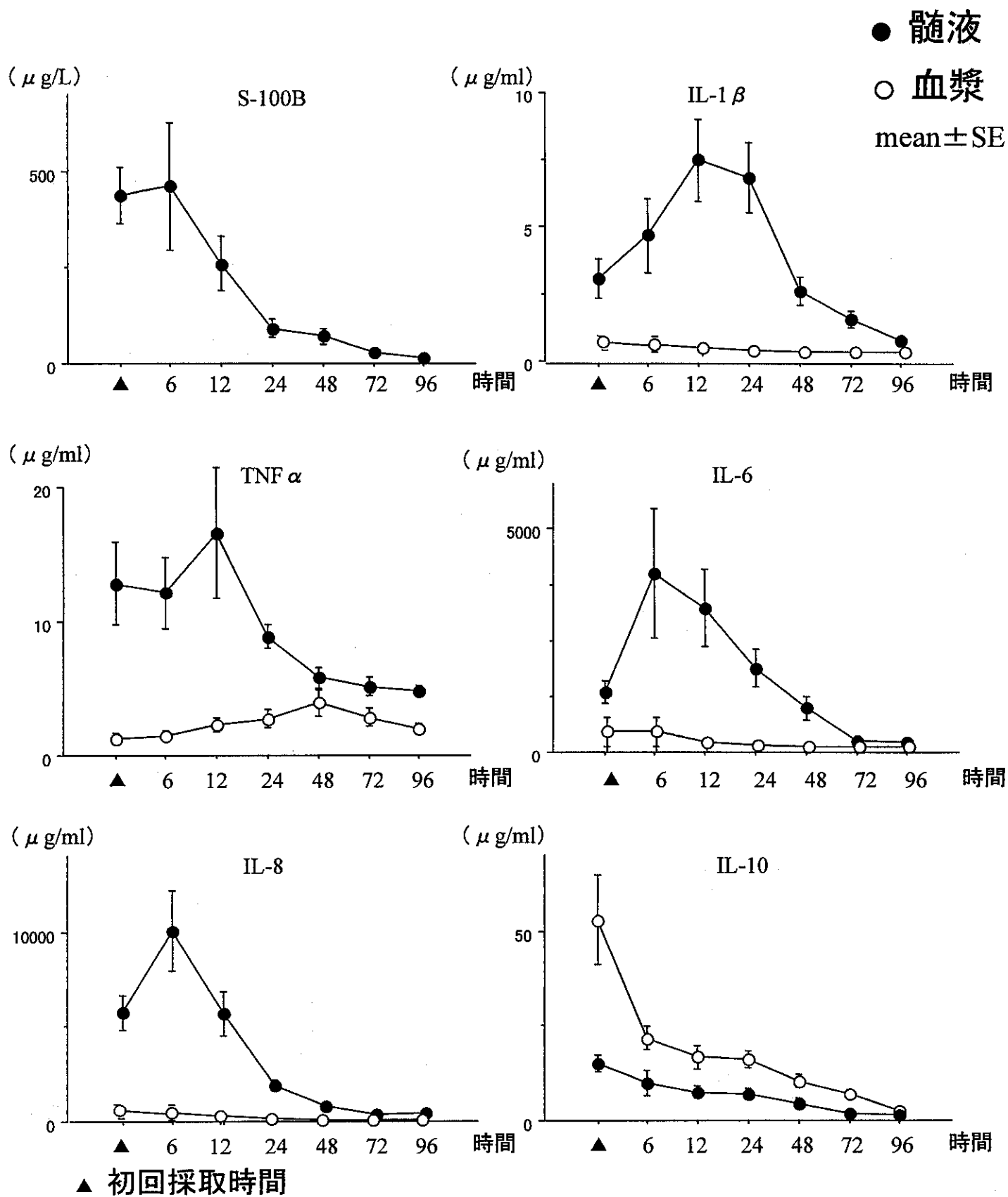


図1 S-100B蛋白とサイトカイン濃度の経時的変化



分担研究報告書（脳科学研究事業「中枢神経系外傷に関する研究」）

「脳死に伴うサイトカインバランスと多核白血球（PMNL）機能の変化に関する研究」

分担研究者	田中 裕	大阪大学医学部救急医学	助教授
協力研究者	島津 岳士	大阪大学医学部救急医学	助教授
	小倉 裕司	大阪大学医学部救急医学	助手
	塩崎 忠彦	大阪大学医学部救急医学	助手
	橋口 尚幸	大阪大学医学部救急医学	助手
	細坪 秀夫	大阪大学医学部救急医学	
	康 泰珍	大阪大学医学部附属病院	臨床検査部
	中森 靖	大阪大学大学院医学研究科博士課程救急医学講座	

