

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19947

研究課題名(和文)脳血管攣縮の成因における動脈壁内酸化LDLの役割とその起源

研究課題名(英文)The origin of the oxidized LDL in arterial wall in the cause of cerebral vasospasm

研究代表者

松田 尚也(Matsuda, Naoya)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30587663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血(SAH)において、脳血管壁内の酸化LDLとその受容体LOX-1の存在を証明したが、LDL移行経路は未解明である。SAH時の血管壁内LDLの起源解明を目的とした。内皮障害による循環血液中LDL移行、くも膜下血腫中のLDL、レセプターを介した取込みを推察した。SAH群ではEvans blueの血管外漏出を認め、内皮破綻が確認され、既報の通りであった。しかし蛍光標識LDL投与後の動脈壁移行は確認できなかった。また、蛍光標識LDL含有自家動脈血のくも膜下腔注入においても、動脈壁へのLDL移行は確認できなかった。LDL移行を確認できなかったが、原理や条件につき検討し実験継続中である。

研究成果の概要(英文)：We proved the existence of oxidized LDL and its receptor LOX-1 in cerebral arterial wall at the time of the subarachnoid hemorrhage onset, but the origin of LDL has not been elucidated. The aim of this study is to elucidate the origin of the LDL. Uptaking LDL from circulation blood due to the endothelium disruption, due to a receptor interaction, or migrating from subarachnoid hematoma were possible origins. In the SAH group, endothelium disruption was confirmed by leakage of Evans blue out of the blood vessel as it is reported. However, LDL migration into the arterial wall was not confirmed after intravenous administration of fluorescent labeled LDL or subarachnoid administration of autologous arterial blood containing fluorescent labeling LDL. The study is ongoing with continuous investigation about the principle and experiment condition.

研究分野：脳神経外科

キーワード：くも膜下出血 脳血管攣縮 酸化LDL LOX-1

1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮におけるフリーラジカル・酸化ストレスの関与

脳血管攣縮は脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血(SAH)の予後に影響を与える最大の因子の一つである。その成因としてoxyHbとそれに起因するフリーラジカルの関与が古くから指摘されてきた。それに基づいてフリーラジカル・スカベンジャーの有効性が検討されたが有効性は確立されていない。

新たな酸化ストレスの関与する可能性

これまで開発されたフリーラジカル・スカベンジャーが有効性を示せなかった原因として、酸化ストレスの発生経路が、従来のoxyHbに続く細胞内情報伝達系以外の因子が関与している可能性を考慮した。

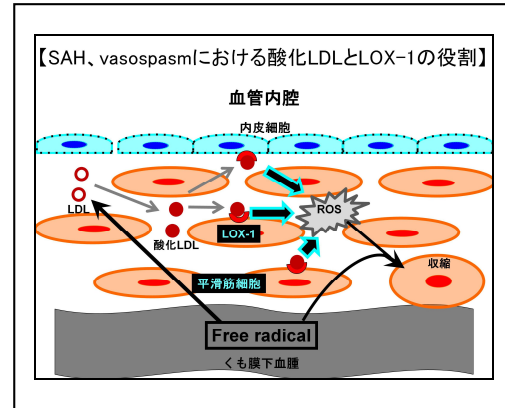
その結果、我々は酸化LDLとそのレセプターのLOX-1が酸化ストレスの発生源として脳血管攣縮に関与していることを初めて示した。すなわち、ウサギくも膜下出血モデルにおいて、攣縮血管壁には酸化LDLとLOX-1が蛋白レベルおよびmRNAレベルで有意に発現すること、さらにこれらを抑制するprocyanidineの投与により、これらの発現が抑制されるとともに脳血管攣縮が軽快することを証明した。

SAH群において、脳血管壁内皮細胞下に酸化LDLの存在を認め、内皮細胞、血管平滑筋細胞にその受容体LOX-1の発現が証明された。

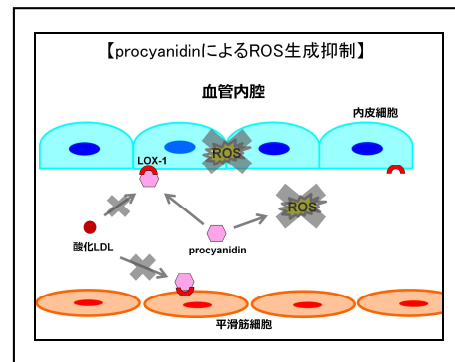
酸化LDL、LOX-1の発現は、apple polyphenol投与群において有意に抑制された。また、RT-PCRにより、mRNAレベルでも抑制されることが証明された。

酸化LDLとLOX-1の関与に関する推察

この実験結果から以下の様に考察した。血管壁に存在しないしは進入したLDLがくも膜下血腫由来のフリーラジカルにより酸化LDLとなる。酸化LDLは平滑筋細胞膜および内皮細胞膜に存在するLOX-1を誘導しこれと結合することにより活性酸素(ROS)を産生する。ROSは平滑筋の持続的収縮や内皮細胞障害をもたらす病態を進行させる。



Procyanidinは酸化LDLの産生とLOX-1への結合を阻害し、さらにROSを不活化させることによりこの病態を抑制する。



LDLの起源に関して

この中で、病態の中核をなすLDL起源に関して

- 1) SAH時の内皮細胞(blood-arterial-junction)障害による循環血液中LDLの血管壁内進入
- 2) くも膜下血腫中のLDL
- 3) 血管壁のLDLレセプターを介しての取り込み

