

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591080

研究課題名（和文） 脳虚血急性期病態における血管内皮障害の機序解明とその制御法

研究課題名（英文） Mechanism of endothelial dysfunction in the acute brain ischemia and development of therapeutic intervention.

研究代表者

八木田 佳樹 (Yagita Yoshiki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20403066

研究成果の概要（和文）：内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）は血管内皮機能維持に重要な分子である。脳虚血急性期には eNOS の発現は亢進するものの、Ser1177 部位のリン酸化は大きく低下しており、機能不全の状態であることを見出した。Rho-kinase 阻害薬は eNOS リン酸化を亢進させることで虚血性脳障害を緩和した。また高血圧状態では脳小血管の eNOS リン酸化が低下しており、脳虚血病態を悪化させることを示した。降圧治療により eNOS リン酸化を保持することが可能であり、さらに phosphodiesterase3 阻害薬は降圧とは独立して eNOS リン酸化を保持し、内皮保護、脳虚血障害の緩和に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is one of key molecules to maintain endothelial function. Although eNOS expression was increased in the brain small vessels after cerebral ischemia, phosphorylation level of Ser1177 of eNOS molecule was significantly reduced, indicating eNOS dysfunction. Rho-kinase inhibitor can ameliorate ischemic injury via increasing eNOS phosphorylation. Hypertension also decreased eNOS phosphorylation in the brain small vessels and deteriorated ischemic injury, and anti-hypertensive therapy could preserve eNOS phosphorylation. Additionally, phosphodiesterase3 could preserve eNOS phosphorylation and function and ameliorated cerebral ischemic injury. These results may contribute to develop new therapy for acute brain ischemia and brain small vessel disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳虚血、血管内皮、微小循環障害、Rho-kinase、一酸化窒素合成酵素

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は寝たきり原因の第1位であり、なかでも虚血性の脳障害である脳梗塞は発生数が多く今後もますます増加することが懸念されている。一般に脳梗塞は急性期の治療が予後を大きく左右するため、新たな脳保護薬の開発が待ち望まれているのが現状である。

脳虚血急性期の組織障害進展には、直接の神経細胞障害のほかに血管内皮機能障害による微小循環障害が関与していると考えられる。脳微小循環障害の進展は梗塞巣の拡大進展につながるため、脳虚血急性期の血管内皮障害を治療標的として微小循環保持を目指すことは有効な治療法開発につながる可能性がある。

Rho-kinaseは1990年代半ばに見いだされたセリンスレオニンキナーゼである。Rho-kinaseは低分子量G蛋白質Rhoによりその活性が制御されており、これまでクモ膜下出血後の血管攣縮や狭心症、高血圧、肺高血圧など多くの疾患で病態への関与が指摘されている。近年我々を含めた複数の研究グループから齧歯類を用いた脳虚血モデルにおいてRho-kinase活性を阻害することで脳梗塞体積を縮小する効果があることが報告された。Rho-kinase阻害薬の効果は内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)活性化を介するものと説明されていたが、eNOSの重要な活性調節機構であるSer1177リン酸化の脳虚血における動態とこれに対するRho-kinase阻害薬の効果については不明であった。

さらに高血圧などの動脈硬化危険因子は血管内皮機能障害を介して脳虚血発症時の組織損傷を増悪させる。しかし脳実質内小血管の内皮機能の指標については鋭敏な指

標が少なく、初期の血管内皮機能障害を評価することは簡単ではない。eNOSリン酸化は血管内皮機能の鋭敏なマーカーとなる可能性があり、これを指標として内皮機能を評価し、治療薬の効果判定が可能となる可能性がある。

2. 研究の目的

以下の点について検討を行うことを目的とした。(1)ラット局所脳虚血モデルにおけるeNOS発現量、リン酸化を脳の各領域で経時的に評価する。(2)Rho-kinase阻害薬の脳小血管のeNOS発現量、リン酸化に対する急性効果と脳保護効果について評価する。(3)高血圧モデル動物として高血圧自然発症ラットを用い、eNOS発現量、リン酸化を血圧値の推移とともに評価する。(4)これを指標として降圧薬やフォスフォジエステラーゼ阻害薬の血管内皮機能保持効果を評価する。

