

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462412

研究課題名(和文) 星状細胞内カルシウムシグナル伝達を介する高血圧時微小脳血流調節と麻酔薬作用の解明

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of cerebral microvessels and calcium signaling through astrocyte in hypertension

研究代表者

中畑 克俊 (Nakahata, Katsutoshi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70332971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳内局所の血流は、神経血管カップリング機構を介しニューロンの活動に呼応してリアルタイムに制御されている。ニューロンと脳血管の間に介在する星状神経膠細胞が、この血流制御機構の中心的役割を果たしていることが近年明らかになりつつあるが、高血圧病態時に星状神経膠細胞を介する脳血流調節機構がどのように障害されるか、また麻酔薬がこれら病態時の脳血流調節にどのような影響を及ぼすかについては未だ明らかにされていない。本研究では、自然発症型高血圧および妊娠高血圧モデル動物を用い星状神経膠細胞内カルシウムシグナルに注目し、隣接する脳細動脈の血流調節作用を各種麻酔薬の影響について検討した。

研究成果の概要(英文)：The cerebral microcirculation has a central role in supporting the neurological activity, yet our understanding how anesthesia affect the regulation mechanisms of local cerebral blood flow is extremely limited. We investigated the role of astrocyte in neurovascular coupling especially in patients with hypertension.

研究分野：麻酔科学

キーワード：血管平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ニューロンは、その高いエネルギー需要を満たすため間断ない血液の供給が不可欠である。一方、脳全体に送られる限られた量の血液を局所脳組織へ適正に分配するには、局所血流はニューロンの活動と常に連動して調節されなければならない(神経血管カップリング)。近年、感覚神経細胞からのグルタミン酸受容体刺激が皮質内星状神経膠細胞の細胞内カルシウムシグナル伝達を介して脳微小血管を拡張させることが示され、星状神経膠細胞が脳実質内の血流を制御するキープレーヤーであることが明らかになった。また、これらアストロサイトを介する脳血管調節機構に対する麻酔薬の影響についても、これまで全く知られていなかった。

(2) カルシウムイオンは、細胞内セカンドメッセンジャーとして生体内で広く利用されており、細胞質および核内における同イオン濃度上昇の振幅度(amplitude)やその周波数変調(frequency)あるいはこれらシグナルの空間的広がりを巧みに組み合わせることで、多岐にわたる情報をセカンドメッセンジャーとして下流の細胞内カスケードに伝える役割を担っていることが指摘されていた。

(3) これまで研究代表者らは脳スライス切片を用い、血管内径が10 mm以下の極めて微細な脳血管をコンピュータ上で解析する手法を確立させ、大脳皮質から髄質に向け貫通する脳細動脈の収縮・弛緩反応を薬理学的手法を用いて研究することにすでに成功していた。これら脳スライス切片を用いた実験では、脳細動脈のみならず血管に隣接するアストロサイトを同時に観察することが可能であった。

## 2. 研究の目的

本研究では以下のような仮説を立て、これらを立証することを目的とした。

- 1) 自然発症型高血圧マウスおよび妊娠高血圧モデルラットでは一酸化窒素合成およびカリウムチャンネルを介する血管拡張機構が障害されている。エンドセリン、トロンボキサンおよびアンギオテンシンなどの内因性血管収縮物質は、高血圧症ではこれら血管収縮物質の作用が過度に増強している。一方、エストロゲンは障害された血管拡張機能を改善する。
- 2) 一酸化窒素合成酵素およびカリウムチャンネルを介する血管拡張は、星状神経膠細胞内のカルシウムシグナル伝達を介しており、上記内因性血管収縮物

質がこれらカルシウム伝達に影響する。これら血管反応性の正常妊娠との違いは、星状神経膠細胞を起点とする振動性細胞内カルシウム濃度変化(calcium oscillations)すなわち周波数変調(frequency)および振幅変調(amplitude)の違いを反映したものである。

- 3) 各種麻酔薬は高血圧病態時の脳血流維持機構を修飾し、吸入麻酔薬は血管収縮反応を強く抑制することで脳血管の自動調節能を破綻させるが、静脈麻酔薬はこれに影響しない。各麻酔薬による血管反応性の正常妊娠との違いは、一酸化窒素合成およびカリウムチャンネル活性の程度あるいは星状神経膠細胞からのカルシウム伝達の違いを反映しており、脳浮腫や脳出血を予防するという観点から最も有用な麻酔薬を特定することができる。

