

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	弘前大学大学院医学研究科 脳神経科学領域脳血管障害学教育研究分野 氏名 奈良岡 征都
<p>(論文題目)</p> <p>Suppression of the Rho/Rho-Kinase Pathway and Prevention of Cerebral Vasospasm by Combination Treatment with Statin and Fasudil After Subarachnoid Hemorrhage in Rabbit.</p> <p>(ウサギくも膜下出血モデルにおけるスタチンとファスジル併用による Rho/Rho キナーゼ抑制と脳血管攣縮予防効果)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【緒言】</p> <p>くも膜下出血後の脳血管攣縮発生の機序は、未だ完全には確立されていない。様々な経路が脳血管攣縮の機序として考えられているが、主たる機序の一つとして RhoA/Rho-kinase passway があげられる。この RhoA/Rho-kinase passway は、動脈瘤破裂後くも膜下出血 (SAH) において血管平滑筋の持続的収縮を惹起し、脳血管攣縮を発生させていると考えられている。すなわち、くも膜下出血によって脳血管攣縮誘発物質が誘導され、血管平滑筋細胞膜にて G-protein receptor を活性化し、RhoA kinase を活性化する。RhoA は Rho-kinase の上流に位置し、引き続き Rho-kinase を活性化させる。Rho-kinase は血管平滑筋において myosin light chain (MLC) phosphatase を抑制し、MLC のリン酸化を促進、MLC のリン酸化 (active; 平滑筋収縮) を抑制する経路に対する negative feedback にて、結果として血管平滑筋を収縮させると考えられている。</p> <p>ファスジルに関しては、Rho-kinase inhibitor として本邦で開発され、既に臨床供与されており、脳血管攣縮に対して効果的との報告も多い。しかしながら、単剤にて脳血管攣縮を完全に予防・治療できていないのが現状である。</p> <p>一方、スタチンに関しては、HMG-CoA reductase として高脂血症に対して使用されているが、その多面的効果により脳血管攣縮の分野においても様々な機序にて予防・治療効果を発現すると期待されてきた。当初は、eNOS 活性化作用にて NO 増加をもたらす機序に着目し、様々な臨床研究が行われたが、やはり単剤にて完全に脳血管攣縮を予防・治療するとの結論には至らず、eNOS 活性化自体についても未だ controversial とする報告もある。</p> <p>そこで、本研究においては、近年報告された、スタチンの RhoA 抑制効果に着目し、その下流である Rho-kinase を抑制するファスジルとの相加効果について検討した。</p> <p>【目的】</p> <p>本研究の目的は、RhoA の抑制剤としてのスタチン (ピタバスタチン) と Rho-キナーゼの抑制剤としてのファスジルの併用療法によって、脳血管攣縮を予防・治療できるかどうかを明らかにすることである。なお、スタチンに関しては既に、多面的作用の一つとして血管内皮において eNOS を活性化し、血管拡張作用を示す NO の増多につながるとの報告があり、この確認として免疫染色にて eNOS を比較した。</p>	

【方法】

本研究は、ウサギくも膜下出血モデルを用い、これを5群、すなわち

- ① Sham群 (くも膜下出血なし) n=8
- ② くも膜下出血群 (未治療群) n=8
- ③ くも膜下出血 - ピタバスタチン (親油性スタチン)単剤群 n=8
- ④ くも膜下出血 - ファスジル (hydroxyfasudil) 単剤群 n=8
- ⑤ くも膜下出血 - ピタバスタチン・ファスジル併用療法群 n=8

として、脳血管攣縮に対するピタバスタチン・ファスジルの相加・相乗的な予防・治療効果の有無を検討したものである。

ウサギくも膜下出血モデルは、double-hemorrhage rabbit modelにて作成した。ウサギは、12週齢日本白ウサギ (2.5-2.99kg) を用いた。Pentobarbital および ketamineにて麻酔を施した上で、自家血 (大腿動脈血) を採取し、これを大槽穿刺部位 (23G翼状針にて穿刺) から1.5ml注入し、くも膜下モデルを作成した (Day0 & Day2)。治療群においては、ピタバスタチン (製品名リパロ原末) を簡易懸濁して経鼻経管チューブから0.8mg/kg/day投与し (Day0-4)、ファスジル (製品名エリル) は25G翼状針にて耳介静脈から3.0mg/kgを1日2回投与した (Day0-4)。併用療法群では、1個体に対してピタバスタチン・ファスジンを同時に投与した。①-⑤群全て、Day4に安楽死を行なった。

主な検討項目は、血管径 (脳底動脈平均面積・HE染色)、RhoA及びRho-kinase (脳底動脈・ELISA)、eNOS (血管内皮・免疫染色) である。血管径に関しては、①-⑤各群 n=4につき安楽死後にパラホルムアルデヒドにて灌流固定を施行、脳底動脈を脳幹と共に摘出した。摘出した脳底動脈をさらに固定後、直角断面にて切り出し、断面面積を算出して血管径として統計処理した (血管内腔・内皮内を計測、血管攣縮による襞は無視し、その基底層で計算)。また、HE染色の他、eNOS抗体染色を行ない、各群での発現を比較した。RhoA/Rho-kinaseに関しては、各群 n=4で安楽死後に脳底動脈を生体標本として摘出、 -80°C にて保存し、その後ELISAにて定量比較した。

【結果・考察】

血管径 (脳底動脈平均面積) は、未治療のくも膜下出血群に比較して全治療群で拡張したが、有意差をもって拡張したのは併用療法群のみであった ($P < 0.05$)。

RhoAは、ピタバスタチン単剤群のみが、くも膜下出血群に比較して有意に減少した ($P < 0.05$)。一方、Rho-kinaseは、全ての治療群でくも膜下出血群に比較して減少傾向を示したが、併用療法群のみが有意差をもってRho-kinaseを抑制した ($P < 0.05$)。

eNOSの発現に関しては、ピタバスタチン群と併用療法群において、SAH群より明らかに強く発現していた。一方、ファスジル単剤群ではほとんど発現が認められなかった。

併用療法にて脳血管攣縮に対して相加的に予防・治療効果を示す、との仮定は、血管径拡張の結果からは妥当と言える。ただし、RhoAが併用療法群にて有意に抑制されなかった点は、スタチンの効果がやはりeNOSを含めた多面的効果よるためと考えられた。また、ファスジル群のRhoAが、有意ではないにせよ抑制効果が得られたことについては、Rho-kinase抑制そのものによってRhoA発現に負のフィードバックが掛かるためとする報告もあるが、現段階では仮説に留まっており今後の研究が待たれる。

【結語】

ファスジル・スタチンは、それぞれ単剤でも脳血管攣縮に対してある程度の予防・治療効果が見られるが、併用療法による相加的作用にて、より強力に脳血管攣縮を予防しうることが示唆された。