

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2010

課題番号：18209045

研究課題名（和文）脳血管攣縮における PAR-1 の機能解析、および新規 G 蛋白共役受容体の検索

研究課題名（英文）Functional analysis of PAR-1 and search for novel G-protein-coupled receptors in cerebral vasospasm after SAH

研究代表者

佐々木 富男（SASAKI TOMIO）

九州大学大学院医学研究院 脳神経外科 教授

研究者番号：10134561

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：くも膜下出血、脳血管攣縮、トロンビン、PAR-1、G 蛋白質

1. 研究計画の概要

本研究の目的はくも膜下出血後の脳血管攣縮の分子メカニズムを解明し、新たな分子標的治療を開発することにある。第一にトロンビン受容体である Protease-Activated Receptor-1 (PAR-1) が脳血管平滑筋に異常発現する分子メカニズムを解明し、その阻害剤の有効性を確認する。第2に脳血管攣縮物質が関与する G 蛋白共役受容体 (GPCR)-Rho/Rho kinase シグナル伝達系を含め、脳血管攣縮に関与する特異的シグナル伝達系同定を行う。

2. 研究の進捗状況

(1) ウェスタンブロット法を用い、脳底動脈における PAR-1 発現が脳血管攣縮の経過に一致し遅発性に亢進し、その後、減少することを証明した。また、免疫染色を用い、PAR-1 発現が血管平滑筋に特異的であることを同定した。

(2) SAH モデルにおいて、活性化型 RhoA (GTP 結合型) が発現亢進していることを同定した。また、選択的 PAR-1 拮抗薬にてトロンビンに対する過剰収縮反応の抑制と PAR-1 過剰発現の抑制を証明した。

(3) 通常 PAR-1 活性化ペプチドによる収縮は連続刺激がでは徐々に減弱するが、SAH モデルでは

その反応は持続し、受容体不活化機構の障害が示唆された。この反応は Gαq 阻害剤により完全に抑制されたことより、SAH モデルでは GPCR を介した Gαq シグナル活性化が持続収縮に関与している可能性が示唆された。

(4) 新たに自家血にトロンビン阻害剤アルガトロバンを混じて脳槽内投与したアルガトロバン治療モデル (ARG モデル) を作成し、収縮反応性および PAR1 発現を SAH モデルと比較した。ARG モデルでは収縮反応性の低下と PAR1 発現低下がみられた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由) これまでの研究により、SAH 後の血管平滑筋におけるトロンビン受容体の発現亢進が明らかになった。またトロンビン阻害薬およびトロンビン受容体拮抗薬を用いた実験から、この受容体の発現が SAH 後脳血管収縮性亢進に関与していることが明らかになった。種々の GPCR アゴニストによる SAH 後脳血管収縮性亢進においては、GPCR 不活性化の障害が示唆されるとともに、受容体シグナルに三量体 G 蛋白質 Gαq が大きく関与していることが明らかになりつつある。SAH における受容

体の性質変化および $G\alpha_q$ の重要性が示唆される。
以上の結果を踏まえ、本研究はこれまで研究計画から何ら逸脱することなく概ね順調に進展していると考えている。

4. 今後の研究の推進方策

ウサギ SAH モデル脳底動脈におけるアゴニスト収縮反応性亢進には、受容体脱感作機構および受容体発現量が関与していると考えられる。種々の GPCR に対するアゴニスト刺激を行い、対照モデルと SAH モデルとで比較を行う。今後は受容体発現量のみならず、phos-tag を用いたイムノプロテイングにより、それぞれの GPCR のリン酸化レベルの時間経過も測定する。今後も新たな分子生物学的手法も導入し、脳血管攣縮の分子メカニズム解明に努める。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Maeda Y, Hirano K, Hirano M, Kikkawa Y, Kameda K, Sasaki T, Kanaide H. Enhanced contractile response of the basilar artery to platelet-derived growth factor in subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 40:591-596, 2009 (査読有)
- ② Kai Y, Maeda Y, Sasaki T, Kanaide H, Hirano K. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: the role of thrombin receptor in cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *J Pharmacol Sci* 108:426-432, 2008 (査読有)
- ③ Kai Y, Hirano K, Maeda Y, Nishimura J, Sasaki T, Kanaide H. Prevention of the hypercontractile response to thrombin by proteinase-activated receptor-1 antagonist in subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 38:3259-3265, 2007 (査読有)
- ④ Maeda Y, Hirano K, Kai Y, Hirano M, Suzuki SO, Sasaki T, Kanaide H. Up-regulation of proteinase-activated receptor 1 and increased contractile responses to thrombin after subarachnoid haemorrhage. *Br J Pharmacol* 152:1131-1139, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉川雄一郎：くも膜下出血モデルウサギ脳底動脈における G タンパク質共役型受容体脱感作機構の障害. 第 25 回スパズムシンポジウム (Stroke2009)、2009 年 3 月 20 日、島根
- ② 亀田勝治 他：クモ膜下出血後の脳底動脈に認められるトロンビンに対する収縮反応の増強に及ぼすトロンビン阻害剤アルガトロバンの予防効果
82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、横浜
- ③ 甲斐康稔：ウサギ脳底動脈における Endothelin-1 収縮への $G\alpha_q$ の関与の検討. 第 24 回スパズムシンポジウム (Stroke2008)、2008 年 3 月 20 日、京都
- ④ 甲斐康稔：トロンビン受容体拮抗薬 E5555 の受容体特異性評価およびくも膜下出血後の脳底動脈収縮性亢進に対する予防効果. 第 23 回スパズムシンポジウム (Stroke2007)、2007 年 3 月 22 日、福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]