## 3. 研究の方法

1) ハロタンで麻酔した上記マウスを開胸し、冷却したクレブス液約50mlを100mmHgの圧をかけながら左心室より灌流し、血管内血液をすべて洗い流したあと脳を摘出した。次に、現有のピプラトームを用いて大脳新皮質を含むスライス標本(厚さ約125 μm)を作成した。この際、脳標本は酸素95% + 炭酸ガス5%で通気した4℃冷却クレブス液内を作成した。ついで、この脳スライス標本を酸素93% + 炭酸ガス7%(われわれのシステムではこの条件下でpH=7.4となる)で通気し、37℃に加熱したクレブス液で満たした観察用チャンバーに入れ、光学顕微鏡(IX71-23DIC、オリンパス)を用いて大脳実質内動脈(径5-10 μm)を観察した。顕微鏡に装着したビデオカメラで動脈の画像を撮影し、メディアコンバータを介してコンピュータに取り込んだ後、動脈径の変化をコンピュータ画面上で血管径測定用のソフトウェアを用いて解析した。妊娠高血圧ラットおよび対照妊娠ラットから作製した脳スライス標本において、プロスタグランدين F<sub>2α</sub>(0.5 μM)で標本中の動脈を収縮させたのち、アセチルコリンによる血管拡張反応を観察する。また、外因性一酸化窒素に対する拡張反応をみるためニトログリセリンを用い血管拡張反応をそれぞれの実験ラットで観察する。カリウムチャンネルを介する血管拡張反応を妊娠高血圧ラットおよび対照ラットで観察する。各種カリウムチャンネル拮抗薬(イベリオトキシン [large-conductance カルシウム依存性; 0.1 μM]、カリブドトキシン [intermediate-conductance カルシウム依存性; 0.1 μM]、アパミン [small-conductance カルシウム依存性; 0.1 μM]、グリベンクラミ

ド [ATP 感受性 ; 5 $\mu$ M]、4-アミノピリジン[電位依存性 ; 1mM]、BaCl<sub>2</sub>[内向き整流性 ; 10 $\mu$ M]) を用い、各種カリウムチャネル作用薬による脳微小血管の拡張反応を観察する。

蛍光蛋白質 GFP を星状細胞内繊維蛋白プロモーター下に発現させたトランスジェニックマウスを用い、大脳皮質を含むスライス標本を作製した。カルシウムイオン蛍光プローブ ( rhod-2/AM ) を星状細胞に取り込ませた後、人工脳脊髄液を灌流させた観察チャンパー内にスライス標本を静置し、顕微鏡下にアストロサイトと隣接する脳細動脈を同定する。続いて、グルタミン酸受容体作用薬 1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid ( t-ACPD ) を適用し、この時の星状細胞内カルシウムイオン濃度振動性変化を共焦点顕微鏡にて検出した。同時に、標的細動脈の血管径変化を経時的に観察し、スペクトル解析から得られたカルシウムシグナル特性との連関をみた。

上記と同様にして作製した脳スライス標本を用い、カルシウムイオン蛍光プローブ ( rhod-2/AM ) を星状細胞に取り込ませた後、顕微鏡下にアストロサイトと隣接する脳細動脈を同定した。続いて、灌流液を 100% 窒素を吹送し、スライス標本を低酸素状態にした。この時の星状細胞内カルシウムイオン濃度振動性変化を共焦点顕微鏡にて検出した。同時に、標的細動脈の血管径変化を経時的に観察し、スペクトル解析から得られたカルシウムシグナル特性との連関をみた。

次に、アストロサイト内カルシウムシグナルを介して惹起された血管作動性物質を同定するため、Ca<sup>2+</sup> 依存性 K<sup>+</sup>チャネル阻害薬 iberiotoxin、内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネル阻害薬 Ba<sup>2+</sup>、一酸化窒素合成酵素阻害薬 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester ( L-NAME )、ホスホリパーゼ A2 阻害薬 methyl arachidonyl fluorophosphonate ( MAFP )、シクロオキシゲナーゼ 1 選択的阻害薬 SC-560、P450 阻害薬 miconazole など、各種阻害薬を前適用したときの血管径変化を観察した。それぞれについて、グルタミン酸受容体作用薬 t-ACPD および低酸素条件下で実験を行い、比較検討した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) ハロタンで麻酔した上記マウスを開胸し、脳を摘出した。ピプラトームを用いて大脳新皮質を含むスライス標本 ( 厚さ約 125 mm ) を作成することができた。この際、脳標本は酸素 95% + 炭酸ガス 5% で通気した 4 冷却クレブス液内を作成した。ついで、この脳スライス標本を酸素 93% + 炭酸ガス 7% ( われわれのシステムではこの条件下で pH=7.4 となる ) で通気し、37 に加温したクレブス

