

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591657

研究課題名（和文） 脳循環自動調節のメカニズムに関する分子生物学的研究

研究課題名（英文） Molecular biological analysis about mechanism of autoregulation in cerebral blood flow

研究代表者

大熊 洋揮（OHKUMA HIROKI）

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40211099

研究成果の概要(和文): くも膜下出血後に生じる脳内細動脈の変化の本態が平滑筋の形質転換を基にしたリモデリングである可能性、あるいはくも膜下出血後の脳循環自動調節障害の本態が脳内細動脈のリモデリングによるものである可能性などを解明するためにウサギを用いて実験を行った。くも膜下出血後には、自動調節の障害がみられ、これは脳内細動脈のリモデリングと関連した。リモデリングに関与する因子に対する髄腔内投与遺伝子治療ではリモデリングおよび自動調節の改善は得られなかった。一方、細胞内情報伝達系に影響を及ぼす可能性のある薬剤（塩酸ファスゲル、スタチン）の投与でこれらの改善が認められ治療法の開発に結びつくと考えられた。

研究成果の概要(英文): In order to investigate the possibility that the intraparenchymal arterioles show remodeling based on phenotypic modulation of smooth muscle cells which results in the disorder of cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid hemorrhage, the experimental study using rabbits were performed. After the subarachnoid hemorrhage, cerebral blood flow autoregulation was disturbed in association with the degree of the remodeling in the arterioles. The remodeling and the disorder of autoregulation could not be improved by intrathecal administration of antisense oligo DNA for several factors related to the pathology of remodeling. On the other hand, administration of several drugs affecting intracellular signaling transduction could improve the remodeling and the disorder of autoregulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脳血管障害学

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血後には脳血管攣縮をはじめとする脳循環障害が生じる。治療法の工夫により、最近では、近位主幹動脈領域の脳血管攣縮による脳虚血発生は減少傾向にあるが、末梢領域の攣縮～脳内微小循環障害による脳虚血は依然として予後に影響を与える重大な因子である。我々は、くも膜下出血後の脳内微小循環系の変化として、脳内細動脈においても血管壁の肥厚、内腔の狭小化が生じ、末梢血管抵抗の増大を介し脳虚血に影響を与える重大な因子となることを実験的、臨床的に証明してきた。さらに、この脳内細動脈の変化の原因に関し、くも膜下出血後に脳内細動脈に血管平滑筋の形質転換が生じていることも実験的に証明した。

2. 研究の目的

これらの知見を総合すると、脳内細動脈の変化の本態が平滑筋の形質転換を基にしたリモデリングである可能性、あるいはくも膜下出血後の脳循環自動調節能障害の本態が脳内細動脈のリモデリングによるものである可能性などが、今後解明すべき課題として残されている。この点を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) くも膜下出血後における脳循環自動調節能障害と脳内細動脈のリモデリング発生に関する検討

ウサギを用い48時間間隔の大槽内自家動脈血2回注入によりくも膜下出血を作成した。くも膜下出血作成5日後に以下の評価を施行した。

脳循環の自動調節能の評価

頭蓋骨に小開頭を施し、人為的に血圧を変化させた場合の脳血流量の変化をlase-Doppler flowmetryを用い測定し、自動調節能の障害の有無・程度を評価した。

脳内細動脈のリモデリングの分子生物学的検討

リモデリングの分子マーカーであるミオシン重鎖アイソフォームであるSMembとSM2に関し、組織学的には蛋白質レベルを免疫染色法で分析し、mRNAレベルは組織抽出成分をもとにreverse transcription-polymerase chainreaction (RT-PCR)で検索した。

