

主論文の要旨

**Subarachnoid hemorrhage induces neuronal nitric
oxide synthase phosphorylation at Ser¹⁴¹² in the
dentate gyrus of the rat brain**

〔 くも膜下出血によるラット海馬歯状回での
nNOS Ser¹⁴¹² のリン酸化の促進 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
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)

和田 健太郎

【緒言】

くも膜下出血（以下 SAH）の機能予後悪化の原因として、近年 SAH 発症急性期における神経障害(early brain injury, EBI)の関与が報告されている。SAH の患者の後遺症として、学習能力低下と記憶障害があり、ラットの SAH モデルの動物実験では記憶に深く関係のある海馬の CA1 領域のシナプスニューロンが有意に減少するとの報告がある。我々は以前、ラットの前脳虚血モデルにおいて cyclic AMP-dependent protein kinase(以下 PKA)が海馬の歯状回において neuronal nitric oxide synthase(以下 nNOS)の Ser¹⁴¹² のリン酸化を引き起こしていることを報告した。このリン酸化によって nNOS の活性が上昇することによる神経障害から、脳虚血後に鬱症状を引き起こす可能性が示唆された。本研究では、SAH 後急性期における海馬と皮質の Ser¹⁴¹² リン酸化 nNOS の経時的な発現変化と発現部位の局在ならびに、PKA との関連性について検討した。

【対象及び方法】

300-350g の雄の Sprague-Dawley ラットを使用し、大槽より自己血(300 μ L)を注入する 1 回出血 SAH モデルを作製した。SAH 発症 1、3、6、12、24 時間後に海馬と近接する大脳皮質を採取した。自己血を投与しなかったラットの海馬ならびに皮質をコントロールとした。採取した海馬と皮質から脱リン酸化酵素阻害剤を加えた homogenizing buffer を用いて粗抽出分画を作成し、ADP-agarose ゲルを用いて NOS を部分的に精製し、NOS 分画を作成した。nNOS ならびに Ser¹⁴¹² リン酸化 nNOS(NP1412)抗体を用いて Western blot と免疫組織染色を行い、NP1412 の発現について海馬と皮質において比較検討した。次に、コントロールならびに SAH モデル 1 時間後の検体を用いて nNOS ならび NP1412 と PKA と Thr¹⁹⁷ リン酸化 PKA (*p*-PKA) の発現部位につき免疫組織学的に検討した。更に、粗抽出分画を用いて Thr¹⁹⁷ リン酸化 PKA の経時的な変化を Western blot で検討し、NOS 分画において PKA が共存しているか Western blot にて追加検討した。最後に、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 NP1412 の発現につき Western blot にて比較検討した。統計学的分析については ANOVA 法を用いて検討し、多重比較には Fisher の PLSD 法を用いた。有意差については $P < 0.05$ で測定した。

【結果】

Western blot では nNOS の発現量は、コントロール、1、3、6、12、24 時間後の海馬ならびに皮質においてほぼ均一であったが、SAH 後急性期の 1 時間、3 時間で海馬での NP1412 の発現がコントロールと比べ有意であった。しかし、皮質においては NP1412 の有意な変化は認められなかった(Fig.1)。免疫組織染色を用いて、SAH 後 1 時間の海馬での NP1412 の発現部位について検討したところ、海馬歯状回を中心に発現していたが、海馬の CA1 など他の領域では NP1412 の発現は見られなかった(Fig.2)。よって、更なる免疫組織学的な比較検討は、海馬歯状回を中心に施行した。免疫組織染色の結果では、コントロールと SAH モデル 1 時間後では、nNOS そのものの発現は変化を認

めなかったが、NP1412 が有意に発現していた(Fig.3)。海馬の粗抽出分画を用いた Western blot では β -actin ならびに PKA の発現量に変化は認めなかったが、*p*-PKA の発現は SAH 1 時間、3 時間後の急性期においてコントロールと比べて有意に増大していた(Fig.4)。コントロールと SAH 1 時間後の歯状回での免疫組織染色では、PKA の発現はどちらも細胞質内であったが、一方、コントロールと比較すると SAH 1 時間後での *p*-PKA の発現は核内にも認められた(Fig.5)。海馬の NOS 分画を用いた Western blot にて検討した結果では、PKA が NOS と共存していることが確認できた(Fig.6)。自己血ならびに同容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 NP1412 の発現を比較検討した結果では、SAH 1 時間後ならびに生理食塩水投与 1 時間後の海馬でも NP1412 の発現がコントロールと比較し同様に有意に増大していた(Fig7)。

【考察】

SAH が起こった後、超急性期における頭蓋内圧の上昇が EBI と深い関係があると報告され、頭蓋内の灌流圧が低下することが神経細胞死への関連性も報告されている。また PKA は以前より中枢神経系での nNOS のリン酸化に関与するといわれており、臨床では long term potentiation や long term memory において重要な役割を果たしているとの報告がある。本研究では SAH が引き起こされることで、頭蓋内圧の上昇が起こり、一過性の脳虚血状態が引き起こされた可能性がある。以前に、我々はラット SAH モデルを用いて海馬の CA1 における Ser⁸⁴⁷ リン酸化 nNOS の発現を検討した結果、CA1 領域での Ser⁸⁴⁷ リン酸化 nNOS の発現が確認され、nNOS の活性が抑制され神経保護作用に関与していることを過去に報告した。今回同じモデルを用いて Ser¹⁴¹² リン酸化 nNOS を検討した結果では、海馬の歯状回で PKA のリン酸化が引き起こされ、引き続き Ser¹⁴¹² リン酸化 nNOS が有意に発現した可能性を解明した。Ser¹⁴¹² リン酸化 nNOS による nNOS の活性化の亢進が、EBI の原因の一つになると可能性が示唆された。また、SAH 後の海馬においても異なる部位において nNOS の活性化は異なっていることが判明した。

【結論】

SAH 急性期では頭蓋内圧の上昇により一過性の脳虚血状態が引き起こされ、その結果歯状回において PKA を介して、Ser¹⁴¹² リン酸化 nNOS の発現が促進される。このシグナル経路の活性化は過度な NO の産生を誘発して、SAH 後の認知機能障害などの脳高次機能障害の原因の一つになっていると考える。