

# Direct evidence for a key role of protein kinase C in the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage.

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西澤, 茂 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1431">http://hdl.handle.net/10271/1431</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 154号	学位授与年月日	平成 5年 9月 3日
氏名	西澤 茂		
論文題目	Direct evidence for a key role of protein kinase C in the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage (クモ膜下出血後の脳血管攣縮発生における protein kinase C の役割についての研究)		

医学博士 西澤 茂  
論文題目

Direct evidence for a key role of protein kinase C in the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage

(クモ膜下出血後の脳血管攣縮発生における protein kinase C の役割についての研究)

論文の内容の要旨

クモ膜下出血後には脳血管攣縮が発生し、患者の予後を不良とする原因となる。脳血管攣縮は、クモ膜下出血後二週間近くにもわたって脳の血管が異常に強く収縮し続ける状態であるが、その病態についてはまだよく解明されていない。脳血管平滑筋内に含まれている protein kinase C (PKC) の活性化が脳血管攣縮の病態に関与しているという仮説のもとに、この仮説を検証するための基礎的実験を行った。

《方法》犬(7~10kg)を用い、対照群、クモ膜下出血群の二群に分けた。大槽内自家血二回注入法を用い、クモ膜下出血のモデルを作成し、脳底動脈に脳血管攣縮を生じさせた。ペントバルビタール静注で犬を死亡させた後、すばやく脳底動脈と小脳片を摘出した。これを4℃に冷やしたりリン酸緩衝液の中で血管内、及び血管外の血液を取り除いた。さらに血管内皮も内腔をよく洗浄し除去した。血管、及び小脳片をできるだけ細かく切り、超音波破碎装置を用いて homogenize した。組織サンプルを遠沈したあと、1.0ml の抽出液(50mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10mM EGTA, 0.3%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM benzamide, 50  $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin)を加え、4℃、100,000G で60分間遠沈した。得られた上清を細胞質分画とした。沈澱したサンプルに0.1%の Triton-X を加えた1.0mlの抽出液を再度加え、4℃で一時間 incubate, その後再び4℃、100,000G で60分間遠沈して得られた上清を細胞膜分画とした。

Protein Kinase C enzyme assay system (Amersham) と ( $\gamma$ - $^{32}$ P) ATP を用いて、これらのサンプルの各分画の PKC 活性を測定した。測定値は mean  $\pm$  standard error of the mean (M  $\pm$  SEM) で、単位は p mol/min/ $\mu$ g protein で表した。統計的検討は t-検定を用いて検討し、危険率0.05以下で有意差を判定した。

《結果》(小脳)対照群の細胞質分画は13.42  $\pm$  1.01 (n=15) 細胞膜分画は4.56  $\pm$  0.32 (n=7)、SAH 群の細胞質分画は15.51  $\pm$  1.89 (n=12)、細胞膜分画は4.32  $\pm$  0.46 (n=13) であった。二群間の細胞質分画、細胞膜分画においては有意差はみられなかった。(脳底動脈)対照群の細胞質分画は0.94  $\pm$  0.11 (n=13)、細胞膜分画は0.21  $\pm$  0.05 (n=11) であった。SAH 群の細胞質分画は0.64  $\pm$  0.10 (n=18)、細胞膜分画は0.43  $\pm$  0.04 (n=20) であった。細胞質分画間には統計的有意差はみられなかったが、細胞膜分画間においては危険率0.01以下で統計的有意差が認められた。さらに一つのサンプルにおいて、全 PKC 活性に対する細胞質分画、細胞膜分画の比率を比較してみると、SAH 群では対照群に対して細胞質分画は有意に低く、細胞膜分画は有意に高かった。

《考察》小脳には高い PKC 活性がすでに証明されており、この実験でも対照群、SAH 群ともに同様に高い PKC 活性が得られたことにより、この測定法の妥当性が証明された。脳底動脈の PKC 活性は、対照群に対して SAH 群においては細胞質分画の活性が低く、細胞膜分画の活性が高まっていた。これは SAH 群において、脳血管攣縮が起こるとその血管の PKC が細胞膜分画に translocate し、活性化されることを示している。血管の等尺性張力実験で、犬の脳底動脈は PKC を活性化すると極めて

強い、長時間持続する収縮がみられることが分かっている。これらの実験結果から、SAH後に発生する脳血管攣縮の病態には、血管平滑筋のなかに存在するPKCの活性化が重要な働きを果たしているものと考えられる。

《結論》SAH後の脳血管攣縮の発生には、PKCの活性化が重要な働きを果たしている。

### 論文審査の結果の要旨

クモ膜下出血後に、脳の血管が長期にわたり持続的に強く収縮し続けるという事態がしばしば生じる。血管外に血液が漏れ出たという信号が何らかの形で血管平滑筋のアクチン-ミオシン系に伝えられてこの脳血管攣縮が起こると考えられるが、機構の詳細は不明であった。Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ（ミオシン軽鎖キナーゼ）によるミオシン軽鎖のリン酸化が平滑筋収縮の調節に関与することはよく知られているが、これだけでは長期持続性の脳血管攣縮を説明出来ない。

