirao S. et al.: Stroke. 43: A2456, 2012)。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やカベオラ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。申請者らは攣縮血管の Ca²⁺ 感受性機構はラフトやカベオラ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いる。申請者らは現在、血管平滑筋におけるコレステロール負荷が引き起こすラフトやカベオラの発現を介する Ca²⁺ 感受性機構の解明に着手している。

2. 研究の目的

くも膜下出血後に発症する脳血管攣縮のメカニズムとして Rho-kinase の活性化を介する Ca²⁺ 感受性機構が重要な役割を果たしている。また、攣縮因子の一つである sphingosylphosphorylcholine (SPC) が Rho-kinase の活性化を介して引き起こす血管平滑筋の収縮(攣縮)機構は血清コレステロール値の上昇に伴い増強されることが報告されている。コレステロールは細胞膜上に存在するラフトやカベオラと呼ばれる膜ドメイン構造に富んでおり、多くの細胞内情報伝達に関与している。本研究では、SPC 刺激やくも膜下出血モデルが引き起こす脳血管攣縮機構におけるラフトやカベオラの関与

を検討した。また、ヒトの中大脳動脈の血管平滑筋細胞である Human Brain Vascular Smooth Muscle Cell (HBVSMC) を用いて In vitro SAH モデルを作成し、くも膜下出血後の血管平滑筋細胞内の ABCA1 の発現量を解析することにより、ABCA1 を介する HDL 新生反応が引き起こすコレステロール代謝と脳血管攣縮における Ca²⁺ 感受性機構増強のメカニズムも併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) 高脂血症が血管平滑筋内のラフトとカベオラに及ぼす影響

正常ラット群、高脂血症ラット群、コレステロール除去剤投与ラット群から採取した血管平滑筋細胞(内頸動脈)の外膜を丁寧に剥離・除去した検体を作製した。各検体に対して Frotillin-1 と Caveolin-1 の発現量は他の 2 群と比較して有意に上昇していた。また、各検体から全 RNA を抽出し、逆転写試薬を用いて cDNA を合成した後に TaqMan プローベを用いてラット Flotillin-1 (ラフトマーカー) caveolin-1 (カベオラマーカー) について PCR 定量を行った。

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 を用いて標識し、gold particles (6nm) で検出した。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とカベオラの分布を検討した。脳血管平滑筋細胞に対して b-CD (5mM) 刺激 (2hr, 37) を加え、上記と同様の操作を行い b-CD 刺激によるラフトとカベオラの細胞内分布の変化を検討した。

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+1%コレステロール+1%コロール酸) で飼育した高コレステロール群、コレステロール除去剤を 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て実験を実施した。各群のラットに対して全身麻酔・人工呼吸管理下に内頸動脈を採取し、内頸動脈の外膜を剥離・除去した。この検体に対して、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて血管平滑筋組織の膜ラフトを精製し、11 フラクシオンを分取することで Flotillin-1 を用いた western blotting にてラフトの存在するフラクションを検討した。

(2) In vitro SAH model (血清有) の作成と ABCA1 の解析

SMCM で培養した HBVSMC を 10 cm dish に等量ずつ分配し、12 時間 37 でインキュベートする。その後 dish を、CI Control 群と SAH 群に分ける。SAH 群の培養細胞に対しては OxyHb を 10 μM とするように加える 3)。コントロール群は同量の vehicle (SMCM) を加えて、48 時間 37 インキュベートする。48 時間後、培養した HBVSMC の上清を除去し保存 (-80) する。In vitro SAH model (無血清) では FBS を加えない SMCM を用いて HBVSMC を

培養し、Control 群と SAH 群を作成した。Control 群と SAH 群における ABCA1 発現量はウェスタンブロットを用いて解析した。SD ラットを用いる実験の代わりに以下の追加実験を行った。脳血管平滑筋培養細胞を用い、OxyHb (10 μ M) を加え 48 時間 37 インキュベートするクモ膜下出血群を作成する。正常群は同量の vehicle (Smooth Muscle Cell Medium) を加えて 48 時間 37 インキュベートする。各群の培養細胞を用い、HDL によるコレステロール搬出反応の中心となる細胞膜蛋白の ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の 1 次抗体を用いて western blotting にて ABCA1 の発現を確認し、クモ膜下出血による変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 高脂血症が血管平滑筋内のラフトとカベオラに及ぼす影響>