液で満たした観察用チャンパーに入れ、光学顕微鏡 ( IX71-23DIC、オリンパス ) を用いて大脳実質内動脈 ( 径 5-10 mm ) を観察することが可能であった。顕微鏡に装着したビデオカメラで動脈の画像を撮影し、メディアコンバータを介してコンピュータに取り込んだ後、動脈径の変化をコンピュータ画面上で血管径測定用のソフトウェアを用いて解析できることを確認した。

( 2 ) 蛍光蛋白質 GFP を星状細胞内繊維蛋白プロモーター下に発現させたトランスジェニックマウスを用い、大脳皮質を含むスライス標本を作製した。カルシウムイオン蛍光プローブ ( rhod-2/AM ) を星状細胞に取り込ませた後、人工脳脊髄液を灌流させた観察チャンパー内にスライス標本を静置し、標的細動脈の血管径変化を経時的に観察した。また、スペクトル解析から得られたカルシウムシグナル特性との連関を見た。現在、グルタミン酸受容体刺激および低酸素ストレス時に見られる脳実質内細動脈の収縮・弛緩反応は、アストロサイトを起点とするカルシウムシグナル伝達の違いを反映したものであるかどうか検討を続けているところである。本研究の結果、アストロサイトのカルシウムシグナル伝達を介する脳血管調節機構を、刺激の受容から血管平滑筋への情報の伝達に至るまで包括的に理解することができると予想された。

( 3 ) 細胞内カルシウムシグナル伝達に係る作用薬や拮抗薬などの各種薬剤を用い、振動性変化に動員されるカルシウムイオンの供給源について検索した。上記薬剤を前適用し、このときのアストロサイト内カルシウムシグナルを観察することができた。これにより、グルタミン酸受容体作用薬および低酸素により惹起されたカルシウム振動性変化は、細胞外カルシウムに由来して発生していることが分かったが、小胞体貯蔵カルシウムに起源しシグナルが維持されているのかについては詳細に検討を加えたものの、結論を導くには至っていない。

( 4 ) 揮発性麻酔薬イソフルラン、セボフルラン ( 0.5-2.0 MAC ) を通気ガスに付加、あるいは静脈麻酔薬プロポフォル ( 0.1-10 mM )、ケタミン ( 0.1-10 mM ) あるいは局所麻酔薬リドカイン ( 1-50 mM ) を投与した場合の血管の反応を観察した。同時に、アストロサイトのカルシウム濃度の変動についても、比較検討し、各種麻酔薬がカルシウム伝達に影響するかどうかを観察した。また、これら麻酔薬による脳血管反応性の変化が、L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬 nifedipine、ホスホリパーゼ C 阻害薬 U-73122、イノシトール三リン酸阻害薬 2-aminoethyl diphenylborate ( 2-APB )、リアノジン受容体阻害薬 ryanodine ( 20  $\mu$ M )、小胞体膜

Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害薬 thapsigargin 一酸化窒素合成酵素阻害薬、各種カリウムチャネル拮抗薬、可溶性グアニレートシクレーズ阻害薬、および NMDA 受容体拮抗薬処置で抑制されるか否かについても検討した。現時点では、これらから得られた結果を解析し、麻酔薬が脳微小循環に及ぼす影響について、まとめる作業を継続中である。

関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00405416

#### 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)

1. The efficacy of sugammadex for the reversal of rocuronium-induced neuromuscular blockade in women during Cesarean section. ASA annual meeting, 2014.10.14, New Orleans (USA)
2. Sugammadex reversal of rocuronium-induced neuromuscular blockade in Cesarean section patients pretreated with magnesium. 46<sup>th</sup> International congress on pathophysiology of pregnancy 2014.9.17, Tokyo

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

中畑 克俊 (NAKAHATA KATSUTOSHI)