

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462210

研究課題名(和文) くも膜下出血後の脳細動脈の機能障害と攣縮に対するマグネシウムの拡張作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of magnesium-induced vasodilation and dysfunction in cerebral penetrating arterioles after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

村田 貴弘 (Murata, Takahiro)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：80533322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究はマグネシウム(Mg)の脳細動脈における拡張作用機序を解明することを目的とした。

雄ラットの脳細動脈を摘出しカニューレーションし血管内径を観察した。脳細動脈においてMgは濃度依存性に血管平滑筋依存で血管拡張を起こした。その拡張作用は血管平滑筋カルシウム感受性カリウムチャンネルが重要な役割を担っていることが示唆された。またMgは血管内皮障害血管やくも膜下出血(SAH)後の脳血管攣縮の血管収縮因子を投与した収縮血管でも拡張させた。この結果はSAH後の遅発性脳虚血や脳血管攣縮の治療におけるMgの臨床使用において基礎的な背景を補うと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated in cerebral penetrating arterioles the signaling mechanisms and dose-dependency of extracellular magnesium-induced vasodilation and also its vasodilatory effects in vessels precontracted with agonists associated with delayed cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage (SAH).

Male rat penetrating arterioles were cannulated. Their internal diameters were monitored. Magnesium induced a concentration- and smooth muscle cell-dependent dilation in cerebral penetrating arterioles. Calcium-sensitive potassium channels of smooth muscle cells may play a key role in magnesium-induced vasodilation. Magnesium also dilated endothelium-impaired vessels as well as vessels precontracted with spasmogenic agonists. These results provide a fundamental background for the clinical use of magnesium, especially in treatment against delayed cerebral ischemia or vasospasm following SAH.

研究分野：脳神経外科

キーワード：マグネシウム 脳細動脈 くも膜下出血 脳血管攣縮

1 . 研究開始当初の背景

遅発性脳血管攣縮は、くも膜下出血(SAH)発症後4日目頃から14日目頃にかけて遅発性に生じる脳動脈の可逆的狭窄で、重篤な神経障害や死をもたらす場合があり、急性期を脱したSAH患者の機能予後および生命予後を決定する重要な合併症である(1)。脳血管攣縮は、SAH発症後一定の時期を経て遅発性に生じるため、予防的治療、早期診断、発症後の迅速な治療などの対応が可能な病態であり、現在いくつかの薬剤や治療法が臨床で用いられ一定の効果が得られているが、未だ攣縮発症の完全予防には至っておらず、新たな予防・治療法の開発が重要である。

近年硫酸マグネシウムの脳槽内投与による脳血管攣縮の治療が注目されている。Moriらは、マグネシウムの電位依存性カルシウムチャンネルに対する非競合的拮抗作用による直接的な血管拡張作用を利用して、SAH後脳血管攣縮の実験動物モデルにおいて、硫酸マグネシウム溶液を脳槽内に投与し、その有効性を報告している(2)。しかしマグネシウムの頭蓋内血管における拡張作用は電位依存性カルシウムチャンネルに対する非競合的拮抗作用のみなのかどうか、つまり血管内皮は関与しているのか、その他のイオンチャンネルは関与しているのか、など不明な点が多数ある。

SAH後の脳血管攣縮は脳内主幹動脈(内頸動脈や中大脳動脈など)における持続的な収縮による血流低下が主病態と考えられ、多くの研究が行われてきた。しかし症候性脳血管攣縮患者の血管撮影では、このような主幹動脈に狭窄を認めないことがしばしば経験され、この理由として脳内微小血管(脳細動脈)狭窄による血流障害が原因として考えられている。最近の報告では微小血栓が原因ではないかとの報告も散見される。そのため、脳細動脈の血管調節機能の解明は、脳血管攣縮の病態解明、治療法開発において非常に重要である。一方で近年の研究で、SAH直後には既に広

範な神経細胞障害が起こり、脳循環を調節する脳細動脈に機能障害が起こっていることが明らかにされつつある(3)。これはearly brain injuryと言われ、SAHにおける神経損傷に大きく関与し、脳血管攣縮にも関係していると考えられている。

