

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390409

研究課題名(和文) ライブセルイメージングによる脳微小循環制御機構の解明と麻酔薬及び遺伝子治療の研究

研究課題名(英文) Analysis of cerebral microcirculatory regulation in relation to anesthetics and gene therapy using the live-cell imaging

研究代表者

木下 浩之 (KINOSHITA HIROYUKI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70291490

研究成果の概要(和文)：ラット脳スライス中の微小血管の反応性を評価するためにライブコンピュータイメージングシステムを用いた。ラット脳スライスに電気刺激を加えると、内因性物質(20-HETE)が放出され、脳微小細動脈は収縮することが明らかとなった。一方、興奮制アミノ酸の一つ NMDA は脳血管を拡張させ、この拡張には、血管平滑筋細胞内のスーパーオキシド産生と一酸化窒素合成を伴っていた。臨床使用濃度内の静脈麻酔薬プロポフォールはこれらの反応をいずれも抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We employed the computer-assisted microscopy to evaluate microvascular function in the rat brain slices. Electrical stimulation induced constriction of the cerebral parenchymal arteriole, whereas an inhibitor of 20-HETE abolished this response. NMDA, which is one of excitatory amino acids, produced dilation of these arterioles, corresponding with intracellular production of superoxide in addition to nitric oxide in the smooth muscle cells. Propofol within clinically relevant concentrations reduced these vascular responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

重要臓器のうち、脳はいわば麻酔薬の標的臓器であり、脳血流制御機構とそれに及ぼす麻酔薬作用を明らかにすることは、临床上特に重要である。従来、脳表面の太い動脈は研究されてきたが、脳血管抵抗の大部分をなし脳代謝に強くリンクするとされる脳実質内血管の研究は困難であった。そこで申請者らは、脳スライス標本中の脳実質内細動脈をリ

アルタイムで観察する方法を開発(科学研究費一般研究B,平成10-12年度)、コンピュータ解析システムを導入して内径が10 μ m前後の微小血管にまでこれを応用することに成功し、微小脳血管での一酸化窒素、カリウムチャネル活性の重要性を明らかにした(科学研究費基盤研究B,平成13-17年度,平成16-18年度)。しかし、これらの手法は特殊性があり熟練を要するため、現在、全世

界でもわずかに施設でのみでしか行われておらず、本邦では申請者らのみである。神経活動に伴う脳血流増大は、神経細胞をはじめとする脳組織代謝をサポートする重要な機構である。しかし、脳血流を維持したままで神経細胞の活動を惹起し脳血管反応性を直接検討することは困難であるため、その詳細は不明であった。そこで、申請者らは、脳スライス標本中の血管付近の同定したアストロサイトを電気刺激し、血管にリンクした神経支配を損なわずに脳実質内血管の反応性を研究する方法を提案、これを可能にした（科学研究費 萌芽研究、平成 16-17 年度）。アストロサイトは、その樹状突起を介し脳微小血管からニューロンへ代謝に必要な基質を橋渡しすることが明らかとなり、代謝に伴う脳血流制御の中心的存在であることが示唆されている（J Neurosci 2003）。しかし、アストロサイトが神経細胞の活動に伴い脳血流を制御する機序は未だ不明であり、それに及ぼす麻酔薬作用に関しても知見がない。脳血管攣縮はくも膜下出血の重大な合併症であり、麻酔、集中治療においてしばしば問題となる致命的病態であるが、その決定的な治療法はないのが現状である。脳血管は、Virchow-Robin space というくも膜下腔の続きをなす解剖学的構築を伴い脳実質内に垂直に分布していくことから、脳実質内の血管がくも膜下出血の影響を受けることは明らかである。脳代謝に見合う脳血流を維持することは、脳血管攣縮の治療で最も重要な点であるが、脳血管攣縮が神経細胞活動に伴う脳微小血流制御機構に及ぼす影響やそれを麻酔薬が改善するか否かに関する知見はない。