3. 研究の方法

(1) 局所脳虚血モデルにおけるeNOS発現量、リン酸化の動態

Wistarラットを用い、ハロセン吸入麻酔下に総頸動脈から栓糸を上げ、ウエッジさせることで主に中大脳動脈領域に脳虚血を誘導、80分後に再灌流させた。虚血6、24時間後、2、7日後の脳を取り出し、凍結切片を作成、または蛋白サンプル用に脳組織を採取した。神経細胞脱落を微小管結合蛋白2の免疫組織化学染色で評価した。eNOSの発現動態はeNOSと血管内皮マーカーであるvon Willbrand因子の免疫組織化学染色で評価した。eNOS蛋白の発現量、リン酸化はWestern blotで評価した。

(2) Rho-kinase阻害薬の脳小血管の

eNOS 発現量、リン酸化に対する急性効果および脳保護効果

Rho-kinase 阻害薬として fasudil を用いた。正常ラットに fasudil を 10mg/kgBW 腹腔内投与し、1、4、8、24 時間後の eNOS 発現量、リン酸化を Western blot で評価した。NOS アイソフォームへの影響を評価するため、神経型 NOS の発現量、リン酸化についても評価した。

Wistar ラットの 80 分間一過性局所脳虚血モデルに対して、血管閉塞直後または再灌流時に fasudil を 2 または 10mg/kgBW 腹腔内投与した。梗塞サイズは 2mm 厚の脳スライスを作成し、TTC 染色、各スライスの梗塞面積を積算することで算出した。

(3) SHR の脳実質内小血管における eNOS 発現量、リン酸化

SHR は 5 週齢前後から血圧が上昇し始め、10 週齢頃では明らかな高血圧を示す。血圧上昇による eNOS 蛋白の発現量とリン酸化を評価するため、各週齢において脳皮質の組織を採取し、ホモジネートを作成、Western blot で評価した。

(4) 降圧薬やフォスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬の血管内皮機能保持効果

SHR において血圧が上昇し始める 5 週齢からオルメサルタンを慢性投与し、血圧上昇を抑制した。大脳皮質小血管における eNOS 蛋白の発現量とリン酸化は Western blot で評価した。eNOS 活性は eNOS の比較的阻害薬である L-NIO を投与し、それによる脳血流量の変化をみることで評価した。また局所脳虚血による脳損傷体積に対する影響も評価した。また降圧以外の血管内皮保護療法の可能性を評価するため PDE 阻

害薬であるシロスタゾールを SHR に慢性投与した場合の効果についても同様に評価した。

4. 研究成果

虚血誘導後、線条体背外側領域は早期から神経細胞の脱落が認められたが、大脳皮質では 6 時間後から 24 時間後にかけて、虚血中心から辺縁部へと組織損傷が進行していた。虚血発症早期の時点では eNOS の Ser1177 部位リン酸化は亢進し、eNOS 活性化が生じていた。しかしその後、組織損傷が進展拡大していくと、既に損傷された領域では eNOS 蛋白発現は増加するものの、リン酸化は大きく低下しており、さらに単量体化による uncoupling 状態に陥っていた。虚血領域においても eNOS 発現は血管内皮にほぼ限局していた。周辺領域では eNOS リン酸化が保たれた状態で発現量が増加していた。虚血領域に対して側副血行路を介して血流を供給するため通常状態よりも脳血流量は増加し、その分 shear stress がかかり、eNOS が活性化されたものとする。Rho-kinase 阻害薬の全身投与後 4-8 時間で、大脳皮質における eNOS リン酸化は亢進していた。この時相では eNOS 蛋白自体の発現量増加は認められなかった。脳虚血発症直後または 80 分後の時点で Rho-kinase 阻害薬を投与すると、脳組織損傷は eNOS 活性化を介して軽減され、血管内皮の機能障害も軽減されていた。Rho-kinase 阻害薬はリン酸化を介した速い効果発現により、虚血発症後の投与であっても脳保護効果が期待できる。