研究要旨：脳死患者 15 例（頭部外傷群 8 例、非頭部外傷群 7 例）の末梢血中多核白血球（PMNL）機能をフローサイトメトリーで測定し、脳死に伴うサイトカインバランスと PMNL 機能の変化を検討した。脳死に伴い、サイトカインバランスは炎症性方向に崩れ、PMNL は急激に著しいプライミング状態をきたした。脳死によるサイトカインバランスの崩壊には、血中コルチゾール値の低下が一因として考えられた。

A. 研究目的

重症頭部外傷などに起因する脳障害患者において易感染性が指摘されている。脳障害に伴う神経内分泌系の変化が免疫機能に影響を及ぼす可能性がある。脳死は中枢神経系、脳内分泌系が遮断された状態であり、脳死に伴う免疫機能の変化を評価することは神経内分泌系が免疫系に及ぼす影響を知るうえで重要である。一方、侵襲に伴う生体反応において、多核白血球（PMNL）の役割は生体防御、組織障害の両面で重要と考えられるが、脳死に伴う PMNL 機能の変化は不明である。本研究の目的は、脳死に伴うサイトカインバランスと PMNL 機能の変化を明らかにし、また PMNL 機能の変化が組織障害性を発揮するか否かを

検討することである。

B. 研究方法

対象は脳死患者 15 例であり、頭部外傷群（T 群）8 例と非頭部外傷群（NT 群）7 例に分けて検討した。両群において、血中 CRP 値、白血球数と共に、血中 PMNL の活性酸素産生能および食食能をフローサイトメトリーにより、脳死前後で測定した。脳死後のポイントは、臨床上脳死後 24 時間以内のポイントであり、脳死前後の時間差は全例 72 時間以内であった。活性酸素産生能は、無刺激状態のプライミング指数と FMLP 反応性に分けて評価した。頭部外傷群 8 例において、PMNL 機能測定と同時に血中サイトカインバランス、コルチゾー

ル値を測定し、さらに血管内皮細胞障害の指標である soluble E-selectin 値、組織障害の指標である顆粒球 elastase 値、呼吸障害の指標である respiratory index (RI)、および臓器障害の指標である MOF score を評価した。

C. 研究結果

頭部外傷群および非頭部外傷群における脳死前後の血中 CRP 値、末梢白血球数、および PMNL 機能を表 1 に示す。血中 CRP 値は、両群共に脳死を契機として有意に上昇し、頭部外傷群においてより顕著に上昇がみられた。同様に、末梢白血球数も脳死を契機として両群において増加がみられ、頭部外傷群において有意な上昇が認められた。また、脳死前正常であった PMNL のプライミング指数および FMLP 反応性は、頭部外傷、非頭部外傷にかかわらず、脳死後有意に上昇した。一方 PMNL の貪食能は、頭部外傷群において脳死前有意に抑制されていたが、脳死を契機として著明な改善を認めた。

表 2 は、頭部外傷群 8 例において PMNL 機能の活性化を引き起こすメカニズムを血清因子の変化から検討した結果である。monocyte の活性化の指標である血中 neopterin 値は、脳死を契機として著明に増加した。炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、IL-8 の血中濃度は、いずれも脳死に伴い有意に上昇した。一方、抗炎症性サイトカインのひとつである IL-10 の血中濃度は、炎症性サイトカインの動きとは逆に、脳死に伴い有意に低下した。また、血中コルチゾール値は、脳死後明らかに減少した。脳死に伴う PMNL 機能の著しい活性化が組織障害性を発揮するか否かを検討した結果、血中 elastase 値、soluble E-selectin 値、respiratory index、MOF score

共に脳死を契機として著しい上昇を示した。

D. 考察

本研究では、頭部外傷の有無にかかわらず、脳死を契機として血中 CRP 値の上昇と PMNL の活性酸素産生能の著しい亢進がみられた。頭部外傷群においては、さらに末梢白血球数の増加と PMNL の貪食能の著しい改善が、脳死後認められた。したがって、脳死に伴い、全身性炎症反応の進行と PMNL 機能の著しい活性化が起きるといえる。そのメカニズムを血清因子の動きから検討した結果、monocyte の活性化の指標である血中 neopterin 値が著明に増加することから、脳死を契機として血中 monocyte の急激な活性化が起きると考えられる。monocyte の活性化と同時に炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、IL-8 の産生が亢進する一方で、抗炎症性サイトカインである IL-10 の血中濃度は減少した。IL-6 を代表とする炎症性サイトカインは、PMNL のプライミング因子であり、反対に IL-10 は PMNL の活性化を抑える因子と報告されている。したがって、今回我々がとらえたサイトカインバランスの動きは、脳死に伴う PMNL の活性化を説明しうる。また、glucocorticoid は血中に投与された場合、炎症性サイトカインの産生を抑制する一方で IL-10 の産生を増加させることが報告されており、脳死に伴うサイトカインバランスの崩壊には、血中コルチゾール値の低下が関与する可能性がある。さらに、頭部外傷患者において、脳死に伴う PMNL の活性化と組織障害性との関連性を検討した結果、脳死後、血管内皮細胞障害、呼吸器障害、臓器障害の指標がいずれも増加することから、脳死後 PMNL の活性化と共に組織障害が引き起こされる可能性がある。

