

ラットくも膜下出血モデルにおける脳血管攣縮のメカニ  
ズム  
- コレステロールによる制御機構 -

吉野 弘子

山口大学大学院医学系研究科  
脳神経外科学分野（脳神経外科学）

2014年 2月

## 抄 録

背 景 : こ れ ま で 、  
s p h i n g o s y l p h o s p h o r y l c h o l i n e - R h o - k i n a s e  
系 が 引 き 起 こ す 血 管 攣 縮 が コ レ ス テ ロ ー ル に  
よ っ て 制 御 さ れ る こ と が 報 告 さ れ て い る 。 コ  
レ ス テ ロ ー ル は 細 胞 膜 上 に 存 在 す る ラ フ ト や  
カ ベ オ ラ と 呼 ば れ る 膜 ド メ イ ン 構 造 に 存 在 し 、  
細 胞 内 情 報 伝 達 に 関 与 し て い る 。 本 研 究 で は 、  
く も 膜 下 出 血 モ デ ル ( S A H m o d e l ) が 引 き 起  
こ す 脳 血 管 攣 縮 に お け る コ レ ス テ ロ ー ル お よ  
び ラ フ ト ・ カ ベ オ ラ の 関 与 を 検 討 し た 。  
方 法 : S D ラ ッ ト を 正 常 群 ( 餌 : F 1 飼 料 )、 高  
コ レ ス テ ロ ー ル 食 群 ( 餌 : F 1 飼 料 + 1 % コ レ ス  
テ ロ ー ル + 1 % コ ー ル 酸 )、  $\beta$ - サ イ ク ロ デ キ ス ト  
リ ン ( C D ) 群 ( 高 コ レ ス テ ロ ー ル 食 に  
5 %  $\beta$ - C D ( コ レ ス テ ロ ー ル 除 去 剤 ) を 添 加 ) に  
分 け た 。 各 群 で S A H m o d e l を 作 成 し 、 c r a n i a l  
w i n d o w 法 を 用 い て 脳 底 動 脈 径 を 測 定 し た 。  
ガ ス ク ロ マ ト グ ラ フ 法 を 用 い て 各 群 の 内 頸 動  
脈 の 総 コ レ ス テ ロ ー ル 濃 度 を 測 定 し た 。  
F l o t i l l i n - 1 ( ラ フ ト に 特 異 的 に 発 現 し て い る  
蛋 白 質 ) と C a v e o l i n - 1 ( カ ベ オ ラ に 特 異 的 に  
発 現 し て い る 蛋 白 質 ) を 認 識 す る 抗 体 を 用 い  
た w e s t e r n b l o t t i n g に て 各 群 の 内 頸 動 脈 に お  
け る ラ フ ト と カ ベ オ ラ の 形 成 を 確 認 し た 。  
結 果 : 高 コ レ ス テ ロ ー ル 食 群 で は 正 常 群 と 比  
較 し て 内 頸 動 脈 内 に お け る 総 コ レ ス テ ロ ー ル  
濃 度 が 有 意 に 高 く 、 S A H m o d e l が 引 き 起 こ す  
脳 血 管 攣 縮 の 著 明 な 増 強 が 認 め ら れ た 。  $\beta$ - C D  
群 で は 、 高 コ レ ス テ ロ ー ル 食 に よ る 内 頸 動 脈  
内 の コ レ ス テ ロ ー ル レ ベ ル の 上 昇 と 脳 血 管 攣  
縮 の 増 強 が 抑 制 さ れ た 。 高 コ レ ス テ ロ ー ル 食  
群 で は 血 管 平 滑 筋 に お け る F l o t i l l i n - 1 と  
C a v e o l i n - 1 の 蛋 白 質 レ ベ ル が 有 意 に 上 昇 し 、  
 $\beta$ - C D 群 で は そ れ ら が 抑 制 さ れ た 。  
考 察 : S A H で 再 現 さ れ る 脳 血 管 攣 縮 は 血 管 平  
滑 筋 内 の 総 コ レ ス テ ロ ー ル 濃 度 の 上 昇 や ラ フ  
ト ・ カ ベ オ ラ の 形 成 に 伴 い 増 強 さ れ る 可 能 性  
が 示 唆 さ れ た 。

## 結 言

脳血管攣縮はくも膜下出血 (Subarachnoid Hemorrhage: SAH) に続発する主要脳血管の病的な機能的収縮であり、くも膜下出血後 4 日～14 日のうちにおよそ 3～7 割の頻度で発生し、攣縮発症後およそ 2 割の頻度で脳梗塞を合併する重篤な合併症である<sup>1)</sup>。脳血管攣縮の発生機序は未だ不明であり、現時点では脳血管攣縮がいったん発現すれば、これを確実に寛解させうる治療法はない。従って *in vitro* 系における研究のほか、*in vivo* 系 (特に SAH model による研究) における血管攣縮の観察・研究は脳血管攣縮発生機序の解明に大きく寄与すると考えられる<sup>2)</sup>。

