

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591696

研究課題名(和文) くも膜下出血後の脳血管攣縮における脂質過酸化と PAF アセチルヒドロラーゼの関与

研究課題名(英文) Lipid peroxidation and PAF acetylhydrolase activity of cerebrospinal fluid in patients with subarachnoid hemorrhage

研究代表者

平島 豊 (HIRASHIMA YUTAKA)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：30135016

研究成果の概要(和文)：

くも膜下出血(SAH)患者24症例の脳脊髄液中(CSF)の8-iso-PGF<sub>2α</sub>、HODE、HETE、PAFアセチルヒドロラーゼ(PAFAH)活性を測定した。これらを同時に測定した総ヘモグロビン量で除して、標準化した。症候性脳血管攣縮を示さなかった患者群(SVS-群)と示した患者群(SVS+群)で三種類のマーカー(8-iso-PGF<sub>2α</sub>、HODE、HETE)とPAFAH活性を経時的に比較した。いずれも発症0-4日、発症5-9日でSVS-群で高かった。これら三種類のバイオマーカーとPAFAH活性とはよく相関した。生体に存在する三種類のPAFAHの抗体を用いたWestern BlottingでCSF中のPAFAHはほとんどが血漿型PAFAHであることが分かった。SVS-, SVS+のいずれの群にも完全に酵素活性が消失するホモ型の突然変異は認めなかった。一方、ヘテロ型、と正常型の分布は両群で差を認めなかった。以上の結果から血漿中に存在したPAFAHがSAH時に脳脊髄液中に流入し、脳血管周囲の血塊中で生じる過酸化脂質を削減し、脳血管攣縮発生の防御の役割を担っていることが考えられた。しかし、その活性の調節機構に関しては不明である。

研究成果の概要(英文)：

We attempt to compare plasma PAF-AH activity and free forms of bio-marker of lipid peroxidation in cerebrospinal fluid (CSF) between patients with and without symptomatic vasospasm (SVS) after SAH. The identification of PAF-AH in CSF was performed by Western blotting. The genotype at position 279 of the plasma PAF-AH gene was determined. The activities of PAF-AH and the levels of free 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (free isoPs), free hydroxyoctadecadienoic acid (free HODE), and free hydroxyeicosatetraenoic acid (free HETE) in CSF were measured. The PAF-AH in CSF was confirmed to be only the plasma type. The genotype of the plasma PAF-AH was not different between patients with and without SVS. Free isoPs, free HODE, and free HETE showed higher values in patients without SVS in 0-4 days and 5-9 days after SAH. The PAF-AH activity also showed higher in patients without SVS in 0-4 days and 5-9 days after SAH. The associations between PAF-AH activity and free isoPs, and between PAF-AH activity and free HODE were significant. Oxidized lipids of lipoproteins and blood cell membranes produced by reactive oxygen species in CSF when SAH occurs may be the main source of lipid peroxidation. Plasma PAF-AH can hydrolyze oxidized phospholipids, and may attenuate the spreading of lipid peroxidation and participate in defense mechanism against vasospasm after SAH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

キーワード：脳血管攣縮・くも膜下出血・脂質過酸化

### 1. 研究開始当初の背景

SAHのほとんどは頭蓋内に生じた脳動脈瘤の破裂により生ずる。外科的技術の発展に伴い、出血源の動脈瘤の処置に対する治療は進歩したが、残念ながらSAH後の死亡率、後遺症は大きく減少したとは言い難い。その理由は出血後に生じる脳血管攣縮(VS)の治療法が確立していないためと考えられている。現在、VSに対し薬理的、内科的、外科的な治療法が試みられているが、有効性が証明されたものはそれほど多くない。VSの病態生理の完全な理解が得られていないことが、その原因と考えられる。VSの病態を解明し、その発症を予測・予防できれば、今後のSAH患者の治療成績の向上、医療費削減に貢献するものと思われる。VS発生の病態解明のアプローチとして、脳の主幹動脈の収縮、脳の微小循環の傷害、脳構成細胞の機能的、器質的傷害などの解明に集中している。攣縮誘発物質の見当、VS時の血管の収縮機構、VS時の脳構成細胞障害の検討がいろいろな研究アプローチで展開されている。

### 2. 研究の目的

SAH患者のCSF中では動脈血中の十分な酸素と赤血球の崩壊産物が関与し、多くの活性酸素種が生成すると考えられる。これらが血管構成細胞や脳構成細胞の膜構造に脂質過酸化を生じ、それぞれの細胞の障害がVSの病態に大きな役割を演じていると考えられている。脂質過酸化の中心はSAHに伴って血管周囲に蓄積した血球、血漿成分であり、そこから血管、脳構成細胞へと脂質過酸化が連鎖すると考えられる。細胞膜を構成するリン脂質等の側鎖のアラキドン酸が酸化されると生じる8-iso-PGF<sub>2α</sub>は有名である。血漿中にはヒトではLDLと結合する形で血小板活性化因(PAF)分解酵素であるPAFAHが存在する。この酵素の主な働きはPAFの分解よりもLDL中の酸化リン脂質を分解することである。この酵素がSAH時に脂質過酸化発生の源でその削減に関与する可能性について今回の研究で検討を試みた。脂質過酸化とVS病態に関する研究は散見されるが、脂質過酸化を制御する血漿型PAFAHに注目したVSの病態研究は国内、国外を含めて、我々の研究のみと考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) CSF中の8-iso-PGF<sub>2α</sub>、HODE、HETEの測

