

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592130

研究課題名(和文)脳血管攣縮のメカニズム ABCA1を介するコレステロール代謝による制御

研究課題名(英文)The Mechanism of the Cerebral Vasospasm: Mechanistic role for ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol metabolism

研究代表者

小泉 博靖 (KOIZUMI, Hiroyasu)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：40423389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットのくも膜下出血(SAH)モデルを作成し、Cranial window法を用いて脳底動脈径(SAH model, Day5)を測定することで脳血管攣縮の程度を解析したところ、高脂血症が脳血管攣縮を増悪させることが判明した。ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)を介するコレステロール代謝と脳血管攣縮についての解析は、ヒト血管平滑筋培養細胞を用いたoxyhemoglobin刺激によるSAH modelの作成には成功したが、SAHによるABCA1の蛋白発現の変化を証明する段階には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Rho-kinase(ROK)-mediated vascular smooth muscle(VSM) contraction plays a pivotal role in cerebral vasospasm(CV). We previously showed that hypercholesterolemia increased sphingosylphosphorylcholine-ROK-mediated VSM contraction. In this study, we show the effect of cholesterol on CV induced by double-hemorrhage rat subarachnoid hemorrhage(SAH) model. SAH-induced basilar artery contraction was markedly reversed by intracisternal infusion with Y27632, a ROK inhibitor. Although, hypercholesterolemia increased VSM cholesterol and SAH-induced CV, depletion of VSM cholesterol by -CD inhibited SAH-induced CV. These results indicate that cholesterol potentiates SAH-induced CV, but we could not demonstrate the mechanistic role of ATP-binding cassette transporter A1 on CV.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：cholesterol cerebral vasospasm subarachnoid hemorrhage ABCA1

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血後に発症する脳血管攣縮は患者の予後を決定する重要因子である。この疾患の本体は脳へ分布する血管の病的な収縮(攣縮)で、低分子量 G タンパク質 RhoA の標的タンパク質 Rho-kinase を介する Ca²⁺感受性機構が重要な役割を果たしている (Circ Res., 87: 195-200, 2000)。現在、我が国では Rho-kinase 阻害剤が脳血管攣縮の予防および治療薬として用いられているが、脳血管攣縮の克服には至っていない。脳血管攣縮の治療を妨げる原因として、一定期間(スパズム期:くも膜下出血発症後 3 日目~14 日目)に局限して出現する攣縮血管の Ca²⁺感受性機構の増強が引き起こす血管攣縮の重症化が報告されている (J Cereb Blood Flow Metab., 30: 1637-1650, 2010)、その詳細な機序は不明である。

申請者らはこれまで、(1) スフィンゴ脂質の一つである sphingosylphosphorylcholine (SPC) が Rho-kinase の上流因子として脳血管攣縮を引き起こす事、(2) 主要な細胞膜脂質成分であるコレステロールが SPC-Rho-kinase 系が関与する血管平滑筋の Ca²⁺感受性機構を制御する事、を発見した (Circ Res., 91: 112-119, 2002, Circ Res., 99(3): 299-306, 2006, Circulation, 120: S1157-1158, 2009, Stroke, 42(3): e134, 2011)。コレステロール代謝で重要な HDL による細胞コレステロールの搬出反応は、(1) 非特異的なコレステロールの流出と、(2) apoA- などによる ABCA1 を介する HDL 新生反応に分けられる。細胞増殖期などの細胞膜合成にコレステロールが必要な環境では ABCA1 を介する HDL 新生反応が抑制され、そのコレステロール除去機能が低下する可能性が示唆されている (J Clin Invest., 96: 78-87, 1995)。一方、くも膜下出血後の脳血管平滑筋細胞でも出血による血管損傷や炎症反応の結果、細胞増殖刺激が惹起され、血管平滑筋細胞膜へのコレステロール供給反応が促進している可能性が考えられる。くも膜下出血という病的な環境下で血管平滑筋細胞における ABCA1 を介するコレステロール除去機能が一時的に低下すれば、血管平滑筋細胞内のコレステロール含有量が一定期間増加し、Rho-kinase を介する Ca²⁺感受性機構が増強することが予想される。このようなスパズム期に限定的に認められる脳血管攣縮のメカニズムが、「ABCA1 を介するコレステロール除去機能の抑制によって引き起こされる Ca²⁺感受性機構の増強」であることを証明できれば、脳血管攣縮発症の予測や予防的治療への多大な貢献につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画は上記知見に基づき、(1)ラットくも膜下出血モデルを作成し、コレステロー

ルによって制御される血管平滑筋の Ca²⁺感受性機構がくも膜下出血後の脳血管攣縮のメカニズムとして再現されること、(2)くも膜下出血後の脳血管平滑筋細胞内の ABCA1 発現量を解析することにより、ABCA1 を介する HDL 新生反応が引き起こすコレステロール代謝と脳血管攣縮における Ca²⁺感受性機構増強のメカニズムとの相互関係を明らかにすることを検討した。

3. 研究の方法

<くも膜下出血後の脳攣縮血管におけるコレステロールの制御機構と ABCA1 の関与>

(1) SD ラット(5 週)を通常の餌(F1 飼料)で飼育したコントロール群、高コレステロール食(F1 飼料に 1%コレステロールと 1%コール酸を添加)で飼育した高コレステロール群、 β -CD を 5%添加した高コレステロール食で飼育したコレステロール除去群に分ける。各餌は 10 週間投与する。

(2) 各群のラットを用い、Day0 と Day2 に全身麻酔・人工呼吸管理下にラットの大槽に自家血を注入するくも膜下出血群(double hemorrhage model)を作成する。正常群では、Day0 と Day2 に自家血のかわりに人工髄液を注入する。