ラット Flotillin-1 (ラフトマーカー)、caveolin-1 (カベオラマーカー) について PCR 定量を行ったところ、高脂血症群の Flotillin-1 と Caveolin-1 の mRNA レベルが他の 2 群と比較して有意に上昇していた。申請者らは既にラットを使用した実験で、高脂血症が血管平滑筋の総コレステロール濃度を上昇させ、コレステロールの除去が高脂血症における血管平滑筋の総コレステロール濃度の上昇を抑制する結果を得ている。したがって、上記の western blotting の結果から、血管平滑筋の総コレステロール濃度の変化がラフトやカベオラの発現を誘導している可能性が示唆された。また、上記 PCR 定量解析の結果から、血管平滑筋の総コレステロール濃度の変化というシグナルが核に伝達されラフトとカベオラの発現を制御するメカニズムの存在も示唆された。

b-CD 刺激によるラフトとカベオラの細胞内分布の変化を検討したところ、b-CD 刺激により脳血管平滑筋細胞膜に分布する GM1 とカベオラの有意な減少が確認された。申請者らは既にラットをもちた実験で、高脂血症が血管平滑筋の総コレステロール濃度を上昇させ、コレステロールの除去が高脂血症における血管平滑筋の総コレステロール濃度の上昇を抑制し、高脂血症が血管平滑筋のラフトとカベオラの蛋白発現量と mRNA レベルを上昇し、コレステロールの除去が血管平滑筋のラフトとカベオラの蛋白発現量と mRNA レベルの上昇を抑制する結果を得ている。従って、今回の実験結果からは血管平滑筋の総コレステロール濃度の変化がラフトやカベオラの発現を誘導している可能性が組織学的解析からも示唆されることとなった。

Flotillin-1 を用いた western blotting にてラフトの存在するフラクションを検討したところ、単体の検体からは採取可能なラフトが検出されず総蛋白量の不足が疑われた。検体数を増やし (3 検体) てもラフトは検出

されず、ラフトの採取に必要な検体数を確保することは動物実験の倫理規定上問題があると判断し実験を断念した。

(2) In vitro SAH model (血清有) の作成と ABCA1 の解析

これまで報告されている in vitro 系の SAH model では血清を加えた状態で血管平滑筋細胞を培養させているが、血清刺激自体が攣縮因子の 1 つであるため、最初に無血清の状態で培養した HBVSMC に対して Oxy-Hb (10 μ M) 刺激を加えて ABCA1 の出現を検討した。ウェスタンブロットの結果から無血清サンプルでは Control 群・SAH 群ともに 254kD の位置に ABCA1 のバンドが認められず、無血清の状態での HBVSMC の培養は血管平滑筋に何らかの障害をもたらしている可能性が示唆された。

次に血清を加えた状態で HBVSMC に Oxy-Hb 刺激を行い ABCA1 の出現を検討した。ウェスタンブロットの結果では 254kD の位置に ABCA1 のバンドが認められ、ヒト脳血管平滑筋内に ABCA1 が発現していることが確認された。ABCA1 の発現量は Control 群と比較して SAH 群で ABCA1 の発現量が低下している所見が認められた。ハウスキーピングタンパクである β -actin 発現量に対する ABCA1 発現量を解析したところ、Control 群と比較して SAH 群で ABCA1/ β -actin 量が低下していることが示唆された。

Oxy-Hb (10 μ M) 刺激を加えた HBVSMC (血清有) と刺激を加えなかった HBVSMC は形態学的には明らかな変化は認められなかった。これは培養細胞が培地に固定されているため平滑筋の収縮が顕著には出現しなかったことが考えられた。

以上より、クモ膜下出血では ABCA1 を介する HDL 新生反応が抑制され、そのコレステロール除去機能が低下し、コレステロールの上昇を介して SPC-Rho-kinase 系が関与する血管攣縮が増強し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 1 件)

Shirao S, Yoneda H, Shinoyama M, Sugimoto K, Koizumi H, Ishihara H, Oka F, Sadahiro H, Nomura S, Fujii M, Tamechika M, Kagawa Y, Owada Y, Suzuki M, A novel trigger for cholesterol-dependent smooth muscle contraction mediated by the sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway in the rat basilar artery: a mechanistic role for lipid rafts, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 査読有, 35, 2015, 835-842

DOI: doi: 10.1038/jcbfm.2014.260

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
無し

〔その他〕
無し

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