血管平滑筋は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を介するカルシウム依存性収縮機構によって正常血圧 (筋緊張) を維持している。これに対して、血管攣縮などの血管平滑筋の異常収縮は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を伴わないカルシウム非依存性収縮機構による病的な血管収縮と考えられている。このカルシウム非依存性収縮機構で中心的な役割を果たしているのが Rho-kinase で、ミオシンホスファターゼをリン酸化して不活性化し、ミオシン軽鎖のリン酸化レベルを上昇させ血管収縮を引き起こす<sup>3) 4)</sup>。これまで、スフィンゴ脂質の一つであるスフィンゴシルホスホリルコリン (sphingosylphosphorylcholine: SPC) が Rho-kinase の上流因子として血管攣縮を引き起こし<sup>4) 5)</sup>、更に、その病的な血管収縮が主要な細胞膜脂質成分であるコレステロールによって制御されることが報告されている<sup>6)</sup>。

高脂血症は脳血管病の主要な危険因子である<sup>7)</sup>。コレステロールやスフィンゴ脂質は細胞膜上に存在するラフトやカベオラと呼ばれ、膜ドメイン構造に存在し、多くの細胞内情報伝達に関与すると考えられている<sup>8)</sup>。スタチンは 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA 還元酵素)

阻害剤で高脂血症の治療に用いられているが、その神経保護効果によって脳虚血を改善させ、くも膜下出血後の脳血管攣縮の抑制効果があるといふ報告がされている<sup>9)・11)</sup>。これら報告からは、脳血管攣縮において高脂血症によるラフトやカベオラの形成が引き起こす Rho-kinase を介する制御機構の存在が示唆される。

本研究では、正常ラットと高コレステロール食投与ラットを用いてくも膜下出血モデル (SAH model) を作成し、脳血管攣縮機構におけるコレステロールおよびラフト・カベオラの関与を検討する。

## 方法

実験動物：

雄の Sprague-Dawley ラット (5週) を通常の餌 (F1 飼料) で飼育した正常群、高コレステロール食 (F1 飼料 + 1% コレステロール + 1% コール酸) で飼育した高コレステロール食群、コレステロール除去剤 ( $\beta$ -サイクロデキストリン ( $\beta$ -CD)) を 5% 添加した高コレステロール食で飼育した  $\beta$ -CD 群に分けた。各餌は 8 週間投与した。今回の実験計画は山口大学医学部動物使用委員会の了承を得ている (使用計画書番号 51-030)。

麻酔：

手術前処置 (ハロセン 4%、笑気 70%、酸素 30%) にて前麻酔をかけた。ラットを仰臥位とし、気管内挿管 (SAH model) または気管切開 (cranial window model) を行い人工呼吸管理下に全身麻酔 (ハロセン 1.0~1.5%、笑気 70%、酸素 30%) に移行した。左側の大動脈に血圧測定・血液サンプル採取用の動脈ラインを留置し、動脈血液中の酸素分圧と二酸化炭素分圧をそれぞれ 150-240 mmHg と 35-42 mmHg の範囲に維持した。実験中は、

センサー付き温マットを使用し直腸温を37.0℃に維持した。

Cranial window modelの作成：

ラットの頭部を仰臥位で固定した。気管・頸動脈・迷走神経を損傷しないように丁寧に周囲の筋組織と皮下組織を剥離し、頭蓋底を露出しデンタルドリルにて6×3 mmの開頭を設けcranial window (7×4 mm)を留置した。Cranial windowには3本のカテーテル(人工脊髄液の注入ルート、排液ルート、および脳圧測定ルート)を留置した(図3)。Cranial window内に人工脊髄液を注入し、人工脊髄液灌流下に硬膜とくも膜を切開・剥離し、cranial window内に脳底動脈を露出させた。Cranial window内を人工脊髄液で満たし、カバーガラス(直径5.0 mm)を設置しcyanoacrylate glueを用いて密閉して人工脊髄液を持続灌流させた。Cranial windowに留置した排液ルートの高さを調節し、脳圧は9.5-10.5 cm H<sub>2</sub>Oの範囲に維持した。人工脊髄液(組成：Na<sup>+</sup>, 151 mEq/L; K<sup>+</sup>, 4 mEq/L; Ca<sup>2+</sup>, 3 mEq/L; Cl<sup>-</sup>, 110 mEq/L; glucose, 100 mg/dL)は37.0℃の恒温槽で温め、5% CO<sub>2</sub>のバブリングでpHを7.48に調節した。

脳底動脈は顕微鏡(model SZX16-3111, Olympus)に搭載されたデジタルカメラ(model DP71-SET-A, Olympus)で動画撮影され、ビデオマイクローメーターを用いて血管径(μm)を計測し、その変化(%)を計算し、統計解析(Student's paired t test, Mann-Whitney U test)にて判定した(p < 0.05にて有意差ありと判定)。ラット脳底動脈径の計測は、各々の刺激(人工脊髄液の注入、Rho-kinase阻害剤(Y27632)の投与、SAHの除去操作)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。