E. 結論

脳死に伴い、サイトカインバランスは炎症性方向に崩れ、PMNLは著しいプライミング状態をきたす。脳死によるサイトカインバランスの崩壊には、血中コルチゾール値の低下が一因として考えられる。脳死に伴うPMNLの活性化は、血管内皮細胞障害、臓器障害を起こしうる。中枢神経系は全身性炎症反応の制御に深く関与するといえる。

F. 研究発表

1. 論文発表

脳死に伴うサイトカインバランスと多核白血

球（PMNL）機能の変化。脳死・脳蘇生研究会誌 12, 84-85, 1999

2. 学会発表

脳死に伴うサイトカインバランスと多核白血球（PMNL）機能の変化

第12回脳死・脳蘇生研究会 京都 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

【表 1】

	CRP		WBC		プライミング指数		FMLP 反応性		食食能	
	T 群	NT 群	T 群	NT 群	T 群	NT 群	T 群	NT 群	T 群	NT 群
脳死前	2±1	15±5	9206±1495	9450±1461	80±6	98±10	162±15	177±5	31±2	50±10
脳死後*	27±4	* 25±6	* 12893±1426	13556±2347	* 187±1	* 207±16	* 354±27	* 304±26	* 66±5	63±5

*p<0.05vs 脳死前 ; CRP(mg/dl), WBC(/ μ l), プライミング指数, FMLP 反応性 (蛍光度/cell), 食食能 (%)

【表 2】

	neopterin	TNF- α	IL-6	IL-8	IL-10	cortisol	E-selectin	elastase	RI	MOFscore
脳死前	1.6±0.1	8±4	211±38	109±39	34±7	40±12	40±6	359±128	0.5±0.1	4.2±0.2
脳死後*	11.9±1.9	* 15±5	* 2306±701	* 337±117	* 17±4	* 10±3	* 164±32	* 619±182	* 1.3±0.3	* 6.1±0.2

*p<0.05vs 脳死前 ; neopterin, E-sel(ng/ml), TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10(pg/ml), cortisol(μ g/ml), elastase(μ g/l)

分担研究報告書（脳科学研究事業「中枢神経系外傷に関する研究」）

「脳虚血再灌流障害モデルにおける遺伝子発現—中等度脳低温療法の効果について」

分担研究者 玉谷実智夫 大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座助教授
協力研究者 青木 正之 大阪大学大学院医学研究科博士課程救急医学講座

研究要旨：頭部外傷や虚血性脳疾患に対する中等度脳低温療法の効果は、臨床のみならず、実験モデルにおいても数々の報告がなされているが、その作用機序に関してはほとんど解明されていない。我々は、砂ネズミ虚血モデルにおいて、虚血再灌流後に 34 度の中等度脳低温療法を施行することによってより臨床像に近づけたモデルを作り、神経細胞保護作用を分子レベルで解析した。前年度までに、常温群において低下した発現量が低温群で回復している遺伝子として、Glucose regulated protein78 (GRP78) を同定した。本年度は GRP78 の機能解析を行う目的で、GRP78 遺伝子を組み込んだアデノウイルスをマウスの初代培養神経細胞に感染させて得られた強制発現モデルにおいて、過酸化水素による細胞障害を加えたところ、アデノウイルスを感染させた神経細胞が障害耐性を獲得していることを確認した。この耐性は、感染させたウイルスの量に依存している傾向があった。以上の結果から、脳低温療法による GRP78 の局在の維持が同部位における細胞の変性脱落を抑制し、脳神経細胞保護作用の一端を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

重症頭部外傷や虚血性脳疾患の患者に対する治療としては、脳浮腫とそれに伴う頭蓋内圧亢進を抑える目的で、脱水療法や過換気療法、バルビタール大量投与が行われてきた。近年、全身を冷却することで脳温を 34 度以下に維持する脳低温療法が確立し、従来の治療では脳圧の亢進を抑えることが難しかった患者の生命予後のみならず、機能予後の改善にも効果をあげてきた。しかしながら、脳低温療法の神経細胞保護作用のメカニズムには未知の部分が多い。