2. 研究の目的

本研究は、1) 脳の電氣的活動に伴う脳実質内微小循環の血流増大におけるアストロサイトの関与のうち、アストロサイト自身および脳微小血管平滑筋細胞のカルシウムあるいはカリウムチャンネル、一酸化窒素合成酵素や Rho-キナーゼ活性は重要な役割を果たすか否か、2) 脳微小血管攣縮には、カルシウムおよびカリウムチャンネル、一酸化窒素合成酵素や Rho-キナーゼ活性の変化が関与しているか否か、3) 麻酔薬による脳血管攣縮改善作用には麻酔薬間で相違があり、これはカルシウムあるいはカリウムチャンネル活性、一酸化窒素合成酵素活性、Rho-キナーゼのターゲティング機構に及ぼす麻酔薬作用の違いを反映しているか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ペントバルビタールで麻酔したマウスより脳を摘出し、現有のビブラトームを用いて、脳スライス標本（厚さ約 150 μm ）を作成した。ついで、この標本を、酸素と炭酸ガスで

通気したクレブス液（37°C、pH=7.4）で満たした観察用チャンバーに入れ、現有の顕微鏡（オリンパス IX71-23DIC）で脳実質内動脈（外径約 15-20 μm 、内径約 5-10 μm ）を観察した。動脈の画像を現有の CCD カメラで撮影し、コンピュータに取り込んだ。動脈径の変化をコンピュータ上で血管径測定用のソフトウェアを用いて解析した。

先端径 25 μm の concentric bipolar 電極（FHS 社製）を用いて、脳スライス全体を 400 μA で 20 秒間、刺激装置（DPS-07）で電気刺激した。これら電気刺激による血管収縮および拡張反応が麻酔薬を含む各種薬剤抑制されるか否かを検討した。ここでは特に、脳スライス全体を刺激することでアストロサイトを刺激して、脳微小血管反応を惹起させ、その反応に麻酔薬、ナトリウムあるいはカリウムチャンネル、一酸化窒素、NMDA 受容体が関与するか否かを検討した。

現有の共焦点顕微鏡 FV300 ヘダイオードレーザー式（現有のオリンパス社製共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV300 用、波長 405 nm）を組み込み、細胞の核を青色のヘキスト蛍光で表示できるようにした。蛍光色素を *in vivo* でこの場合、ペントバルビタールで麻酔したマウス頭部のブレグマの側方 1mm、後方 0.5mm より外径 0.23mm の針を皮膚上から 2mm 刺入することで側脳室を穿刺して、くも膜下腔に融合タンパクを投与し（脳脊髄液総量 100 μl として濃度を計算）、48 時間後に実験を開始できるように計画した。融合タンパク発現効率が不十分な場合は、脳スライス作成後の色素導入も併用する予定である。トランスジェニックマウス（FVB/N-Tg(GFAPGFP)14Mes/J）を用い、アストロサイト刺激による脳微小血管反応でアストロサイト、血管平滑筋細胞それぞれの中でのカルシウムイオンの流れや膜電位の推移を観察できるほか、細胞間のカルシウムの流れや膜電位変化の連関を明らかにする計画であった。加えて、組織内一酸化窒素には DAF、スーパーオキシドにはヒドロエチジンを用いることとした。

当初の計画では、cGMP の標的である可溶性グアニレートシクレス依存プロテインキナーゼ（cGMP-DPK）の両端に蛍光色素 CFP および YFP の遺伝子配列をそれぞれ組み込み（CGY）、さらに CGY を可溶性グアニレートシクレスの α および β サブユニットの遺伝子配列と結合させ（sGC α -CGY および sGC β -CGY）、この遺伝子を pcDNA3.1(+)ベクターに組み込み、脳室穿刺でくも膜下腔に投与し 48 時間かけてマウス脳に発現させる予定であった。この際、細胞内に発現した融合タンパク sGC α -CGY、sGC β -CGY は、一つの蛍光タンパク融合可溶性グアニルシクレス（NOA-1）を形成する。一酸化窒素が一分子結合すると、NOA-1 は cGMP を一定の割合で産