などを推察した。しかし、実際はその起源は全く不明である。

LDLの起源が判明すれば、その取り込みを抑えることでより効果的に脳血管攣縮を抑制し、予後改善に繋がる可能性が大きいと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではウサギくも膜下出血モデルにおいて、蛍光標識LDLを用いることで、SAH

時の血管壁内 LDL の起源を解明することを目的としている。具体的には

1) 循環血液中 LDL の血管壁内進入の可能性について

循環血液中に蛍光標識 LDL を注射して、blood-arterial-junction の破綻 (HRP の循環血液中注入による動脈壁への移行を観察し判定) との相関を調べる。

2) くも膜下血腫中の LDL の可能性について

蛍光標識 LDL の含有した自家動脈血のくも膜下腔注入による SAH を作成し、動脈壁への移行を観察する。

3) 動脈壁の LDL レセプターを介しての取り込みにの可能性に関して

抗 LDL レセプター抗体を用いて動脈壁 LDL レセプターの発現と分布を検索する。そして、循環血液中注入蛍光標識 LDL の動脈壁への移行・分布との相関を調べる。

3. 研究の方法

具体的な実験方法は以下の通りである。

Rabbit 50 羽を、以下の 5 群に分ける。

A: Control 群 (n=10)

B: Sham operation(生理食塩水大槽注入 + 蛍光標識 LDL 静脈内投与)群 (n=10)

C: Sham operation(生理食塩水・蛍光標識 LDL 大槽注入)群 (n=10)

D: SAH (大腿動脈採取自己血の大槽注入 + 蛍光標識 LDL 静脈内投与)群 (n=10)

E: SAH (大腿動脈採取自己血・蛍光標識 LDL 大槽注入)群 (n=10)

各個体は三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.3mg/kg+ミダゾラム 4mg/kg+酒石酸ブトルファノール 5mg/kg) を耳介静脈より静脈内投与し麻酔を行う。

大槽注入及び静脈内投与は day0,2 の 2 回行い、全群においてそれと同時に HRP の静脈内投与も行う。Day4 に、三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.3mg/kg+ミダゾラム 4mg/kg+酒石酸ブトルファノール 5mg/kg) にて麻酔を行った上で、ペントバルビタール 100mg/kg を静脈内投与し安楽死させる。心肺停止後に 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて還流固定し、脳底動脈及び脳実質を摘出し、血管径評価、また、血管壁の蛍光標

識 LDL、LDL レセプターについての組織学的検討を行い、LDL レセプターについては ELISA、RT-PCR にて解析を行う。以上を ANOVA を用いて統計解析を行う。

尚、組織学的検討に際しては、各群 n=5 (5 × 5 群 = 25 羽) の還流固定群検体について行い、同様に、各群 n=5 (5 × 5 群 = 25 羽) の脳血管について、安楽死直後に生体標本を採取し ELISA 法、RT-PCR に使用することとする。

以上の結果を踏まえ、抗 LDL レセプター抗体投与による脳血管攣縮との関わりを検討する。

Rabbit 20 羽を、以下の 2 群に分ける。

A: Sham- 抗 LDL レセプター抗体投与群 (n=10)

B: SAH-抗 LDL レセプター抗体投与群 (n=10)

各群とも前年度に判明した LDL 取り込み経路 (循環血液内または大槽内) への標識 LDL 投与を行う。抗 LDL レセプター抗体を day0,2 に標識 LDL と同様に投与する。

麻酔方法は同様に行うものとする。

大槽注入及び静脈内投与は day0,2 の 2 回行う。Day4 に同様の安楽死方法を取り、心肺停止後に 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて還流固定し、脳底動脈及び脳実質を摘出し、血管径評価、また、血管壁の蛍光標識 LDL、LDL レセプターについての組織学的検討を行い、LDL レセプターについては ELISA、RT-PCR にて解析を行う。以上を ANOVA を用いて統計解析を行う。

以上より抗 LDL レセプター抗体による LDL 取り込み阻害と脳血管攣縮との関係性を検討することとする。

4. 研究成果

SAH 時の内皮細胞障害に関しては、まずは Control 群、SAH 群に対し、Evans blue 投与を行うこととし、blood-arterial-junction の破綻につき確認を行った。Control 群では脳動脈血管外への Evans blue 漏出を認めなかったのに対し、SAH 群では血管外漏出を認め、blood-arterial-junction 破綻が起こることが確認され、この結果に関してはこれまでの報告通りの結果であった。しかし蛍光標識 LDL 投与を追加しても動脈壁への移行は確認できなかった。くも膜下血腫中の LDL 移行の可能性に関しては、蛍光標識 LDL の含有した自家動脈血のくも膜下腔注入による SAH を作成したが、動脈壁への LDL 移行は確認できなかった。

両実験で LDL を確認できない結果となったが、循環血液中からの移行でもくも膜下腔の血腫からの移行でもないためなのか、または投与濃度など条件の問題なのかにつき検討が必要であり、実験を継続中である。

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)

6．研究組織

(1)研究代表者

松田尚也 (Matsuda Naoya)

弘前大学医学部附属病院・助教

研究者番号：30587663