SHR では、週齢とともに血圧が上昇し、これに伴い eNOS-Ser1177 のリン酸化は低下していた。(図 1)

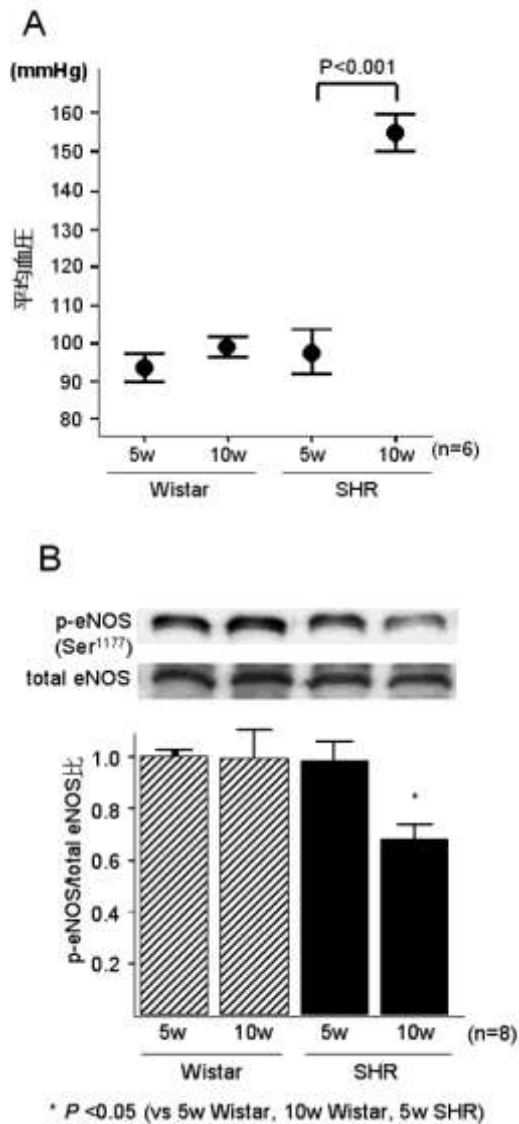


図1. SHRにおける血圧上昇 (A) に伴う eNOS リン酸化低下 (B)。

このeNOS リン酸化低下は高血圧による血管内皮機能低下を反映しているものと考えられる。そしてこのeNOS リン酸化低下に対して、アンジオテンシンIIの受容体拮抗薬であるオルメサルタンを投与して降圧を行うとeNOS リン酸化低下を防ぐことが可能であった。eNOS 阻害薬を用いた脳血流の変化を測定することで、降圧治療によりeNOS 機能も保たれていることが示された。