脳内細動脈のリモデリングの定量的組織学的解析

灌流固定後に脳を摘出しこれを脳表と平

行に薄切し、脳内細動脈の横断を観察し、画像解析装置にて血管内腔、血管壁厚、平滑筋数などを計測し評価した。

(2) 遺伝子治療および各種薬剤による脳循環自動調節能障害の改善の可能性に関する検討

リモデリングに関与する因子に対する遺伝子治療

リモデリングに関与する因子として、nuclear factor-kappa B, transforming growth factor-beta 1, matrix metalloproteinasesに関し、これらの遺伝子に対するアンチセンスオリゴDNAをデザインし、大槽穿刺にて髄腔内に投与した。髄腔内投与はくも膜下出血作成30分前に行った。くも膜下出血作成5日後に前述の脳循環の自動調節能の評価、脳内細動脈のリモデリングの分子生物学的検討、脳内細動脈のリモデリングの定量的組織学的解析を行った。

薬剤の効果

血管平滑筋の収縮を抑制する薬剤として塩酸ファスジル(1回/日の静脈内投与)またはスタチン(1回/日の経口投与)を投与し、くも膜下出血作成5日後に前述と同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) くも膜下出血後における脳循環自動調節能障害と脳内細動脈のリモデリング発生

脳循環の自動調節能の評価

正常対照群では、血圧が150mmHgまでは脳血流量に有意な差異はみられなかったが、くも膜下出血群では、血圧が100mmHg以上となると、血圧に依存し脳血流量の増加がみられ、自動調節能が破綻していることが示された。

脳内細動脈のリモデリングの評価

免疫染色の結果では、正常対照群では、SM2の染色のみが示されたが、くも膜下出血群ではSMembの染色性が増大した。RT-PCRによる検討では、くも膜下出血群で、SMembのmRNAの増加が示されたが、正常対照群に比べ、有意なものではなかった。これは摘出標本が細動脈のみではなく脳組織を含めた評価であったためと思われる。

脳内細動脈の定量的組織学的解析

正常対照群に比べ、くも膜下出血群では血管内腔面積の減少、血管壁厚の増大、平滑筋数の微増などがみられた。

以上から、くも膜下出血後には、自動調節能の破綻がみられ、脳内細動脈のリモデリングが

その原因となることが示唆された。

(2) 遺伝子治療および各種薬剤による脳循環自動調節能障害の改善の可能性

リモデリングに關与する因子に対する遺伝子治療

Nuclear factor-kappa B, transforming growth factor-beta 1, matrix metalloproteinases などのリモデリングに影響を与える可能性のある物質を抑制するために、それらの遺伝子のアンチセンス DNA の髄腔内投与を行った。しかし、自動調節能の破綻および脳内細動脈のリモデリングとともに変化は認められなかった。これは、髄腔内投与されたアンチセンス DNA が脳内細動脈まで充分到達しないことが原因と考えられた。

薬剤の効果

そこで平滑筋細胞内の情報伝達系を修復する可能性のある薬剤として、特にその持続的収縮を抑制する作用を有する塩酸ファズデル（静脈内投与）とスタチン（経口投与）の効果を検討した。結果として、両薬剤ともに自動調節能の破綻および脳内細動脈のリモデリングを抑制したことから、くも膜下出血後の脳循環自動調節能破綻の治療薬として応用し得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）

〔学会発表〕（計3件）

大熊洋揮：現時点で臨床応用可能なスパズム予防・治療法．第26回スパズムシンポジウム、2010年4月15日、盛岡．
棟方聡、大熊洋揮、奈良岡征都、吉川朋成、小笠原ゆかり：Rho/Rho-kinase pathway を標的とした新たな脳血管攣縮治療法の有効性．第24回スパズムシンポジウム、2008年3月20日、京都．
棟方聡、大熊洋揮、菊池潤、奈良岡征都：現時点においてスタンダードとなり得る脳血管攣縮治療法の検討および再認識．（第66回社団法人日本脳神経外科学会総会、2007年10月3日、東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大熊 洋揮 (OHKUMA HIROKI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40211099

(2) 研究分担者

中野 高広 (NAKANO TAKAHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20400137

嶋村 則人 (SHIMAMURA NORIHITO)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40312491

(3) 連携研究者

該当なし