

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 5月27日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791471

研究課題名（和文）星状細胞内カルシウム濃度振動性変化による脳血流調節機構の解明

研究課題名（英文）The regulatory mechanism of microvessels and calcium signaling through astrocyte.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：脳血流は、神経血管カップリング機構を介し、局所神経活動に呼応してリアルタイムに制御されている。本研究では、脳スライス切片を用い血管内径が10 mm以下の極めて微細な脳血管をコンピュータ上で解析し、大脳皮質から髄質に向け貫通する脳細動脈の収縮・弛緩反応を観察した。脳神経細胞と協同し活性化された星状細胞が、カルシウムシグナル伝達を介して脳実質内細動脈の血管径調節に重要な役割を果たしていることを示した。

研究成果の概要（英文）：The cerebral microcirculation has a central role in supporting the neurological activity, yet our understanding how anesthesia affect the regulation mechanisms of local cerebral blood flow is extremely limited. We investigated the role of astrocyte in neurovascular coupling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,700,000	510,000	2,210,000
22年度	900,000	270,000	1,170,000
23年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：星状細胞、振動性細胞内カルシウム濃度変化、麻酔薬、脳血管、血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

（1）脳血流は、神経血管カップリング機構を介し、局所神経活動に呼応してリアルタイムに制御されている。脳神経細胞と協同し活性化された星状細胞（アストロサイト；astrocyte）が、カルシウムシグナル伝達を介して脳実質内細動脈の血管径調節に重要な役割を果たしていることが報告されていたが、アストロサイト内カルシウム濃度の上昇が、どのような条件の下で血管収縮・拡張反応を引き起こすか、また、この際どのような血管作動性物質が星状細胞突起を介して血管平

滑筋に伝達されるかは、未だ明らかでなかった。また、これらアストロサイトを介する脳血管調節機構に対する麻酔薬の影響についても、これまで全く知られていなかった。

（2）カルシウムイオンは、細胞内セカンドメッセンジャーとして生体内で広く利用されており、細胞質および核内における同イオン濃度上昇の振幅度（amplitude）やその周波数変調（frequency）、あるいはこれらシグナルの空間的広がりを巧みに組み合わせることで、多岐にわたる情報をセカンドメッセ

ンジャーとして下流の細胞内カスケードに伝える役割を担っていることが指摘されていた。

(3) これまで研究代表者らは脳スライス切片を用い、血管内径が 10 mm 以下の極めて微細な脳血管をコンピュータ上で解析する手法を確立させ、大脳皮質から髄質に向け貫通する脳細動脈の収縮・弛緩反応を薬理学的手法を用いて研究することにすでに成功していた。これら脳スライス切片を用いた実験では、脳細動脈のみならず血管に隣接するアストロサイトを同時に観察することが可能であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では種々の酵素やイオンチャネルの選択的作用薬および拮抗薬を用いる薬理学的手法のほか、確実な因果関係解明のため一酸化窒素合成酵素ノックアウトマウスやカリウムチャネルトランスジェニックマウスなど遺伝子操作動物も使い、脳実質内微小血管の血管調節機構を解明することを目的とした。さらに、ライブセルイメージングを用い共焦点顕微鏡下にアストロサイトからの細胞内カルシウム伝達を連続的に観察し、脳血流調節機構を神経組織と脳血管との連関の視点から以下の仮説を明らかにすることを目的とした。また、本研究では臨床濃度の吸入麻酔薬および静脈麻酔薬が脳血管に及ぼす影響についても明らかにし、脳保護の観点から麻酔管理に適した麻酔薬および麻酔方法を示唆することを目的とした。

① グルタミン酸受容体刺激および低酸素ストレス時に見られる脳実質内細動脈の収縮・弛緩反応は、アストロサイトを起点とするカルシウムシグナル伝達の違いを反映したものである。すなわち、アストロサイト内振動性カルシウム濃度変化 (calcium oscillations) を構成する周波数変調 (frequency) および振幅変調 (amplitude) において、グルタミン酸受容体刺激時と低酸素刺激時に差異がみられ、この違いが血管反応性の違いを反映している。

② アストロサイト内で観察されるカルシウムシグナルの性質の違いは、アストロサイト末端部から放出され血管平滑筋に伝達される血管作動性物質の違いを反映している。また、細胞内カルシウム濃度の振幅変調は、血管作動性物質の放出量を規定しており、刺激の強さに応じて変化する。拡張性血管作動性物質の主体は、カリウムイオンおよび一酸化窒素である。一方、収縮性物質としてエンドセリン、トロンボキサンが関与している。

③ 各種麻酔薬はグルタミン酸受容体刺激および低酸素刺激における脳血管収縮・弛緩反応を修飾する。吸入麻酔薬はアストロサイトにおけるカルシウムシグナルの発生およびその伝達を抑制し、結果として血管収縮および弛緩反応をどちらも強く抑制する。一方、静脈麻酔薬はこれらカルシウムシグナル伝達機構を抑制しないため、アストロサイトを介する血管調節に影響しない。