2 . 研究の目的

我々は以前より脳細動脈に注目し、その血流制御機構について報告しており、最近では、前述のマグネシウムに注目し、細胞外マグネシウム濃度減少が有意に脳細動脈収縮を、逆に増加が有意に拡張を引き起こすことを報告した(4)。我々はSAH後のearly brain injuryと脳血管攣縮に対する新たな予防・治療法の開発のため、マグネシウムの頭蓋内血管、特に脳細動脈における拡張作用機序を解明すること、SAH後の脳血管攣縮における血管収縮因子を与えた脳細動脈におけるマグネシウムの血管拡張作用を解明すること、early brain injuryにおける脳細動脈の機能障害を明らかにすること、をこの研究の目的とした。

3 . 研究の方法

Dacey と Durling が開発した方法を用いた(5)。簡潔にはSDラット(雄、12-20週齢)より摘出した脳から中大脳動脈を含む5mm x 8mm x 5mmの脳スライスを顕微鏡下で作成した。軟膜とくも膜を利用して脳内を穿通している脳細動脈を摘出し、細動脈の片端を臓器槽に装着された微小ガラスピペットを用いてカニキュレーションを行った。カニキュレーションされた細動脈の両端を固定して、顕微鏡下に観察し、細動脈に生理的内圧を負荷した。臓器槽はCSFのpHである7.3、温度は37℃に保たれた生理学的溶液を持続的に灌流した。細動脈の内径を顕微鏡に接続したCCDカメラを通じて画像として取り込み、血管内径測定装置を用いて測定し記録した。マグネシウム濃度増加による血管拡張機序の解明のため、まずマグネシウム濃度変化に

よる血管拡張を観察した。次に血管内皮障害を起こした血管でのマグネシウムの血管拡張作用への影響の調査や、血管内皮障害因子や種々のカリウムチャンネル阻害薬を投与しマグネシウムの血管拡張作用を調査した。また SAH 後の脳血管攣縮における血管収縮因子を投与し、マグネシウムの血管拡張作用を確認した。

阻害薬（濃度）は、血管内皮一酸化窒素（NO）合成酵素阻害剤 L-NNA（10 μ M）、カリウムチャンネル阻害薬として非特異的カルシウム感受性カリウムチャンネル阻害薬 tetraethylammonium（TEA）（1mM）、電位依存カリウムチャンネル阻害薬 4-aminopyridine（100 μ M）、ATP 感受性カリウムチャンネル阻害薬 glibenclamide（3 μ M）、内向き整流カリウムチャンネル阻害薬 BaCl₂（30 μ mol/L）で、脳血管攣縮に關与する血管収縮物質としてエンドセリン（ET-1）（10 pM）、プロスタグランジン F₂（P F₂）（100nM）やトロンボキサン A₂の（TX A₂）（10nM）を投与した。

次に、くも膜下出血後の early brain injury における脳細動脈の血管調節機能障害を明らかにすべく研究を行った。ラットを全身麻酔後に大槽に自己血 0.3ml を注入し early brain injury モデルを作成した。また同様の手技で生理食塩水注入（0.3ml）モデルと手技のみの sham surgery モデルを作成した。、上述の如く、それぞれのモデルより脳細動脈を摘出しカニューレーションを行い、同様に血管内径を測定した。

4. 研究成果

脳細動脈の細胞外マグネシウム濃度（基準濃度 1.4 mM）を 2.1, 2.8, 3.5, 4.2 mM に増加したところ、濃度依存的な血管拡張（相対的拡張率はそれぞれ 103.9, 107.2, 110.2, 115.4%）を認めた（図 1）。

脳血管攣縮期における脳細動脈の機能障害の一つとして、血管内皮 NO による血管拡張機能の低下が推測されているため、L-NNA を投

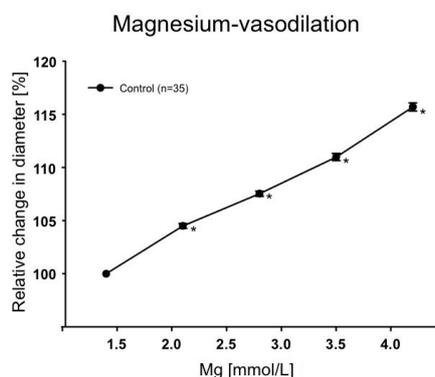


図 1. 細胞外マグネシウム濃度増加による脳細動脈の血管拡張(n=35). * $P < 0.05$ vs control (Mg²⁺: 1.4 mmol/L).