砂ネズミの両側頸動脈遮断による

虚血再灌流実験モデルは、海馬の CA1 細胞に遅延型の細胞障害を引き起こすことから、様々な脳神経保護作用因子の効果判定に用いられてきた。我々は、臨床例に即し虚血の後の再灌流開始後に 34 度の脳低温療法を施行するモデルを作成し、脳低温療法で海馬 CA1 細胞の脱落変性が抑制されることを確認した。さらにこのモデルで得られた脳組織の遺伝子発現量の変化を Differential display 法を用いて検討した結果、常温群では発現量が低下しているが、低温群で発現量が回復している遺伝子があることを確認した（平成 9

年度脳科学研究事業)。

これらの遺伝子のうち、GRP78 について、局所における遺伝子発現とタンパクの局在を確認したところ、常温群においては、組織染色において細胞障害を認めた部位に一致して遺伝子の発現量が抑制され、タンパクの局在も低下していた。一方低温群では、遺伝子発現の低下が回復し、タンパクの局在も維持されていることを確認した(平成10年度脳科学研究事業)。本年度はGRP78 タンパクの機能解析を行い、脳低温療法の神経細胞保護作用のメカニズムの解明と、将来的には脳低温療法に代わる、簡便でより有効な治療法への糸口を模索することを目的とした。

B. 研究方法

1) 初代培養神経細胞

胎生18日のラット胎児より海馬部分を採取し、型どおりにプレーティングした。グリア細胞の増殖を抑制して10日ほど継代した。

2) GRP78 遺伝子を組み込んだアデノウイルスの作成

GRP78 遺伝子の全長を組み込んだカセットコスミドを作成し、アデノウイルスとともにラットの神経細胞に感染させて組み替えをおこさせた。感染効率はプラークアッセイで確認し、細胞を処理してGRP78 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを回収した。

3) ストレス耐性の確認

アデノウイルスをラットの神経細胞に感染させて24時間培養した後、

ウェスタンブロット法でタンパク量を比較検討した。さらに過酸化水素による細胞傷害モデルを用い、アデノウイルス感染量を、0、10、30m. o. i. と変えて実験を行った。細胞活性は、培養液中の乳酸脱水素酵素(LDH)量の測定で評価した。

C. 研究結果

1) GRP78 遺伝子強制発現でのストレス耐性

過酸化水素によるストレスを加えない場合、つまりアデノウイルス感染のみでの24時間後の生存率は、いずれの感染量でも94%前後で、アデノウイルスを感染させない場合と比べて有意差はなかった。過酸化水素を加えてストレスを与えた場合の24時間後の生存率は、アデノウイルスを感染させない場合には46%であったのに対して、感染量10m. o. i. では66%と有意に上昇を認めた。感染量を30m. o. i. とした場合、生存率は72%となった。

D. 考察

頭部外傷や虚血性脳疾患の患者に対する脳低温療法は、臨床においてその有効性が報告されている。実験モデルにおいても、脳低温療法による神経細胞保護作用の報告はあるが、ほとんどが虚血中の低温施行実験である。本モデルにおいて、虚血再灌流後に脳低温療法を施行したのは、より臨床例に近いモデルを作成するという点を考慮したものである。この実験モデルを用いて、3時間の脳低温療法施行後の大脳部分での遺

伝子発現量の差を DD 法で検索した。その結果、これまでに、Sham 群で発現しているが常温群では発現量が低下し低温群で回復している遺伝子として、Calmodulin、Cytochrome C oxidase subunit I、GRP78 を同定した。

calmodulin は、カルシウム結合タンパクとして、細胞内の様々なタンパク質の活性化を行っており、その一つに calpastatin がある。虚血再灌流脳において再灌流後早期に活性化されて細胞障害をもたらすタンパクの中にプロテアーゼ活性を持つ calpain があるが、calpastatin は calpain の活性を阻害することが確認されており、我々の実験で、常温群の海馬錐体細胞層で低下した calmodulin 遺伝子の発現が低温群で回復していたことは、calpastatin を介した calpain 活性阻害による神経細胞保護作用の可能性が考えられた。

また Cytochrome C oxidase subunit I はミトコンドリア由来のタンパクで、ミトコンドリア内膜における酸化リン酸化の系に関与している。このタンパクは、フリーラジカルである O^{\cdot} を H^+ と反応させて水を合成することで代謝しており、低温群でこの遺伝子発現が増加することは、虚血再灌流後の細胞障害の原因の一つとされているフリーラジカルの代謝を介して神経細胞保護作用を持つのではないかと考えられた。