生ずる。発現した CGY は cGMP の標的である cGMP-DPK を含むので、この産生された cGMP は、cGMP-DPK にすべて結合し、これにより FRET シグナル(黄)が発生すると考えていた。

さらに、当初はくも膜下出血モデルマウスを作成する計画をしていた。ペントバルビタールで麻酔したマウスの総頸および外頸動脈を露出し外頸動脈分枝を結紮後、外頸動脈から総頸動脈を介して内頸動脈内へ抵抗を感じるまで5-0 ナイロン糸を進め、さらに糸を進め血管を穿破させモデルを完成させる計画であった。そのモデルを用いて、以上の検討を繰り返す計画であった。

4. 研究成果

ビブラトームを用いて作成したラット脳スライス標本(厚さ約 150 μm)内の脳実質内動脈(外径約 15-20 μm , 内径約 5-10 μm)を観察した。

concentric bipolar 電極を用いた脳スライス刺激(400 μA で 20 秒間)により、刺激中は血管収縮反応が、刺激後は逆に血管拡張反応が認められた。これら電気刺激による血管収縮および拡張反応は、テトロドトキシン(10^{-6} mol/L)で完全に抑制された。拡張反応は、一酸化窒素合成酵素阻害薬である L-NAME(3×10^{-4} mol/L)で完全に抑制された。したがって、この拡張反応には、神経細胞あるいは血管内皮細胞で合成された一酸化窒素が関与するものと考えられた。さらに 20-HETE 合成酵素阻害薬 HET0016 (10^5 mol/L)は電気刺激中の収縮反応を抑制した。外因性の 20-HETE (10^{-8} から 10^{-6} mol/L)も同様に脳実質内細動脈を収縮させた。現有の共焦点顕微鏡 FV300 でスーパーオキシドの測定のため、脳スライスをヒドロエチジン (2×10^{-6} mol/L)に 20 分間暴露した後、20-HETE (10^{-6} mol/L)を付加したところ、時間依存性にスーパーオキシドが発生し、この産生は、NADPH オキシダーゼ阻害薬 gp91ds-tat (10^6 mol/L)で抑制された。これらの結果から、20-HETE は、脳実質内微小血管で、スーパーオキシドを産生し、これらの血管を収縮させることが明らかになった。さらにこのスーパーオキシドの産生に、NADPH オキシダーゼの関与が示唆された。次いで、興奮性アミノ酸 NMDA (10^{-7} - 10^{-5} mol/L)を脳スライスに付加したところ脳微小血管の拡張反応が観察された。この拡張反応は、神経型一酸化窒素合成酵素抑制薬 SMTC(10^{-5} mol/L)で抑制され、臨床使用濃度のプロポフォール (3×10^{-7} - 10^{-6} mol/L)で強く抑制された。

現在までに、マウス・ラットの in vivo 実験を本格化するために実験動物用麻酔器と人工呼吸器を購入して鋭意準備を開始している。FRET を行う準備の一環として側脳室へ色素を注入して、その正確性を検討中である。

この際、穿刺の正確性をえるにはもう少し時間がかかる見込みである。当初計画していた FRET および脳室内 siRNA 投与については現在準備中であるが、脳室内に薬剤を投与しその効果をみるまでには時間がかかる可能性がある。まず脳室内への各種薬剤投与により、摘出後の脳スライス中の血管反応がどのように変化するかを観察する方法も考慮する予定である。

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 9 件)