## SAH model の作成 :

ラットの頭部を腹臥位で固定し、頸部を屈曲させた。頭頸部の筋層を剥離し cisterna magna の硬膜を露出した。硬膜に 27-gauge needle を挿入し 0.3 ml の脳脊髄液を吸引後、動脈ルートより採取した 0.3 ml の自家血を 3 分間かけて注入した。自家血の注入後、27-gauge needle 挿入部に cyanoacrylate glue を塗布した。筋層および皮膚を layer to layer に縫合し腹臥位で頭部を屈曲し (30°)、60 分間安静にした (最初の自家血注入日を Day 0 とする)。同様の操作を Day 2 にも行った (double hemorrhage model)。Day 5 に上述の方法で cranial window を設置し、脳底動脈を観察した。

## 実験プロトコール :

- ① 各群のラットを用い、くも膜下出血群 (double hemorrhage model) を作成した。Day 5 に cranial window を設置し脳底動脈径を経時的に測定し評価した。コントロール群として自家血を注入しない正常ラットを使用した。
- ② 正常ラットのくも膜下出血群では Day 5 に引き起こされる脳底動脈径の変化 (狭小化) に対して、Y27632 を cranial window 内に灌流する人工脊髄液内に 10  $\mu$ M の濃度で注入し、その抑制効果を検討した。
- ③ 正常ラットのくも膜下出血群を用い Day 5 に 4% パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、脳底動脈・前下小脳動脈分岐部にて脳切片を作成し Hematoxylin-Eosin (HE) 染色と Azan 染色を行い顕微鏡下で観察した。
- ④ 各群のラットを用い、全身麻酔・人工呼吸管理下に内頸動脈を採取し、内頸動脈の外膜を丁寧に剥離・除去し検体を作成した。
- ⑤ ④ で採取した検体を均質化し、有機溶媒 (クロロホルム / メタノール / 水 ; 体積比 1 : 2 : 0.8) 抽出後にガスクロマトグラフ法を

用いて総コレステロール濃度 (mg/g) を測定した。また、同じ検体に対して薄層クロマトグラフ法を用いて phosphatidylcholine 濃度 (mg/g) を測定した。phosphatidylcholine は細胞膜リン脂質の主成分であり、ラフトやカベオラの構成成分に対するコントロールとして評価した。

- ⑥ ④で採取した検体に対して Flotillin-1 (ラフトに特異的に発現している蛋白質) と Caveolin-1 (カベオラに特異的に発現している蛋白質) を用いた western blotting にてラフトとカベオラの形成を確認した。 $\beta$ -actin の発現レベルを基準とした。

## 結果

SAH model における生理学的パラメータ：

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。SAH model 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。

血管平滑筋内における総コレステロール濃度：

ガスクロマトグラフ法による各群 ( $n=5$ ) の血管平滑筋内における総コレステロール濃度は高コレステロール食群で有意に高く、 $\beta$ -CD 群では総コレステロール濃度の上昇は抑制された (図 1)。薄層クロマトグラフ法を用いた血管平滑筋内の phosphatidylcholine 濃度は各群 ( $n=5$ ) で有意な差は認められなかった (図 1)。この結果は高コレステロール食で飼育したラットでは内頸動脈の組織内コレステロールレベルが上昇し、 $\beta$ -CD 含有の高コレステロール食で飼育したラットでは高コレステロール食による内頸動脈内コレステロールレベルの上昇が抑制されたことを示唆する。各

群のラットの体重(g)は正常群が  $393.6 \pm 27.9$  で、高コレステロール食群が  $460.0 \pm 56.0$  で、 $\beta$ -CD群が  $401.5 \pm 31.1$  であり、高コレステロール食群で統計学的に有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。これらの結果からも高コレステロール食投与におけるコレステロール摂取率の上昇が $\beta$ -CDによって抑制されたことが示唆された。

血管平滑筋におけるラフト・カベオラの形成：

各群 ( $n=5$ ) の内頸動脈に対する western blotting の結果、高コレステロール食群では正常群と比較して有意に Flotillin-1 と Caveolin-1 の蛋白質レベルが高かった。また、 $\beta$ -CD群では高コレステロール食群で認められた Flotillin-1 と Caveolin-1 の蛋白質レベルの有意な上昇は抑制された (図 2)。この結果は、高コレステロール食群では血管平滑筋におけるラフトとカベオラの形成が促進され、 $\beta$ -CD群では高コレステロール食群で認められたラフトとカベオラの形成の促進が抑制されていることを示す。薄層クロマトグラフ法の結果からは血管平滑筋内における細胞膜リン脂質の主成分である phosphatidylcholine 濃度は各群で変化がなかった。ラフトとカベオラは phosphatidylcholine が主成分である非ラフト・カベオラ成分よりも多くのコレステロールを含んでおり、今回の結果から血管平滑筋内のコレステロールレベルの上昇がラフトとカベオラの形成を促進した可能性が示唆された。

SAH model における脳血管攣縮：

図 3 は Cranial window を用いたラット脳底動脈の観察結果を示している。正常群の SAH を発症していない脳底動脈径は  $358.9 \pm 32.0$  ( $\mu\text{m}$ ) であったが ( $n=17$ )、SAH model (Day 5) では  $302.2 \pm 38.4$  ( $\mu\text{m}$ ) であり ( $n=9$ )、15.8% の脳血管攣縮が認められた (図 3,  $p < 0.01$ )。正常群の SAH model (Day 5) に対し