### 定法

分担者吉田等の開発した方法を用い、マス検出装置を備えたガスクロマトグラフィーによって分析した。資料に内部標準物質を添加し、報告のごとく処理を行い、得られたTMS化サンプルをマス検出装置を備えたガスクロマトグラフィーによって分析した。

#### (2) CSF中のPAFAH活性測定

1-myristoyl-2-[(*p*-nitrophenyl)-succinyl]phosphatidylcholineを基質に用い、産生する*p*-nitrophenyl succinateをプレートリーダー(OD<sub>405</sub>)で測定する方法でおこなった。

#### (3) CSF中のヘモグロビン濃度

シアンメトヘモグロビン法で測定した。試薬ヘモリナック3(日本光電)を用いて測定した。標準ヘモグロビンを使用し、検量線を作成し、ヘモグロビン濃度を決定した。

#### (4) CSF中のPAFAHのisoformの同定

ヒトには3種類のPAFAHが存在する。血漿型、組織型type 1, type 2であるが、CSF中のPAFAHをWestern Blottingを用いて同定した。

#### (5) 血漿型PAFAH遺伝子279位のgenotypeの検討

Stafforiniの方法を用い、完全に活性の消失するホモ型、半減するヘテロ型、正常型を決定した。

### 4. 研究成果

(1) 症候性脳血管攣縮の有無とCSF中の遊離型8-iso-PGF<sub>2α</sub>、HODE、HETE濃度とPAFAH活性

8-iso-PGF<sub>2α</sub>、HODE、HETE濃度とPAFAH活性を総ヘモグロビン濃度で除し、標準化した。この値をSVS+群とSVS-群でSAH発症からの日数ごとで比較した。発症0-4日、発症5-9日でSVS-群で遊離型の三つのマーカーともに高かった。またPAFAH活性もSVS-群が高かった。

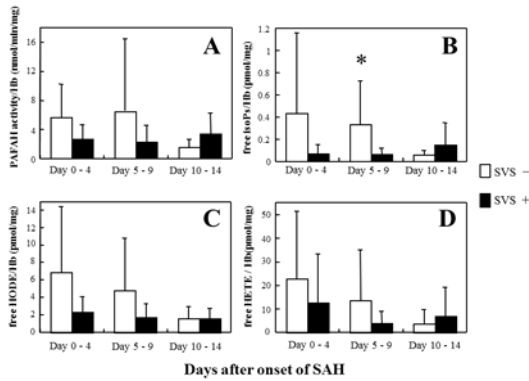


図1. SVS-群とSVS+群のPAFAH活性(A)、遊離8-iso-PGF<sub>2α</sub>(B)、遊離HODE(C)、遊離HETE(E)濃度の比較

(2) 遊離型 8-iso-PGF<sub>2α</sub> HODE、HETE 濃度と PAFAH 活性との相関

三種類の遊離型マーカーと PAFAH 活性の相関を検討したがいずれも有意に相関し、PAFAH 活性が遊離型マーカーの発言に関与していることが示唆された。

(3) CSF 中の PAFAH の isoform の同定

血漿型、組織型 type 1, type 2 の抗体を用いた CSF 中の Western Blotting の結果、CSF 中の PAFAH はほとんどが血漿型であることが分かった。

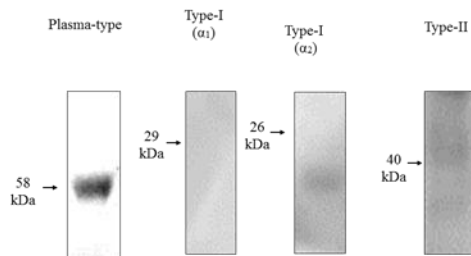


図2. CSF中のPAFAHのisoformの同定

(4) 血漿型PAFAH遺伝子279位のgenotypeの検討

SVS-, SVS+のいずれの群にも完全に酵素活性が消失するホモ型の突然変異は認めなかった。一方、ヘテロ型、と正常型の分布は両群で差を認めなかった。

#### 4. 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 2 件)

① 平島豊、脳血管攣縮患者 CSF 中の酸化ストレスマーカー、8-イソプロスタン F2α と PAF アセチルヒドロラーゼ活性の測定、第 67 回日本脳神経外科学会総会、2008 年 10 月 1-3 日、盛岡

② 道志勝、平島豊、ヒト II 型 PAF アセチルヒドロラーゼ遺伝子導入マウスによる神経細胞の長期的な抗脂質過酸化効果の検討。日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28-30 日、静岡

〔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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平島 豊 (HIRASHIMA YUTAKA)  
帝京大学・薬学部・教授  
研究者番号:30135016

(2) 研究分担者

道志 勝 (DOSHI MASARU)  
帝京大学・薬学部・助教  
研究者番号:30392385  
吉田 康一 (YOSHIDA YASUKAZU)

独立行政法人産業技術総合研究所・研究チ  
ーム長  
研究者番号:90358333

(3) 連携研究者  
( )