(3) 上記(2)の方法で作成したくも膜下出血群と正常群を用い、Day5 に全身麻酔・人工呼吸管理下に脳底部に骨窓を設け、Cranial window を設置する。Cranial window 内に人工髄液を灌流させ、脳底動脈径をデジタルカメラで経時的に測定し脳血管攣縮の程度を評価する。

(4) 上記(3)の後、各群のラット脳底動脈を採取する。採取した検体(n=10)は冷凍保存(-80)する。

(5) 上記(4)で採取した検体に対して ABCA1 の一次抗体を用いた western blotting にて ABCA1 の発現を確認する。 β -actin レベルを基準とする。

(6) 上記(4)で採取した検体から全 RNA を抽出し、逆転写試薬を用いて cDNA を合成する。TaqMan プロローベを用いてラット ABCA1 について PCR 定量解析を行う。GAPDH レベルを基準としてデータを算出する。

上記(1)~(3)にて、コレステロールによって制御される血管平滑筋の Ca²⁺感受性機構がくも膜下出血後の脳血管攣縮のメカニズムとして再現されことを確認する。

上記(4)~(6)から、コレステロールによって制御される脳血管攣縮において、血管平滑筋細胞の ABCA1 の蛋白発現レベルや mRNA レベルの関係を定量的に評価する。脳血管攣縮の増強に応じた ABCA1 発現量の低下が確

認められれば、血管攣縮 (Ca²⁺感受性機構) を増強するメカニズムに血管平滑筋における ABCA1 の発現抑制が関与している可能性が強く示唆される。

4. 研究成果

<くも膜下出血後の脳攣縮血管におけるコレステロールの制御機構と ABCA1 の関与>

表 1 にコントロール群における SAH の経時的 (Day 0, Day 2, Day 5) な生理学的検査結果を示す。SAHmodel では、経時的に平均動脈圧の上昇が認められ、Day 5 では統計学的に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。脳底動脈径に影響を及ぼす血液ガスの結果は SAH の経時的変化で不変であり、今回使用した SAH model が脳血管攣縮の評価に適したモデルであることが示された。

コントロール群の SAH を発症していない脳底動脈径は 358.9 ± 32.0 (μm)であったが、SAH model (Day 5) では 302.2 ± 38.4 (μm)であり、15.8%の脳血管攣縮が認められた ($p < 0.01$)。コントロール群の SAH model (Day 5) に対して Rho-kinase 阻害剤の Y27632 (10 μM) を投与すると、脳底動脈径の平均は 376.4 ± 19.5 (μm)となり攣縮血管の弛緩が認められた ($p < 0.05$)。高脂血症群の SAH model (Day 5) では脳底動脈径は 248.1 ± 34.6 (μm)であり、コントロール群の SAH model (Day 5) と比較して著名な脳血管攣縮が認められた ($p < 0.05$)。一方、コレステロール除去群の SAH model (Day 5) では脳底動脈径の平均は 305.4 ± 25.3 (μm)となりコレステロールの負荷が引き起こす血管攣縮の増悪は抑制された。Cranial window を用いたラット脳底動脈径の計測は、各々の刺激に対する血管の反応が安定してから行った。血管径の各値は 10 秒間隔で 13 回連続計測した結果の平均値とし、各血管径は 30 分間以上安定していた。

我々はすでに Rho-kinase が引き起こす血管平滑筋の Ca²⁺感受性機構が血管平滑筋内に含まれるコレステロールによって制御されることを報告しているが、本研究結果から、このメカニズムが SAH 後の脳血管攣縮の病態にも関与していることが示唆された。

ラットの SAH model の脳底動脈を採取し、western blotting と PCR 定量解析によって ABCA1 の蛋白発現量と mRNA レベルの測定を試みたところ蛋白抽出量が不足することが判明し計画を変更した。ヒト血管平滑筋培養細胞を用いて oxyhemoglobin 刺激による SAH model を作成し、SAH による ABCA1 の蛋白発現や mRNA レベルの変化を解析しているが脳血管攣縮の増強に応じた ABCA1 発現量の低下を確認する段階には至っていない。

表 1

	SAH (Day 0)	SAH (DAY 2)	SAH (Day 5)
MABP (mmHg)	95.5 ± 11.3	106.1 ± 12.1	122.4 ± 19.0 #
pH	7.42 ± 0.04	7.48 ± 0.04	7.44 ± 0.05
PaCO ₂ (mmHg)	40.7 ± 2.5	38.0 ± 2.6	38.3 ± 4.3
PaO ₂ (mmHg)	155 ± 49	182 ± 59	182 ± 83
BT ()	37.2 ± 0.2	37.2 ± 0.2	37.2 ± 0.1

mean ± sd, # p < 0.05 (vs. Day0)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

小泉博靖, 重症くも膜下出血急性期の血圧変動に対する血管自動調節能の評価, 第 25 回日本脳循環代謝学会総会, 2013 年 11 月 01 日 ~ 2013 年 11 月 02 日, 京王プラザホテル札幌 (北海道・札幌市)

小泉博靖, 重症くも膜下出血急性期の頭蓋内圧変動と血圧変動から算出する血管自動調節能の評価, 第 72 回日本脳神経外科学会学術総会, 2013 年 10 月 16 日 ~ 2013 年 10 月 18 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕
特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

小泉 博靖 (KOIZUMI, Hiroyasu)
山口大学・医学部・特別医学研究員
研究者番号：4 0 4 2 3 3 8 9

(2)研究分担者

白尾 敏之 (SHIRAO, Satoshi)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：7 0 4 4 8 2 8 1