て Rho-kinase 阻害剤の Y27632 (10  $\mu$ M) を cranial window 内に灌流する人工脊髄液内に 10  $\mu$ M の濃度で注入し投与すると (n=4)、脳底動脈径の平均は 376.4  $\pm$  19.5 ( $\mu$ m) となり攣縮血管の弛緩が認められた (図 3, p < 0.05)。高コレステロール食群の SAH model (Day 5) では脳底動脈径は 248.1  $\pm$  34.6 ( $\mu$ m) であり (n=6)、正常群の SAH model (Day 5) と比較して著明な脳血管攣縮が認められた (図 3, p < 0.05)。一方、 $\beta$ -CD 群の SAH model (Day 5) では脳底動脈径の平均は 305.4  $\pm$  25.3 ( $\mu$ m) となり (n=6)、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 (図 3, p < 0.05)。SAH model の結果と各群における内頸動脈のコレステロールレベルや Flotillin-1 と Caveolin-1 の発現の結果から血管平滑筋のコレステロールレベルの上昇がラフトやカベオラの形成を促し、結果として脳血管攣縮が増強することが示唆された。組織所見としては、脳血管攣縮に特徴的な内弾性板の皺縮 (corrugation of tunica elastica) が正常ラットの SAH model (Day 5) で認められた (図 4)。

## 考 察

著者が今回作成したラット SAH model では Day 5 に脳血管攣縮が再現された。また、組織学的検討でも脳血管攣縮に特徴的な内弾性板の皺縮が確認できた。これまでのラット SAH model を用いた報告では、Lu H<sup>12)</sup>らによって再現された脳血管攣縮は Day 5 で最も強く、その狭窄率は 23.3%であった。Zhou ML<sup>13)</sup>らによれば、ウサギの single hemorrhage model と double hemorrhage model で脳血管攣縮の程度・経過・臨床症状・くも膜下腔の残存血腫を比較した結果、double hemorrhage model で脳血管攣縮の再現性が高いことが判明している。今回作成した SAH

model もこの double hemorrhage model であり、Day 5 における平均動脈圧の上昇率や脳底動脈の狭窄率はこれまでの報告と同等であった。今回の SAH model では Rho-kinase の選択的阻害剤 Y27632 を投与することで、攣縮血管の拡張が認められた。Rho-kinase は力管シウム非依存性収縮機構による病的な血管収縮に深く関わっており、脳血管攣縮でも重要な役割を果たしていると考えられてい

2)4)。上記の結果を含め、経時的な血圧変動所見からも今回著者が作成した SAH model は脳血管攣縮の再現性が高いモデルであることが示唆された。

SAH model には前頭部から前頭蓋底に穿刺を行ない chiasmatic cistern に自家血を注入するモデルも報告されている<sup>14)</sup>。このモデルでは、ヒトの SAH で高率に認められる前方循環系のくも膜下腔への出血が再現され、実際の SAH で問題となる前大脳動脈や中脳動脈の血管攣縮を評価可能であるが、血管径は平滑筋の運動を評価するには適さない。今回著者が作成したモデルでは cranial window 内に挿入されたカテーテルからくも膜下腔に正確な濃度の試薬を投与し、連続的な血管収縮運動の評価が可能である。くも膜下出血後の脳血管攣縮に関する研究では、脳血管撮影、脳血管造影は連続的な血管収縮運動の評価が難しく、今回のモデルは脳血管造影を用いたが、β-CD 含有濃度を各群におけるラット内頸動脈内のコレステロールの定量結果から、脳血管攣縮が増悪する高コレステロールの上昇が認められた。本研究ではコレステロール除去剤としてβ-CD を用いたが、β-CD 含有濃度をこれまでのコレステロール除去効果を示す報告の濃度を使用した<sup>15)</sup>。その結果、β-CD 含有

の高コレステロール食で飼育されたラットの頸動脈内のコレステロールレベルの上昇や SAH model で引き起こされる血管攣縮の増悪は抑制された。また、脳血管攣縮の程度は頸動脈内の phosphatidylcholine レベルに影響されなかった。また、各群における western blotting の結果からは、脳血管攣縮が増悪する高コレステロール食群で血管平滑筋内の Flotillin-1 と Caveolin-1 の蛋白質レベルの有意な上昇が認められ、 $\beta$ -CD 群では Flotillin-1 と Caveolin-1 の蛋白質レベルの有意な上昇は抑制された。細胞膜上に存在するラフトやカベオラと呼ばれる膜ドメイン構造は悪性新生物、動脈硬化、虚血性心疾患などの発症機序に関連する細胞内情報伝達を促進するプラットフォームと考えられている(8)16)。ラフトやカベオラは、phosphatidylcholine が主成分である非ラフト・カベオラ成分よりも多くのコレステロールを含んでいる。今回の結果からはコレステロールやコレステロールに富んだラフト・カベオラの形成促進は脳血管攣縮を増強することが示唆された。これまでに SPC-Rho-kinase 系が引き起こす血管攣縮が Src family protein tyrosine kinases (Src-TKs) の活性化を介していることと、この SPC/Src-TKs/Rho-kinase 系が引き起こす血管攣縮がラフトによって制御されていることが報告されている(5)6)。また、ラフトはスフィンゴ脂質や Src-TKs を含んでいることも報告されている(17)。これまでの報告と本研究結果からは、SPC/Src-TKs/Rho-kinase 系が引き起こす血管攣縮がくも膜下出血後の脳血管攣縮のメカニズムに深く関わっている可能性が予想される。高脂血症は脳血管病の危険因子であり(7)、血管平滑筋におけるプラークや血栓の形成と似た病態が、高脂血症が引き起こす心血管や脳血管イベントと深く関わっている(18)-20)。Rho-kinase の活性化を介するカルシウム非