今回我々が詳細な検討を加えた

GRP78 は、ストレスタンパクである Heat shock protein 70 (HSP70) のサブファミリーであり、通常は細胞質の小胞体に存在している。その機能については、HSP70 同様に変成タンパクの代謝に関係している他に、IL-6 の細胞外分泌への関与が最近報告されている。我々の実験でも、半定量的 RT-PCR 法による検討で、低温群における IL-6 遺伝子の発現量の増加を確認している。IL-6 のサイトカインとしての作用は、B リンパ球の分化の他にも神経細胞の分化再生に関与しているとの報告や、神経細胞保護作用も確認されている。また、小胞体でのカルシウム放出に関与しており、細胞内カルシウム濃度の調節を行っていると考えられている。最近では、アポトーシスに関連して、酸化ストレスによるアポトーシスを抑制するとの報告がある。これまでの実験で我々は、虚血再灌流後の常温群で、海馬錐体細胞層における GRP78 局在の低下を確認している。この低下は、低温群で回復しており、in situ hybridization において、海馬錐体細胞層での遺伝子発現が、常温群で低下し低温群で回復していること考え合わせると、脳低温療法においては、海馬顆粒細胞層における GRP78 タンパク局在の維持が神経細胞保護作用に関連していると考えられた。今回我々は、GRP78 遺伝子をアデノウイルスに組み込んで神経細胞に感染させることで強制的に細胞内で GRP78 遺伝子を発現させ、細胞内 GRP78 を有意に増加させるモデルを作成した。このモデルを

用いた実験で、過酸化水素による酸化ストレスを加えた際に、GRP78が神経細胞保護作用をもたらすことが確認された。

E. 結語

以前、我々はスナネズミ虚血再灌流モデルを用いた遺伝子検索において得られた遺伝子について様々な検討を加えた結果、脳低温療法による calmodulin や GRP78 の局在の維持が同部位における細胞の変性脱落を抑制し、脳神経細胞保護作用の一端を担っている可能性があることを報告した。さらにその作用機序としては、calmodulin は calpastatin を活性化することによって calpain を不活化することで、また Cytochrome C oxidase subunit I はミトコンドリアにおけるフリーラジカルの代謝を促進することで神経細胞保護作用をもたらしていると考えられた。GRP78 に関しては、アデノウイルスを用いて神経細胞内で遺伝子を強制発現させるモデルを作成した。このモデルを用いて検討を加えた結果 GRP78

が酸化ストレスに対して神経細胞保護作用を持つことが確認された。最近の報告では、GRP78 は細胞内カルシウムの濃度を調節したり、酸化ストレスで誘導される apoptosis を抑制する働きがあるとされている。今回の実験結果とあわせ、脳低温療法においては、GRP78 によるカルシウム濃度の調節と apoptosis 抑制が神経細胞保護作用のメカニズムの一つである可能性が示唆された。