3. 研究の方法

(1) ハロタンで麻酔した上記マウスを開胸し、冷却したクレブス液約 50ml を 100mmHg の圧をかけながら左心室より灌流し、血管内血液をすべて洗い流したあと脳を摘出した。次に、現有のビブラトームを用いて大脳新皮質を含むスライス標本 (厚さ約 125 μm) を作成した。この際、脳標本は酸素 95% + 炭酸ガス 5% で通気した 4°C 冷却クレブス液内を作成した。ついで、この脳スライス標本を酸素 93% + 炭酸ガス 7% (われわれのシステムではこの条件下で pH=7.4 となる) で通気し、37°C に加温したクレブス液で満たした観察用チャンパーに入れ、光学顕微鏡 (IX71-23DIC、オリンパス) を用いて大脳実質内動脈 (径 5-10 μm) を観察した。顕微鏡に装着したビデオカメラで動脈の画像を撮影し、メディアコンバータを介してコンピュータに取り込んだ後、動脈径の変化をコンピュータ画面上で血管径測定用のソフトウェアを用いて解析した。

① 蛍光蛋白質 GFP を星状細胞内繊維維蛋白プロモーター下に発現させたトランスジェニックマウスを用い、大脳皮質を含むスライス標本を作製した。カルシウムイオン蛍光プローブ (rhod-2/AM) を星状細胞に取り込ませた後、人工脳脊髄液を灌流させた観察チャンパー内にスライス標本を静置し、顕微鏡下にアストロサイトと隣接する脳細動脈を同定する。続いて、グルタミン酸受容体作用薬 1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (t-ACPD) を適用し、この時の星状細胞内カルシウムイオン濃度振動性変化を共焦点顕微鏡にて検出した。同時に、標的細動脈の血管径変化を経時的に観察し、スペクトル解析から得られたカルシウムシグナル特性との連関をみた。

② 上記と同様にして作製した脳スライス標本を用い、カルシウムイオン蛍光プローブ (rhod-2/AM) を星状細胞に取り込ませた後、顕微鏡下にアストロサイトと隣接する脳細動脈を同定した。続いて、灌流液を 100% 窒素を吹送し、スライス標本を低酸素状態にした。この時の星状細胞内カルシウムイオン濃度振動性変化を共焦点顕微鏡にて検出した。同時に、標的細動脈の血管径変化を経時的に

観察し、スペクトル解析から得られたカルシウムシグナル特性との関連をみた。

③次に、アストロサイト内カルシウムシグナルを介して惹起された血管作動性物質を同定するため、Ca²⁺依存性 K⁺チャネル阻害薬 iberiotoxin、内向き整流性 K⁺チャネル阻害薬 Ba²⁺、一酸化窒素合成酵素阻害薬 N⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)、ホスホリパーゼ A2 阻害薬 methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP)、シクロオキシゲナーゼ 1 選択的阻害薬 SC-560、P450 阻害薬 miconazole など、各種阻害薬を前適用したときの血管径変化を観察した。それぞれについて、グルタミン酸受容体作用薬 t-ACPD および低酸素条件下で実験を行い、比較検討した。

(2) 薬理学的手法により得られた知見をもとに、さらに確実な因果関係を証明するためにノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを用いた遺伝子工学的実験を行った。これらマウスについては、申請者施設で作製する場合、かなりの時間と費用が必要になるため、すでに作製されたものを購入した。一酸化窒素合成酵素(神経型、内皮型)ノックアウトマウスおよび各種カリウムチャネルトランスジェニックマウスを用い、21年度の実験1および2と同様の実験を行った。すなわち、グルタミン酸受容体作用薬 t-ACPD を適用し、この時のアストロサイト内カルシウムイオン濃度振動性変化を共焦点顕微鏡にて検出した。また、スライス標本を低酸素状態に置いた時の星状細胞内カルシウムイオン濃度振動性変化を検出し、すでに得られた結果と比較検討した。

(3) 次に、L型電位依存性 Ca²⁺チャネル阻害薬 nifedipine、ホスホリパーゼ C 阻害薬 U-73122、イノシトール三リン酸阻害薬 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB)、リアノジン受容体阻害薬 ryanodine (20 μM)、小胞体膜 Ca²⁺-ATPase 阻害薬 thapsigargin を用い、振動性変化に動員されるカルシウムイオンの供給源について検索した。上記薬剤を前適用し、この時のアストロサイト内カルシウムシグナルを観察した。これにより、グルタミン酸受容体作用薬および低酸素により惹起されたカルシウム振動性変化は、細胞外カルシウムに由来して発生しているのか、あるいは小胞体貯蔵カルシウムに起源し、シグナルが維持されているのかについて、詳細を検討を加えた。