て血関果トを管るよズ。  
い出の結フ縮血れをニる。  
つ下症のラ攣、サルカい  
に膜血々る管は導ナメて  
縮も脂我け血後誘グ御え  
攣く高のおな今からシ制考  
血管と回に的。から縮の  
血ム今筋病た。か縮の  
やズ。滑しれオラ介すの  
圧<sup>2)</sup><sup>4)</sup><sup>21)</sup>ニい平進さオラ介すの  
血が力な管促峻カベオラ介すの  
高るメは血を示力ベオラ介すの  
とれの報告が成がや力ベオラ介すの  
構ら縮報症形性トの活性化  
機め攣の血の能ラフトの  
縮認管て脂ラ可ラフトの  
収は血い高オる筋の  
性報告脳つ、ベす筋の  
存報のにら力御滑  
依の後係かや制御平  
R h o - k i n a s e の活  
り詳細にするこ  
ムをより詳細に

## 結 語

著者は cranial window 法を応用し、ラッ ト  
S A H m o d e l に お け る 脳 血 管 攣 縮 の 再 現 に 成 功 血 濃 増 口 べ 更  
した。また、くも膜下出血で再発する一伴スヤム  
管攣縮が血管平滑筋内力した促進さ縮のメ  
度の上昇やコトで形成が血管のメ  
強されに制御する必要  
一オラが解明が必  
なる解明が必

## 引 用 文 献

- 1) Kassell NF, Sasaki T, Colohan AR, Nazar G. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke. 1985; 562-572.
- 2) Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K. Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. Circ Res. 2000;87:195-200.
- 3) Kawamichi H, Kishi H, Kajiya K, Takada Y, et al. Molecular mechanisms of abnormal vascular contraction and the screening for their molecular-targeted therapeutic drugs. Nippon Yakurigaku Zasshi. 2009 Mar;133(3):124-129.
- 4) Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Nakao F, et al. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated  $Ca^{2+}$ -sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase. Circulation Research. 2002; 91:112-119.
- 5) Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, Mizukami Y, et al. Involvement of Src family protein tyrosine kinase in  $Ca^{2+}$  sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. Circ Res. 2002;91:953-960.
- 6) Morikage N, Kishi H, Sato M, Guo F, et al. Cholesterol primes vascular smooth muscle to induce  $Ca^{2+}$  sensitization mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway: possible role for membrane raft. Circulation Research. 2006; 99:299-306.
- 7) Turan TN, Makki AA, Tsappidi S,

- Cotsonis G, et al. Risk factors associated with severity and location of intracranial arterial stenosis. *Stroke* 2010;41:1636-1640.
- 8) Das M, Gherghiceanu M, Lekli I, Mukherjee S, Popescu LM, Das DK. Essential role of lipid raft in ischemic preconditioning. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21:325-334.
- 9) Sterzer P, Meintzschel F, Rösler A, Lanfermann H, et al. Pravastatin improves cerebral vasomotor reactivity in patients with subcortical small-vessel disease. *Stroke* 2001;32:2817-2820.
- 10) Tseng MY, Czosnyka M, Richards H, Pickard JD, et al. Effects of acute treatment with pravastatin on cerebral vasospasm, autoregulation, and delayed ischemic deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a phase II randomized placebo-controlled trial. *Stroke* 2005;36:1627-1632.
- 11) Tseng MY, Hutchinson PJ, Turner CL, Czosnyka M, et al. Biological effects of acute pravastatin treatment in patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Neurosurg*. 2007;107:1092-1100.
- 12) Lu H, Shi JX, Chen HL, Hang CH, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the cerebral artery after experimental

- subarachnoid hemorrhage; *Brain Res.* 2009 Mar 25;1262:73-80.
- 13) Zhou ML, Shi JX, Zhu JQ, Hang CH, et al. Comparison between one- and two-hemorrhage models of cerebral vasospasm in rabbits. *J Neurosci Methods.* 2007; 159:318-24
- 14) Sabri M, Jeon H, Ai J, Tariq A, et al. Anterior circulation mouse model of subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.* 2009; 1295: 179-185
- 15) Kaewprasert S, Okada M, Aoyama Y. Nutritional effects of cyclodextrins on liver and serum lipids and cecal organic acids in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2001;47:335-339.
- 16) Michel V, Bakovic M. Lipid rafts in health and disease. *Biol Cell.* 2007;99:129-140.
- 17) Besshoh S, Bawa D, Teves L, Wallace MC, et al. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem.* 2005;93:186-194.
- 18) Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993;87:1781-1791.
- 19) Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, et al. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the

increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation* 1995;92:3172-3177.