申請者は、副論文及び参考論文に発表した研究において、単離したイヌ脳底動脈の持続的な収縮がプロテインキナーゼC（PKC）の活性化により起こることを、動脈輪の等長張力を測定する独自のモデル実験系を用いて明らかにした。また、この実験でCa<sup>2+</sup>-カリモジュリンを介する機構は収縮の初期段階にのみ関与することが示唆された。血管平滑筋の持続的収縮に2種類の刺激情報伝達系が関与し、異なる役割を果たしていることを指摘したこの実験の意義は大きい。しかし、二週間近くにわたって強く収縮し続けるクモ膜下出血後の脳血管攣縮に、この*in vitro*の実験系で得られた知見がそのまま当てはまるか否かは検討課題として残されていた。

そこで申請者は、主論文に発表した研究において、イヌの大槽に自家血を注入（クモ膜下出血のモデル）することにより人為的に脳血管攣縮を引起し、攣縮中の脳底動脈で実際にPKCの活性化が起こっているか否かを検討した。細胞膜の成分である酸性グリセロリン脂質および細胞外からの刺激に呼応して形質膜のホスファチジルイノシトールビスリン酸から生産されるジアシルグリセロール（DG）により活性化されるPKCは、活性化に伴いサイトゾルから形質膜へ移行することが知られている。したがって、本研究では、脳底動脈から調製したサイトゾル分画と細胞膜分画のPKC活性を測定し、細胞膜分画のPKCの比活性（蛋白質単位量当たりの活性）の増加をPKC活性化の指標とした。PKC活性は、Ca<sup>2+</sup>、ホスファチジルセリン、およびホルボールミリステート存在下、すなわち最大の活性化が起こる条件で測定された。実験の結果、測定されたPKCの比活性（mU/mg蛋白質）は、対照群脳底動脈サイトゾル分画で0.94±0.11（平均±標準誤差、n=13）、細胞膜分画で0.21±0.05（n=11）、人為的クモ膜下出血群サイトゾル分画で0.64±0.10（n=18）、細胞膜分画で0.43±0.04（n=20）であり、クモ膜下出血群細胞膜分画で対照群に比し明らかに高いPKC活性が測定された。また、“unpaired two-tailed t-test”による統計分析で、対照群とクモ膜下出血群間の細胞膜分画のPKC比活性の差は危険率0.01以下で有意と判定された。以上の結果は、攣縮を起こしている脳血管ではPKCが細胞膜分画に移行して活性化されていることを示唆し、したがってクモ膜下出血後の脳血管攣縮の発生機構にPKCの活性化が関与しているという仮説を更に支持すると解釈された。

この申請者の一連の研究結果は医学的に非常に重要であるので、審査委員会では実験の細部にまで亘る以上のような多くの質問が出され、活発な討論が行われた。

1. Isometric tension studyにおいて、DGだけでは無効で、DGとホスファチジルセリンを両者加えると収縮が起こっている。内因性ホスファチジルセリンが働かない理由
2. 0.1% Triton X-100による遠心沈渣からのPKCの抽出効率、サイトゾルのマーカー酵素の挙動

からみた細胞膜分画へのサイトゾル蛋白質の混入の割合

3. ホモジネートの全蛋白のうち細胞膜分画に回収された量の実験毎のふれの範囲
  4. クモ膜下出血群、対照群において、ホモジネートからそれぞれサイトゾル分画、細胞膜分画へ回収された PKC 活性の割合
  5. 統計分析における母集団の大きさの違いの取り扱い方
  6. PKC 活性の機構と関連して、活性化と細胞膜への移行の因果関係、膜との結合機構
  7. 脳血管攣縮を引き起こす刺激情報の伝達は  $Ca^{2+}$ -カルモジュリンを介する機構と PKC 活性化を介する機構だけで説明できるのか。たとえば、5HT、PGF<sub>2</sub>α、エンドセリン、NO あるいは cGMP 等も何らかの形で関与するという可能性について
  8. 血管外に出た血液が内皮側からではなく外膜側から血管平滑筋に作用して PKC 活性化を介して攣縮を引き起こすとすると、PKC は血液のどの成分により如何なる機構で活性化されると考えられるのか
  9. 活性化された PKC によりリン酸化を受ける脳血管平滑筋の蛋白質は何か。もしそれがミオシン軽鎖であるとすれば、 $Ca^{2+}$ -カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼによるリン酸化との相違点
  10. 活性化された PKC により引き起こされる攣縮が長期持続性であることの理由。たとえば、PKC によりリン酸化を受けたミオシンのリン酸基はプロテインホスファターゼの作用は受け難いのか
- これらの質問に対する申請者の解答は概ね適切であった。以上より、申請者の論文は博士（医学）の学位授与に値するものと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市山	新			
	副査	教授	高田	明和	副査	教授	藤田道也
	副査	助教授	小出	幸夫	副査	助教授	菱田明