F. 研究発表

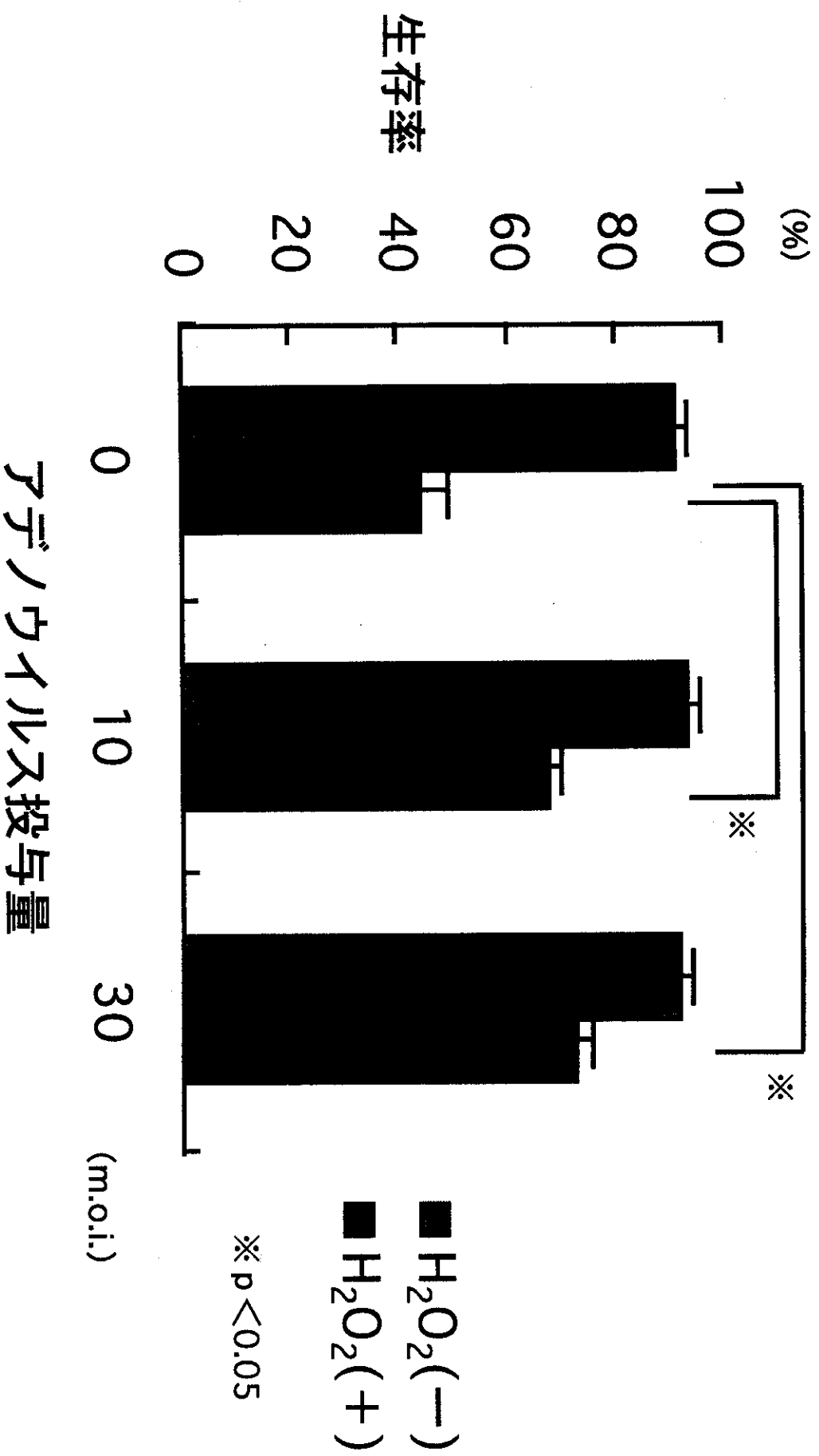
学会発表

青木 正之、田中 裕、杉本 壽
：砂ネズミ前脳虚血モデルを用いた脳低温療法の神経細胞保護作用の検討—Glucose regulated protein 78 の局在解析と遺伝子発現の変化— 第27回日本救急医学会総会、1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

GRP78による神経細胞の傷害耐性



中枢神経外傷に関する研究

分担研究報告書

脳損傷病態の解明と脳保護法の開発

分担研究者	吉峰俊樹	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学教授
研究協力者	甲村英二	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学講師
	中島義和	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学助手
	湯口貴導	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学助手
	埜中正博	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学
	萩原 靖	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学
	藤中俊之	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学助手
	斎藤洋一	大阪労災病院脳神経外科

研究要旨：

脳損傷病態は単に細胞や組織の物理的損傷のみでなく、背景に種々の細胞の活性化、生理活性物質の関与、蛋白、遺伝子発現など活発な細胞反応が存在する。本研究では脳損傷病態をとくに損傷後惹起される各種の細胞応答の面から解明するため、いくつかの基礎的研究を行った。その第一は実験的脳梗塞における N-acetylaspartate の変動、実験脳損傷モデルにおける組織型プラスミノゲンアクチベータ(tPA) mRNA 発現変化の検討などの病態解析である。第二は今後の治療法開発を目指した遺伝子封入りポソームを用いての脳保護遺伝子導入実験である。第三は、臨床患者における DSA による脳血行動態定量法の問題点の検討である。

これらの研究により、脳虚血病態でも局所脳虚血と全脳完全虚血では N-acetylaspartate 代謝産物の変動に相違があること、tPA についても中枢神経損傷モデルと末梢神経損傷モデルで発現メカニズム、時期に相違があり、機能的にも異なる可能性があることが明らかとなった。そして遺伝子導入療法として、HVJ-AVE liposome にアポトーシス抑制作用を有する bcl-2 遺伝子を組み込み虚血前に投与することにより実験的脳梗塞の体積を減ずることが可能となることが明らかとなった。さらには臨床患者での血行動態把握のために血行動態解析用 DSA システムを運用しその問題点を解析した。

A. 研究目的

脳は種々の形で損傷をうけるが、これに引き続く病態は複雑である。これまでの知見では、その病態は単に細胞や組織の形態学的ないし機能的損傷のみでなく、多種類の細胞の活性化、多くの生理活性物質の関与や、細胞内外での物

質移動、各種の蛋白、遺伝子の発現など、むしろ活発な細胞応答が関与することが示されている。前年度に引き続き本研究では脳損傷病態を損傷後に惹起される細胞応答の面から基礎的研究を行うとともに、血流動態評価法、脳保護法開発のための検討を行った。

1. 実験的脳梗塞における N-acetylaspartate の変動について

近年の画像診断技術の進歩は脳組織の微細な形態変化を描出するのみでなく、MRI スペクトロスコピー法などにより組織組成についての情報をも提供し病態解明に寄与しつつある。N-acetylaspartate(NAA)は成熟神経細胞内に豊富に存在し、NAA の組織濃度が生存神経細胞と密接に関係することが示唆されている。MRI スペクトロスコピー法を用いて、各種病態下での神経細胞生存の一つの指標として生体内での NAA 濃度非侵襲的測定が試みられている。NAA は acetyl-CoA と aspartate より合成され、amidohydrolase II により加水分解されて aspartate と acetate を生じる。しかしながら、病的状態下における NAA の代謝、変動についての知見は乏しい。そこで、実験動物の全脳完全虚血モデルならびに局所脳虚血モデルを用いて脳内の NAA ならびに代謝産物の変動を測定解析した。