20) U-King-Im JM, Young V, Gillard JH. Carotid-artery imaging in the diagnosis and management of patients at risk of stroke. *Lancet Neurol.* 2009;8:569-580.

21) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990-994.



The Mechanism of the Cerebral  
Vasospasm in a Rat Subarachnoid  
Hemorrhage Model.

- Mechanistic Role of Cholesterol in the  
Regulation of Vasospasm -

Yoshino Hiroko

Department of Neurosurgery,  
Yamaguchi University School of Medicine

**Objective:** Rho-kinase (ROK)-mediated vascular smooth muscle (VSM) contraction plays a pivotal role in cerebral vasospasm (CV). Previous studies showed that hypercholesterolemia increased sphingosylphosphorylcholine-ROK-mediated VSM contraction. Lipid rafts and caveolae are cholesterol-enriched membrane microdomains that influence signal transduction. In this study, we showed the effect of cholesterol, lipid raft, and caveolae on CV.

**Methods:** Sprague-Dawley rats received a control diet, a cholesterol-diet, or a cholesterol-diet+ $\beta$ -cyclodextrin, which depletes VSM cholesterol, for 8 weeks, and were subjected to SAH model surgery. We used double-hemorrhage SAH model, and CV of basilar artery (BA) at Day 5 were measured using cranial window preparations. Total cholesterol levels in the internal carotid artery (ICA) were measured using gas chromatography. The expression of Flotillin-1, a planar raft marker, and Caveolin-1, a caveolae marker,

in the ICA were analyzed by western blotting.

**Results:** SAH-induced CV was markedly reversed by intracisternal infusion with Y27632 (10  $\mu$ M), a ROK-inhibitor. Whereas the cholesterol-diet increased VSM cholesterol and CV, depletion of VSM cholesterol inhibited CV. The cholesterol-diet also increased Flotillin-1 and Caveolin-1 expression in the VSM. Depletion of VSM cholesterol also inhibited the increasing of Flotillin-1 and Caveolin-1 expression.

**Conclusions:** These results indicate that cholesterol potentiates CV and are compatible with a role for lipid rafts and caveolae in this process.

## 図の説明

表 1. SAH model における生理学的パラメータの変化

M A B P = Mean arterial blood pressure;  
P a C O<sub>2</sub> = partial pressure of carbon dioxide  
in arterial blood; P a O<sub>2</sub> = partial pressure  
of oxygen in arterial blood; B T = body  
temperature

図 1. 血管平滑筋内の総コレステロール濃度  
血管平滑筋内の総コレステロール濃度は高  
コレステロール食群で正常群や $\beta$ -CD群と比  
較して有意に高く (a)、血管平滑筋内の  
phosphatidylcholine 濃度は各群で有意な差  
は認められなかった (b)。

a) 血管平滑筋内の総コレステロール濃度

b) 血管平滑筋内の phosphatidylcholine 濃  
度

Control: 正常群 (n=5), Cholesterol: 高コレ  
ステロール食群 (n=5),  $\beta$ -CD:  $\beta$ -CD 群 (n=5).

\* p < 0.05

図 2. Flotillin-1 と Caveolin-1 の発現  
(western blotting)

血管平滑筋内の Flotillin-1 (a) と  
Caveolin-1 (b) の蛋白質レベルは高コレステ  
ロール食群では正常群と比較して有意に高か  
った。また、 $\beta$ -CD 群では高コレステロール食  
群で認められた Flotillin-1 (a) と  
Caveolin-1 (b) の蛋白質レベルの有意な上昇  
は抑制された。

Control: 正常群 (n=5), Cholesterol: 高コレ  
ステロール食群 (n=5),  $\beta$ -CD:  $\beta$ -CD 群 (n=5).

\*\* p < 0.05

図 3. SAH model における脳血管攣縮 (cranial window 法)

(A) 頸部を剥離し頭蓋底を露出させ、cranial window を設置した模式図。髄液注入・排出ルートから人工脊髄液を灌流・排泄させ、脳圧測定ルートで脳圧を一定値に保ち、脳底動脈径を測定した。

(B) 正常群では、SAH model (Day 5) にて脳底動脈の攣縮が認められた (a, b)。正常群の SAH model (Day 5) に対して Y27632 (10  $\mu$ M) を投与すると、脳底動脈の血管攣縮の改善が認められた (c)。高コレステロール食群の SAH model (Day 5) では、正常群の SAH model (Day 5) と比較して著明な脳底動脈の攣縮が認められた (d)。 $\beta$ -CD 群の SAH model (Day 5) では脳底動脈の血管攣縮の増悪は抑制された (e)。

a) SAH を発症していない脳底動脈 (正常群)

b) SAH (Day 5) の脳底動脈 (正常群)

c) SAH (Day 5), Y27632 (10  $\mu$ M) 投与後の脳底動脈 (正常群)

d) SAH (Day 5) の脳底動脈 (高コレステロール食群)

e) SAH (Day 5) の脳底動脈 ( $\beta$ -CD 群)