与し、マグネシウム濃度を増加させたが、その血管拡張は抑制されなかった（図 2）。また血管内皮障害を起こした血管でもその拡張作用は抑制されなかった（図 3）。

幾つかの全身血管（大動脈など）ではマグネシウムの血管拡張機序に血管内皮 NO やプロスタサイクリンなどの血管内皮由来の血管拡張因子が關与していると報告されている(6,7)が、脳細動脈においては NO 含め血管内皮は關与していないと考えられた。くも膜下出血後の脳血管攣縮機序においては、NO 合成は抑制された状態と考えられている。すなわち NO 合成が抑制されている脳細動脈もマグネシウムで拡張すると考えられ、脳血管攣縮に対するマグネシウムによる治療の有効性を一部示唆したと思われた。

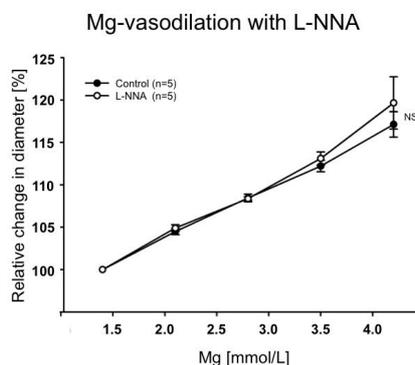


図 2. 血管内皮一酸化窒素合成酵素阻害剤 L-NNA に

よるマグネシウム濃度増加による血管拡張作用への影響, NS: no significant difference.

Mg-vasodilation after endothelial impairment

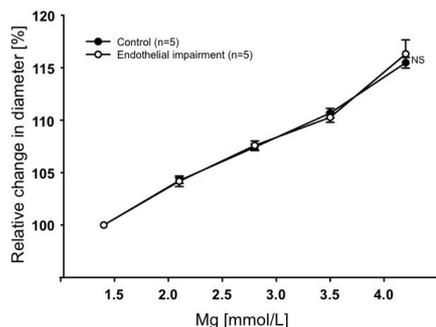


図 3. 血管内皮障害血管におけるマグネシウム濃度増加による血管拡張作用への影響, NS: no significant difference.

Mg-vasodilation with TEA

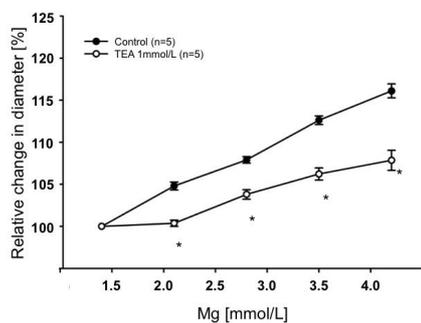


図 4. 非特異的カルシウム感受性カリウムチャンネル阻害薬 tetraethylammonium (TEA)によるマグネシウムの血管拡張作用への影響, * $P < 0.05$ vs control.

脳細動脈ではマグネシウムの血管拡張作用機序に血管内皮は関与していないと考えられたため, 血管平滑筋カリウムチャンネルが関与しているかを調査した. 非特異的カルシウム感受性カリウムチャンネル阻害薬 TEA でカルシウム感受性カリウムチャンネルを阻害したところ, マグネシウムの拡張作用が部分的に抑制された(図 4). その他のカリウムチャンネル(内向き整流, ATP 感受性, 電位依存性の 3 種)阻害薬では抑制されなかった(図 5).

Mg-vasodilation

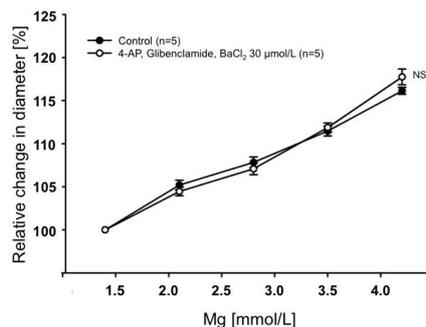


図 5.

電位依存カリウムチャンネル阻害薬

4-aminopyridine, ATP 感受性カリウムチャンネル阻害薬 glibenclamide, 内向き整流カリウムチャンネル阻害薬 BaCl₂ (30 μmol/L)によるマグネシウム濃度増加による血管拡張作用への影響, NS: no significant difference.