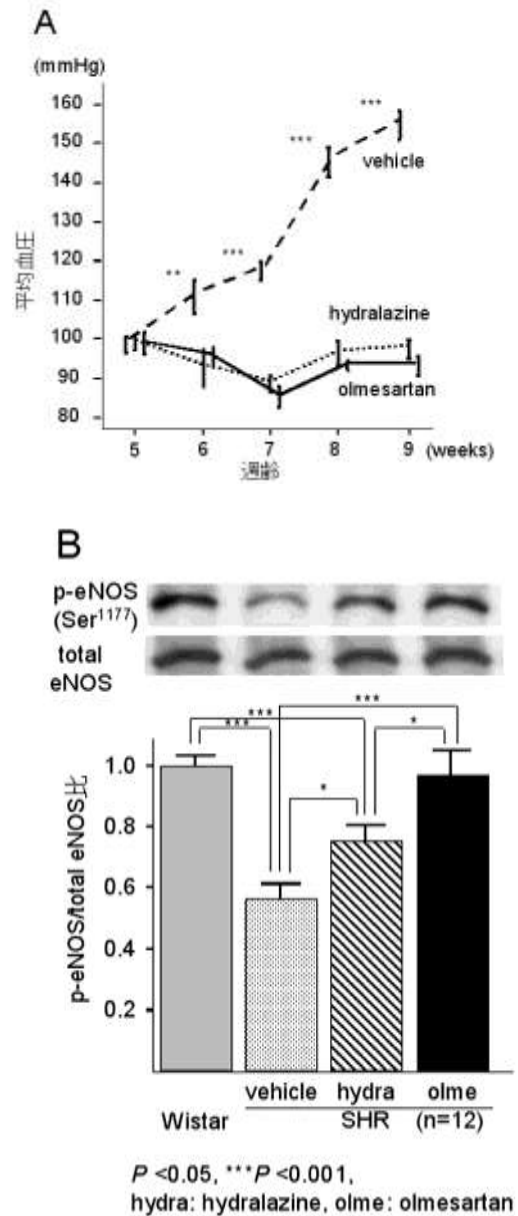


図2. 降圧薬投与による血圧上昇の抑制 (A) とそれによる eNOS リン酸化保持効果 (B)。

また局所脳虚血が加わった際、血管内皮機能が保持されていることにより微小循環障害が緩和され、脳組織損傷も軽減されることが示された。さらに cilostazol には降圧とは独立してeNOS リン酸化を保持する効果があることを示した。

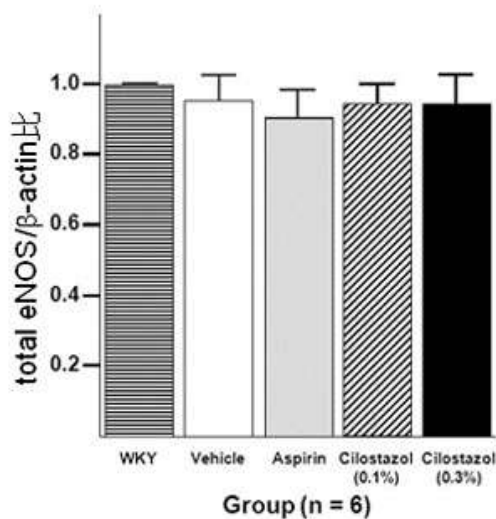
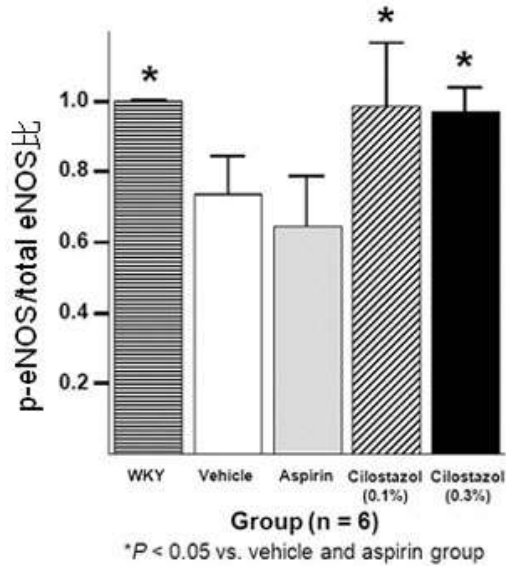
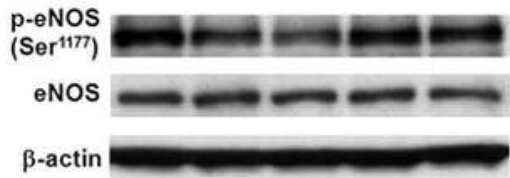


図3. シロスタゾールによる eNOS リン酸化の保持。高血圧により eNOS リン酸化は低下するが、シロスタゾールの投与によりリン酸化は保持される。アスピリンにはこのような効果は認められない。また eNOS 蛋白発現量は各群で差はなかった。