スケール幅は 500  $\mu$ m。

(C) 正常群 (n=9) では、SAH model (Day 5) にて脳底動脈の攣縮 (血管径:  $302.2 \pm 38.4$  ( $\mu$ m)) が認められた。正常群の SAH model (Day 5) に対する Y27632 (10  $\mu$ M) の投与の結果、脳底動脈径の平均は  $376.4 \pm 19.5$  ( $\mu$ m) となり攣縮血管の弛緩が認められた (n=4)。高コレステロール食群 (n=6) の SAH model (Day 5) では脳底動脈径は  $248.1 \pm 34.6$  ( $\mu$ m) であり、正常群の SAH model (Day 5) と比較して著明な脳血管攣縮が認められた。 $\beta$ -CD 群 (n=6) の SAH model (Day 5) では脳底動脈径の平均は  $305.4 \pm 25.3$  ( $\mu$ m) 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。

m - C S F : S A H を発症していない脳底動脈径 (正常群), n = 17

m - S A H : S A H ( D a y 5 ) の脳底動脈径 (正常群), n = 9

S A H - Y 2 7 6 3 2 : S A H ( D a y 5 ) に Y 2 7 6 3 2 を投与した脳底動脈径 (正常群), n = 4

m - S A H ( c h o l ) : S A H ( D a y 5 ) の脳底動脈径 (高コレステロール食群), n = 6

m - S A H (  $\beta$  - C D ) : S A H ( D a y 5 ) の脳底動脈径 ( $\beta$  - C D 群), n = 6

\*\*\* : p < 0.01 (対 m - C S F),  $\eta$  : p < 0.05 (対 m - S A H),  $\eta \eta$  : p < 0.05 (対 m - S A H),  $\eta \eta \eta$  : p < 0.05 (対 m - S A H ( c h o l )). mean  $\pm$  sd.

図 4. S A H model における脳血管攣縮 (組織学的評価)

正常群の脳底動脈の組織標本 (H E 染色, A z a n 染色) では、S A H model (D a y 5) で脳血管攣縮に特徴的な内弾性板の皺縮 (c o r r u g a t i o n o f t u n i c a e l a s t i c a) が認められた (矢印)。

a) 正常群の脳底動脈 (H E 染色)

b) S A H model の脳底動脈 (H E 染色)

c) 正常群の脳底動脈 (A z a n 染色)

d) S A H model の脳底動脈 (A z a n 染色)

c o r r u g a t i o n o f t u n i c a e l a s t i c a ( a r r o w ).

スケール幅は 50  $\mu$ m.

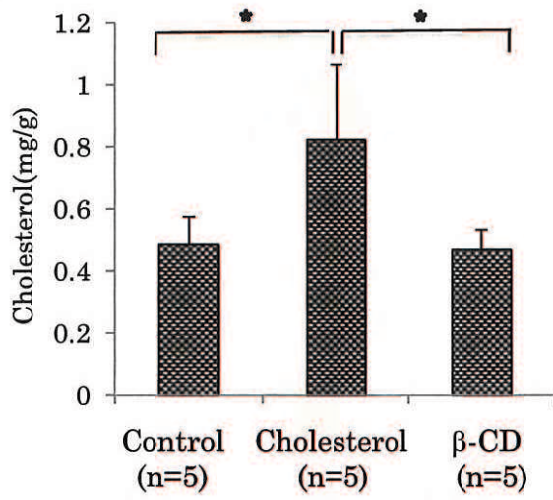
図・表

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 <sub>2</sub> (mmHg)	40.7 ± 2.5	38.0 ± 2.6	38.3 ± 4.3
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	155 ± 49	182 ± 59	182 ± 83
BT (°C)	37.2 ± 0.2	37.2 ± 0.2	37.2 ± 0.1

mean ± sd, # p < 0.05 (vs. Day 0)

图 1  
a)



b)

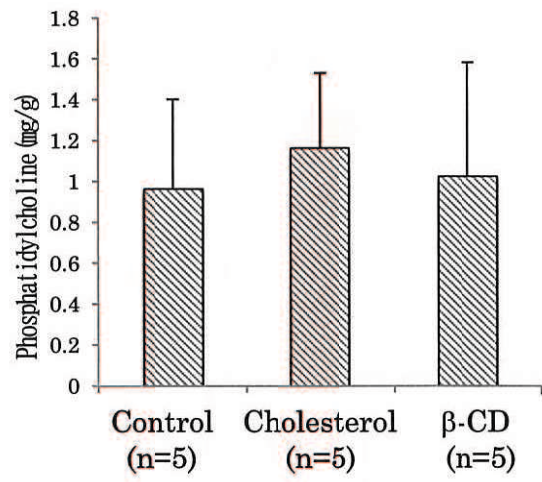
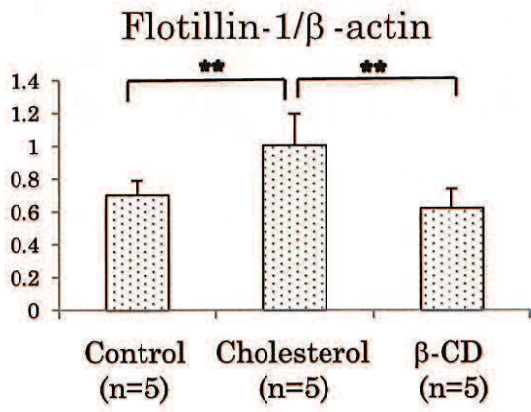
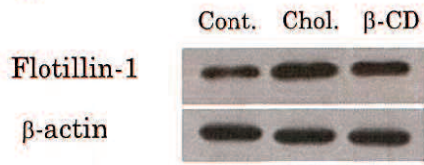