2. 脳内への bcl-2 遺伝子導入による脳保護療法

外傷、虚血などに対して生体組織は防御修復反応を示すが、この反応は疾患に対応して脳を保護するためには量的あるいは時期的に不十分と考えられる。これまで薬剤その他により防御反応を増強する試みがなされてきたが、本研究では外部より脳保護的に作用する遺伝子を導入し発現させることによる脳損傷の軽減を試みた。

これまでの研究により、HVJ - AVE liposome をベクターとして用いると、中枢神経へ広範囲に遺伝子導入を行えることをラット、ならびに霊長類（サル）において実証した。今年度は、脳保護的に作用すると考えられる遺伝子の導入により脳保護効果が実際に得られるかどうかを検討した。用いた遺伝子はアポトーシス抑制因子である bcl-2 遺伝子で、ラット

脳に導入し局所脳虚血モデルにおける脳保護効果の有無について検討を行った。

3. 実験脳損傷モデルにおける組織型プラスミノーゲンアクチベータ(tPA) mRNA 発現について

tPA は血栓溶解などの用途に臨床的に用いられている薬剤であるが、元来は脳組織内にも存在するセリンプロテアーゼであり、線溶系に関与するのみならず、成長円錐での突起伸展、シナプスの可塑性との関連で注目されている。また、痙攣モデルにおいては immediate early gene の一つとして意義付けられている (Quian 1993)。また、海馬における長期増強 (LTP) では NMDA レセプターを介して tPA mRNA の誘導が生じることが報告されている。しかし一方では興奮性神経毒による神経細胞死を媒介するとも報告され、種々の機能的意義が推測されている。

これまでの研究では、顔面神経損傷後の顔面神経核神経細胞において tPA mRNA が持続的に発現することを明らかとしたが、本研究では中枢神経脳損傷ことに外傷脳における tPA mRNA の変動を検討した。

4. 血行動態解析用 DSA システムの問題点の検討

Digital subtraction angiography (DSA) は脳血管走行を鮮明に描出することができ、また造影剤の流速により血管内血流をある程度評価することができる。しかし脳灌流などの動的解析への応用は、その定量性、客観的評価が不十分であり、これまであまり用いられてこなかった。前年度の研究において、造影剤の通過速度をピクセル単位で捉えることにより血管内血流速度を算出し、擬似カラー化した血管像を表示する新たな DSA 解析 システムを開発した。本法は肉眼では弁別困難な灌流の変化をも迅速に捉えられ、実用的有用性が高い。反面、

理論的境界もあり留意点も多いと考えられたため、今回その理論と実用上の留意点について検討した。

B. 研究方法

1. 実験的脳梗塞における N-acetylaspartate の変動について

完全全脳虚血モデルは全身麻酔下にラットを断頭しラップフィルムで密に覆った後に 37°C で一定時間インキュベートした後に脳を摘出することで作成した。局所脳虚血は全身麻酔下にラット頸動脈より 4-0 ナイロン糸を頭蓋内に挿入することにより中大脳動脈閉塞モデルを作成した。

摘出脳は線条体淡蒼球のレベルで 3mm 厚に薄切、急速凍結し、perchloric acid にて抽出した後に重水に溶解した。Bruker AMX-400 を用いて ^3H 核磁気共鳴スペクトルを得た。

2. 脳内への bcl-2 遺伝子導入による脳保護療法

human *bcl-2* 遺伝子 10 μg を抱合した HVJ-AVE liposome (HVJ-AVE-*bcl2*) を 10 週齢オス SD ラット大槽内へ注入し、48 時間後に左中大脳動脈を olfactory bundle の中枢側でクリップにより閉塞した。閉塞 48 時間後に、37°C の 2% TTC - PBS 溶液 120ml で経心的に灌流し、脳を摘出し冠状断切片を作成して脳梗塞の範囲を計測した。遺伝子を導入せずに中大脳動脈閉塞を行った動物を対照群とした。

3. 実験脳損傷モデルにおける組織型プラスミノーゲンアクチベータ (tPA) mRNA 発現について

雌性ウイスターラット (100g) を用いて包水クロラル麻酔下に左側一次感覚運動野皮質を鋭的に切除した。2、6 時間、1、4、5 日後に屠殺して凍結切片を作成した。ヒト及びマウス tPA に対する cDNA をもとに cRNA プロ