降圧によらない内皮保護機構には内皮細胞における cAMP 増加を介した系が関与し

ていると考えられる。この効果により eNOS を介した血管反応性も保持され、微小循環は保持され、局所脳虚血による脳組織損傷も軽減されることが示された。

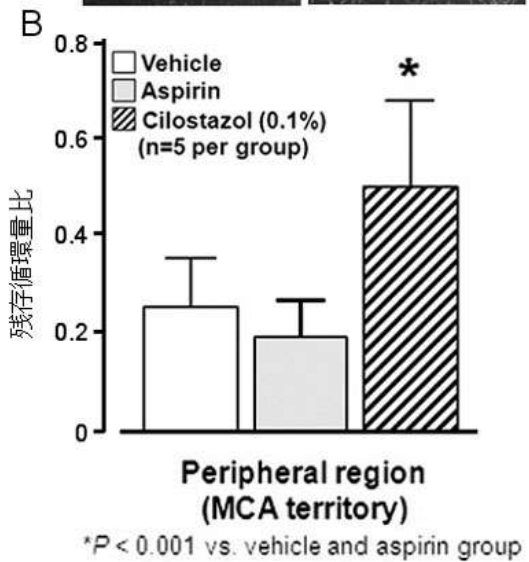
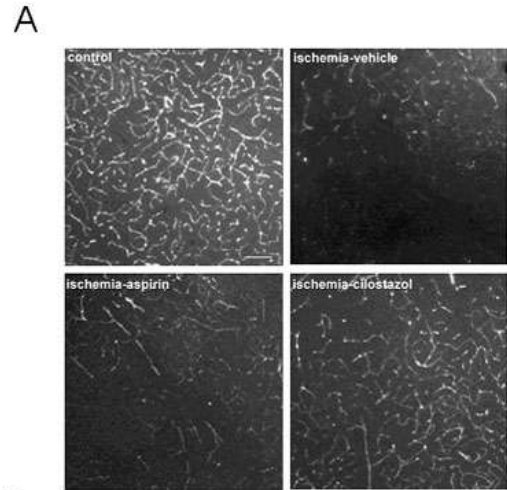


図4. シロスタゾールによる微小循環保持。虚血誘導 80 分後に蛍光ラベルした血漿を静注し、ラベルされる微小血管により残存微小循環血流量を評価した (A)。定量評価を行うとシロスタゾール投与により微小循環は有意に保持されているが、アスピリンにそのような効果は認められない (B)。

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2件)

- ① Oyama N, Yagita Y, Kawamura M, Sugiyama Y, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Kitagawa K. Cilostazol, not aspirin, reduces ischemic brain injury via endothelial protection in spontaneously hypertensive rats. Stroke 42(9):2571-2577, 2011 査読あり
- ② Oyama N, Yagita Y, Sasaki T, Omura-Matsuoka E, Terasaki Y, Sugiyama Y, Sakoda S, Kitagawa K. An angiotensin II type 1 receptor blocker can preserve endothelial function and attenuate brain ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. J Neurosci Res 88(13):2889-2898, 2010 査読あり

[学会発表] (計2件)

- ① Yoshiki Yagita, Tsutomu Sasaki, Naoki Oyama, Yukio Sugiyama, Yasukazu Terasaki, Emi Omura-Matsuoka, Kazuo Kitagawa. Downregulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation contributes to infarct expansion after focal cerebral ischemia. International Stroke Conference. 2011. 2.9-2011.2.11, Los Angeles, USA
- ② Naoki Oyama, Yoshiki Yagita, Tsutomu Sasaki, Emi Omura-Matsuoka, Yasukazu Terasaki, Yukio Sugiyama, Miki Kawamura, Kazuo Kitagawa. Cilostazol but Not Aspirin can Maintain Cerebrovascular Function in Spontaneously Hypertensive Rats. 2011. 2.9-2011.2.11, Los Angeles, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.osaka-njm.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木田 佳樹 (Yagita Yoshiki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20403066

(2) 研究分担者

北川 一夫 (Kitagawa Kazuo)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70301257

(3) 研究協力者

佐古田 三郎 (Sakoda Saburo)
刀根山病院・院長
(H22年3月まで連携研究者
H22年4月から研究協力者として参画)