图 2

a)



b)

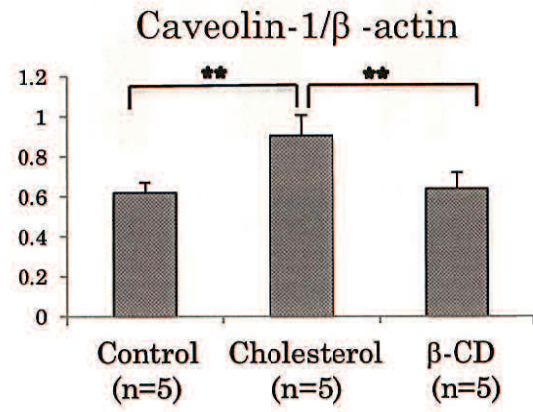
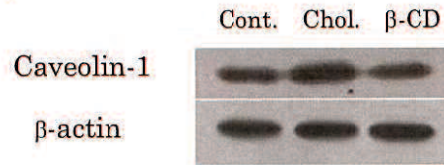
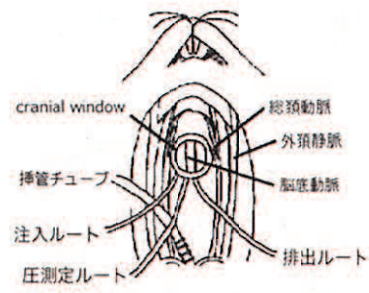
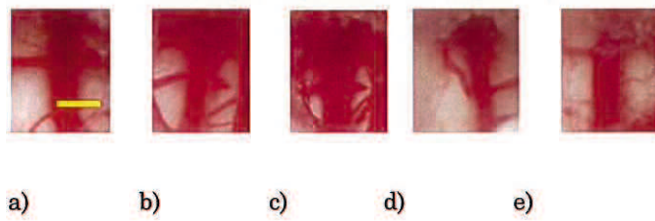




図3  
(A)



(B)



(C)

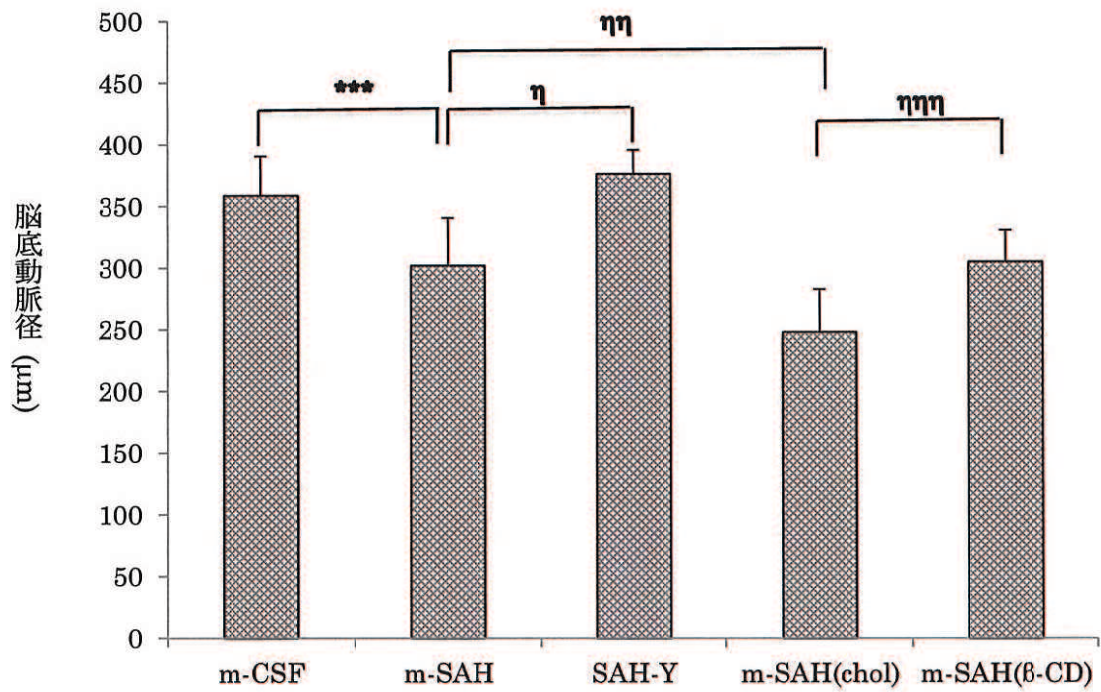


图 4