- ① 木下浩之: 『静脈麻酔薬の作用機序: 受容体と細胞内シグナル伝達機構』プロポフォール. Anesthesia 21 Century 2011; 13: 4-10, 査読なし
- ② 木下浩之: 酸化ストレスからみた臓器保護: 心不全と酸化ストレス. 日本臨床麻酔学会雑誌 2011; 31: 116-123, 査読あり
- ③ 木下浩之: ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ-Akt 経路と血管病態生理. Anesthesia 21 Century 2010; 12: 2309-2316, 査読なし
- ④ Haba M, Hatakeyama N, Kinoshita H, Teramae H, Azma T, Hatano Y, Matsuda N: The modulation of vascular ATP-sensitive K⁺ channel function via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activated by phenylephrine. J Pharmacol Exp Ther 2010; 334: 673-678, 査読あり
- ⑤ 木下浩之: 血管への酸化ストレスと麻酔薬. 麻酔 2009; 58: S101-S108, 査読あり
- ⑥ Haba M, Kinoshita H, Matsuda N, Azma T, Hama-Tomioka K, Hatakeyama N, Yamazaki M, Hatano Y: The beneficial effect of propofol on arterial adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel function impaired by thromboxane. Anesthesiology 2009; 111: 279-286, 査読あり
- ⑦ Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Azma T, Nakahata K, Matsuda N, Hatakeyama N, Kikuchi H, Hatano Y: The role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in cerebral arteriolar constriction and the inhibitory effect of propofol. Anesth Analg 2009; 109: 1935-1942, 査読あり
- ⑧ Nakahata K, Kinoshita H, Azma T, Matsuda N, Hama-Tomioka K, Haba M, Hatano Y: Propofol restores brain

microvascular function impaired by high glucose via the decrease in oxidative stress. *Anesthesiology* 2008; 108: 269-275、査読あり

- ⑨ Nakahata K, Kinoshita H, Hama-Tomioka K, Ishida Y, Matsuda N, Hatakeyama N, Haba M, Kondo T, Hatano Y: Cholinesterase inhibitor donepezil dilates cerebral parenchymal arterioles via the activation of neuronal nitric oxide synthase. *Anesthesiology* 2008 109:124-129、査読あり

〔学会発表〕(計6件)

- ① Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Hatakeyama N, Hatano Y: Roles of oxidative stress and propofol in cerebral microvessel dilation via NMDA receptors. 2010 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, San Diego, CA, USA, October 16-20, 2010
- ② Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Hatano H: The role of NMDA receptors in rat cerebral microvessel dilation and the inhibitory effect of propofol, 2010 Annual Meeting of the International Anesthesia Research Society, March 20-23, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ③ Kinoshita H, Hatakeyama N, Hatano Y: The Role of Superoxide in 20-HETE-Induced Vasoconstriction and the Effect of Propofol in the Brain, 2009 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 17-21, 2009, New Orleans, LA, USA
- ④ Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Hatakeyama N, Hatano Y: The inhibitory effect of propofol on the cerebral microvessel function via neurovascular coupling, 2008 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 18 -22, 2008, Orlando, FL, USA
- ⑤ Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Hatakeyama N, Hatano Y: The role of 20-HETE in the cerebral microvessel function as consequences of neurovascular coupling, 2008 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 18 -22, 2008, Orlando, FL, USA
- ⑥ Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Nakata R, Hatano Y: Constriction Followed by Dilation of Cerebral Microvessels as Consequences of

Neurovascular Coupling, 2007 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 13 -17, 2007, San Francisco, CA, USA

〔図書〕(計1件)

1. 木下浩之、克誠堂出版、1. 局所麻酔薬中毒の薬理-B. 心筋と血管平滑筋- 局所麻酔薬中毒・アレルギー、2008、24-39

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/anesthesiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 浩之 (KINOSHITA HIROYUKI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70291490

(2) 研究分担者

松田 直之 (MATSUDA NAOYUKI)
名古屋大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50332466
中畑 克俊 (NAKAHATA KATSUTOSHI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70332971
畑埜 義雄 (HATANO YOSHIO)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70115913
(H22：連携研究者)