

主論文の要旨

**Increased ICP promotes CaMK II -mediated
phosphorylation of neuronal NOS at Ser⁸⁴⁷ in
the hippocampus immediately after
subarachnoid hemorrhage**

くも膜下出血後の頭蓋内圧亢進による海馬における
カルモデュリンキナーゼ II を介する神経型 NOS Ser⁸⁴⁷ リン酸化の促進

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：若林 俊彦 教授)

牧野 一重

【緒言】

くも膜下出血 (SAH) は人口 10 万人当たり約 6~8 人の割合で発症し、死亡率が高く後遺症が残りやすい予後不良な疾患である。SAH の予後不良因子として、これまでは発症 4 日目~14 日目前後に遅発性に起こる脳血管攣縮が主な要因とされてきたが、最近では SAH 発症急性期の脳損傷の関与が指摘されている。重症 SAH 発症後にしばしば学習障害や記憶障害が認められ、SAH モデルラットにおいて海馬 CA1 領域の神経シナプスの減少が報告されているが、カルモデュリンキナーゼ II (CaMKII) は海馬での記憶やシナプス伝達の可塑性に重要な役割を果たしていると考えられている。CaMKII α は神経型 NOS (nNOS) の Ser⁸⁴⁷ をリン酸化することで nNOS の活性化を抑制することが知られている。SAH 発症後の nNOS の活性変化については未だ明らかにされておらず、今回我々は SAH 発症直後の海馬及び大脳皮質における nNOS の Ser⁸⁴⁷ リン酸化に注目し、その経時的変化を明らかにすることを目的とした。

【対象及び方法】

Sprague-Dawley rat 雄 300~350g を用い、大槽より自己血 300 μ l を投与する 1 回出血 SAH モデルを作製した。検体としては SAH 発症 1, 2, 6, 12, 24 時間後に、海馬及び隣接する大脳皮質を採取した。また自己血を投与していないラットの海馬と皮質を、コントロール群として用いた。nNOS は粗抽出分画から ADP アガロースゲルを用いて部分精製した(NOS 分画)。NOS 分画を用いて、ウェスタンブロット法にて nNOS ならびに Ser⁸⁴⁷ 残基リン酸化 nNOS (NP847) の発現につき検討した。また、コントロールならびに SAH モデル 1 時間後において免疫組織学的に nNOS ならびに NP847 の発現部位につき検討した。自己血投与 1 時間後、同量の生理食塩水を投与 1 時間後ならびにコントロール群を用いて、海馬における NP847 の発現につき比較検討した。コントロール群と SAH0.5 ならびに 1 時間後における海馬ならびに皮質を採取し、粗抽出分画と NOS 分画での CaMKII α 割合を比較検討した。統計学的分析については ANOVA 法及び多重比較には Fisher の PLSD 法を用いて検討した。有意差については $p < 0.05$ で測定した。

【結果】

ウェスタンブロット法では、NOS 分画では nNOS はほぼ均一であったが、SAH 発症 1 時間後群において NP847 はコントロール群に比べ、海馬においては有意に増加していたが、皮質においては有意な変化が認められなかった。このため SAH 発症の際に、海馬において Ser⁸⁴⁷ のリン酸化によって nNOS 活性を調節していることが示唆された。(Fig.1)

海馬の CA1 領域においてコントロール群ならびに SAH 発症 1 時間後においても nNOS の発現に変化がなかったが、コントロール群では認められなかったが、SAH 発症 1 時間後群の海馬の CA1 領域において NP847 の活性化が観察された。(Fig.2)

生理食塩水投与 1 時間後の海馬においても NP847 の有意な増加が、自己血投与群

と同様に認められた。(Fig.3)

nNOS と CaMKII α の共存についての検討では、SAH 発症群の海馬及び大脳皮質において粗抽出分画の CaMKII α のレベルはコントロールと比較して変化が認められなかった。一方、NOS 分画においては、コントロールと比較し、SAH 発症 0.5 時間後の海馬において、CaMKII の共存の有意な増加が認められたが、大脳皮質において変化は認められなかった。(Fig.4)

【考察】

以前我々は一過性前脳虚血モデルラットにおいて、海馬における CaMKII α による Ser⁸⁴⁷p-nNOS の誘導を報告してきたが、今回我々のデータから、SAH 発症直後においても、頭蓋内圧亢進により一過性脳虚血を来し、海馬において CaMKII α により nNOS の Ser⁸⁴⁷ リン酸化が促進されることが示唆された。海馬における Ser⁸⁴⁷p-nNOS の活性化により、過剰な NO 産生を抑制し、急性期の脳損傷に対し神経保護的に作用することで、SAH 直後の虚血性脳損傷を緩和させていると考えられた。今後 NOS ノックアウトマウスなどを用いることで、SAH 発症後の海馬における急性期の脳損傷について nNOS および CaMKII α のより正確な働きが解明されるものと考えられる。

【結論】

SAH 発症直後の頭蓋内圧亢進により一過性脳虚血を来し、海馬において CaMKII α を介して nNOS Ser⁸⁴⁷ リン酸化が促進されることが示唆された。海馬における Ser⁸⁴⁷p-nNOS の活性化により、過剰な NO 産生を抑制し、急性期の脳損傷に対し神経保護的に作用することで、SAH 直後の虚血性脳損傷を緩和させる働きがあるものと考えられた。