文献的にもマグネシウムはカリウムチャンネルを活性化させ, 細胞膜の過分極を引き起こし, 血管平滑筋を弛緩させる報告があり(8), 脳細動脈においてもマグネシウムの血管拡張作用には血管平滑筋カルシウム感受性カリウムチャンネルが関与し, 重要な役割を担っていることが明らかとなった. しかしカルシウム感受性カリウムチャンネルには, 現在 small conductance, intermediate conductance, 及び large conductance のサブタイプが存在しており, どのサブタイプが関与しているかは, 今後の研究が必要である. SAH 後脳血管攣縮における攣縮誘発因子(血管収縮物質)であるエンドセリン, トロンボキサン A2, プロスタグランジン F2 で脳細動脈を軽度収縮させ, その存在下でマグネシウムの血管拡張作用が抑制されるのかどうかを調査した. 結果, エンドセリンのみで軽度抑制されたものの, SAH 後脳血管攣縮における攣縮誘発因子(血管収縮物質)存在下でも, マグネシウムの拡張作用は認められ, 脳血管攣縮に対するマグネシウムによる治療の有効性を一部示唆したと思われた.

SAH 後の early brain injury モデルの脳細動

脈を作成し，血管調節機能障害を調査したところ，early brain injury モデルの脳細動脈は生理食塩水注入モデルと sham surgery モデルと比較して血管緊張（収縮）が強いことが明らかとなった．くも膜下出血後の early brain injury によって脳細動脈の機能障害が起きていることが，我々の実験モデルでも明らかとなった．

以上から，脳細動脈においてマグネシウムは濃度依存性に血管平滑筋依存で血管拡張を起こす．その血管拡張作用において血管平滑筋のカルシウム感受性カリウムチャンネルが重要な役割を持っていることが示唆された．またマグネシウムは血管内皮障害血管や SAH 後の脳血管攣縮の血管収縮因子を投与した収縮血管でも拡張させた．これらの結果は，特に SAH 後の遅発性脳虚血や脳血管攣縮の治療におけるマグネシウムの臨床使用において基礎的な背景を補うと考えられた．

引用文献

1. van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid hemorrhage. *Lancet*. 2007;369(9558):306-18.
2. Mori K, Miyazaki M, Hara Y, Aiko Y, Yamamoto T, Nakao Y. Novel vasodilatory effect of intracisternal injection of magnesium sulfate solution on spastic cerebral arteries in the canine two-hemorrhage model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2009 Jan;110(1):73-8.
3. Sehaba FA, et al, Journal of Neurosurgery 106;321-329,2007
4. Murata T, Horiuchi T, Goto T, Li Y, Hongo K. Vasomotor response induced by change of extracellular potassium and magnesium in cerebral penetrating arterioles. *Neurosci Res*. 2011 May;70(1):30-4.
5. Dacey RG Jr, Duling BR. A study of rat

intracerebral arterioles: methods, morphology, and reactivity. *Am J Physiol*. 1982 Oct;243(4):H598-606.

6. Yang ZW, Gebrewold A, Nowakowski M, Altura BT, Altura BM. Mg(2+)-induced endothelium-dependent relaxation of blood vessels and blood pressure lowering: role of NO. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Mar;278(3):R628-39.

7. Watson KV, Moldow CF, Ogburn PL, Jacob HS. Magnesium sulfate: rationale for its use in preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Feb;83(4):1075-8.

8. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. 2008 Apr;44(2):65-81.

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)

Murata T, Dietrich HH, Horiuchi T, Hongo K, Dacey RG Jr. Mechanisms of magnesium-induced vasodilation in cerebral penetrating arterioles. *Neurosci Res*. 2016;107:57-62. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

Takahiro Murata, Hans H. Dietrich, Tetsuyoshi Horiuchi, Kazuhiro Hongo, Ralph G. Dacey, Jr. Mechanisms of magnesium-induced vasodilation in cerebral penetrating arterioles. 2016/3/31, Experimental Biology 2015, Boston

Takahiro Murata, Tetsuyoshi Horiuchi, Kazuhiro Hongo. ATP-dependent potassium channels are inactivated in early vascular injury after subarachnoid hemorrhage on rat cerebral penetrating arterioles.

2014/11/11, Neuroscience 2014, Washington D.C.

村田貴弘, Hans H. Dietrich, 堀内哲吉, 本郷一博, Ralph G. Dacey, Jr., 脳細動脈におけるマグネシウム濃度増加による血管拡張作用機序, 2014/10/10, 第73回日本脳神経外科学会学術総会, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 貴弘 (MURATA, Takahiro)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 80533322

(2) 研究分担者

堀内 哲吉 (HORIUCHI, Tetsuyoshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号: 40303466

(3) 研究協力者

Hans H. Dietrich