(4) 上記の一連の実験について、揮発性麻酔薬イソフルラン、セボフルラン (0.5-2.0 MAC) を通気ガスに付加、あるいは静脈麻酔

薬プロポフォール (0.1-10 mM)、ケタミン (0.1-10 mM) あるいは局所麻酔薬リドカイン (1-50 mM) を投与した場合の血管の反応を観察した。同時に、アストロサイトのカルシウム濃度の変動についても、比較検討し、各種麻酔薬がカルシウム伝達に影響するかどうかを観察した。また、これら麻酔薬による脳血管反応性の変化が、L型電位依存性 Ca²⁺チャネル阻害薬 nifedipine、ホスホリパーゼ C 阻害薬 U-73122、イノシトール三リン酸阻害薬 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB)、リアノジン受容体阻害薬 ryanodine (20 μM)、小胞体膜 Ca²⁺-ATPase 阻害薬 thapsigargin 一酸化窒素合成酵素阻害薬、各種カリウムチャネル拮抗薬、可溶性グアニレートシクレース阻害薬、および NMDA 受容体拮抗薬処置で抑制されるか否かについても検討した。

4. 研究成果

(1) ハロタンで麻酔した上記マウスを開胸し、脳を摘出した。ビブラトームを用いて大脳新皮質を含むスライス標本(厚さ約 125 mm)を作成することができた。この際、脳標本は酸素 95% + 炭酸ガス 5% で通気した 4°C 冷却クレブス液内を作成した。ついで、この脳スライス標本を酸素 93% + 炭酸ガス 7% (われわれのシステムではこの条件下で pH=7.4 となる) で通気し、37°C に加温したクレブス液で満たした観察用チャンバーに入れ、光学顕微鏡 (IX71-23DIC、オリンパス) を用いて大脳実質内動脈(径 5-10 mm)を観察することが可能であった。顕微鏡に装着したビデオカメラで動脈の画像を撮影し、メディアコンバータを介してコンピュータに取り込んだ後、動脈径の変化をコンピュータ画面上で血管径測定用のソフトウェアを用いて解析できることを確認した。

(2) 蛍光蛋白質 GFP を星状細胞内繊維蛋白プロモーター下に発現させたトランスジェニックマウスを用い、大脳皮質を含むスライス標本作製した。カルシウムイオン蛍光プローブ (rhod-2/AM) を星状細胞に取り込ませた後、人工脳脊髄液を灌流させた観察チャンバー内にスライス標本を静置し、標的細動脈の血管径変化を経時的に観察した。また、スペクトル解析から得られたカルシウムシグナル特性との関連を見た。現在、グルタミン酸受容体刺激および低酸素ストレス時に見られる脳実質内細動脈の収縮・弛緩反応は、アストロサイトを起点とするカルシウムシグナル伝達の違いを反映したものであるかどうか検討を続けているところである。本研究の結果、アストロサイトのカルシウムシグナル伝達を介する脳血管調節機構を、刺激の受容から血管平滑筋への情報の伝達に至るまで包括的に理解することができると予想

された。

(3) 細胞内カルシウムシグナル伝達に関係する作用薬や拮抗薬などの各種薬剤を用い、振動性変化に動員されるカルシウムイオンの供給源について検索した。上記薬剤を前適用し、このときのアストロサイト内カルシウムシグナルを観察することができた。これにより、グルタミン酸受容体作用薬および低酸素により惹起されたカルシウム振動性変化は、細胞外カルシウムに由来して発生していることが分かったが、小胞体貯蔵カルシウムに起源しシグナルが維持されているのかについては詳細に検討を加えたものの、結論を導くには至っていない。

(4) 揮発性麻酔薬イソフルラン、セボフルラン (0.5-2.0 MAC) を通気ガスに付加、あるいは静脈麻酔薬プロポフォール (0.1-10 mM)、ケタミン (0.1-10 mM) あるいは局所麻酔薬リドカイン (1-50 mM) を投与した場合の血管の反応を観察した。同時に、アストロサイトのカルシウム濃度の変動についても、比較検討し、各種麻酔薬がカルシウム伝達に影響するかどうかを観察した。また、これら麻酔薬による脳血管反応性の変化が、L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 nifedipine、ホスホリパーゼ C 阻害薬 U-73122、イノシトール三リン酸阻害薬 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB)、リアノジン受容体阻害薬 ryanodine (20 μ M)、小胞体膜 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬 thapsigargin 一酸化窒素合成酵素阻害薬、各種カリウムチャンネル拮抗薬、可溶性グアニレートシクレーズ阻害薬、および NMDA 受容体拮抗薬処置で抑制されるか否かについても検討した。現時点では、これらから得られた結果を解析し、麻酔薬が脳微小循環に及ぼす影響について、まとめる作業を継続中である。

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 1 件)

1. Hama-Tomioka, Kinoshita H, Nakahata K, Kondo T, Azma T, Kawahito S, Hatakeyama N, Matsuda N. (2011) Roles of neuronal nitric oxide synthase, oxidative stress and propofol in N-methyl-D-aspartate-induced dilation of cerebral arterioles. (査読有り) *Br J Anaesth.* 108(1):21-9

[学会発表] (計 1 件)

1. 中畑克俊、富岡恵子、木下浩之、松田直之、畠山昇、畑埜義雄 NMDA 受容体を介する

脳微小血管拡張反応における活性酸素とプロポフォールの役割 日本麻酔科学会第 58 回学術集会 2011 年 5 月 20 日 (神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：00405416