ーブを作成し、in situ hybridization を行い tPA mRNA の発現について検討した。

第二の実験として NMDA レセプター拮抗剤の MK-801 (3mg/kg) を脳損傷 30 分前に腹腔内投与を行い、その効果を検討した。

4. 血行動態解析用 DSA システムの問題点の検討

脳血管撮影の DSA 画像をコンピュータに取り込み、一定の大きさの関心領域を DSA 画像上の主要血管上に設定し、造影剤の時間濃度曲線から見かけの平均通過時間を area over height 法により算出して、その値に応じて血管をカラー表示した。これを perfusion index (PI) と呼んだ。理論的シミュレーションならびに実際の患者での測定を行い評価を行った。

C. 研究結果

1. 実験的脳梗塞における N-acetylaspartate の変動について

^3H 核磁気共鳴スペクトルの解析により N-acetyl aspartate (NAA) は、断頭虚血モデル、局所脳虚血モデルともに 24 時間まで直線的に減少した。NAA の分解産物である acetate は、断頭脳モデルでは 24 時間まで持続的に増加したのに反し、局所脳虚血モデルでは 6 時間後に一時的に増加を示したのみであった。NAA の合成基質でありかつ分解産物でもある aspartate は、断頭モデルでは 6 時間後に軽度上昇した以後の変動は認められず、局所脳虚血モデルでは逆に減少を示した。

2. 脳内への bcl-2 遺伝子導入による脳保護療法

Hvj-*bcl-2* 10 μg を大槽に注入して抗 *bcl-2* 抗体による免疫染色を行うと、分布は脳幹、小脳、上位頸髄に強く、多数の細胞に観察され、脳幹深部の細胞にまで認められた。注入部位よりも

吻側の海馬の神経細胞においても発現が観察された。

中大脳動脈閉塞モデルにおける脳梗塞面積の検討を行うと、*bcl-2* 導入群では対照群に対して皮質では、脳梗塞の体積が約 49.2%に減少していた。基底核でも遺伝子導入群では非導入群に対して梗塞巣が小さい傾向があったが、個体数が少ないため、統計学的な有意差を検討するまでには至らなかった。

3. 実験脳損傷モデルにおける組織型プラスミノーゲンアクチベータ(tPA) mRNA 発現について

大脳皮質損傷モデルでは損傷後 6 時間の時点において、損傷側大脳皮質全体で tPA mRNA の発現増加を認めた。この発現増多は 24 時間後においても強く認められるが、5 日後では、損傷周囲に限局したもの以外は対照群と変化はなかった。

さらに MK-801 の外傷前投与により同側皮質全体での tPA mRNA 発現亢進が抑制されることが確認された。

4. 血行動態解析用 DSA システムの問題点の検討

PI 算出における X 線投影方向の影響をシミュレーションしたところ、これらは PI 値に影響を与えないことが理論的に証明された。粗大血管病変を有さない患者において PI は頸部内頸動脈 1.82 ± 0.27 、同海綿静脈洞部 2.29 ± 0.30 、中大脳動脈起始部 2.55 ± 0.33 と比較的ばらつきの少ない結果が得られた。頸部内頸動脈、錐体部、海綿静脈洞部、内頸動脈終末部、中大脳動脈起始部、前大脳動脈起始部では造影剤の時間濃度曲線は基本的には相似であり、造影剤注入部での bolus injection を入力関数とする単一の入力-応答系を仮定してよいものと考えられた。しかし巨大動脈瘤の末梢側では時間濃度曲線は急激になだらかとなり、PI は急激に延

長した。これは動脈瘤内部の造影剤の停滞により、その前後で入力関数が大きく変化するためであり、動脈瘤末梢側の PI 延長は血流の遅延を必ずしも意味しないと考えられた。本法による脳灌流の正しい評価のためにはまず入力関数のチェックが必要があると考えられた。

D. 考察

1. 実験的脳梗塞における N-acetylaspartate の変動について

断頭モデル、局所脳虚血モデルの両者において生存神経細胞と密接に関係することが示唆されている NAA が時間経過とほぼ直線的に減少することが示された。しかしながら、その加水分解産物である acetate、aspartate については両モデルにおいて差異が認められた。

Acetate については断頭モデルでは時間の経過と共に上昇し、NAA の分解を直接反映しているものと考えられた。局所脳虚血モデルでは 6 時間後に一時的な上昇を認めるのみであり、加水分解により生成された acetate が細胞外液を介して周辺に拡散していることが推測された。Aspartate については acetate 以上に周辺に拡散、あるいは再利用がなされるものと考えられた。

NAA は共通して減少したが、虚血病態により分解産物の量には相違が認められた。臨床現場における MRI スペクトロスコピーの結果においても病態により種々の変動が生じ得るものと推測された。

2. 脳内への *bcl-2* 遺伝子導入による脳保護療法

HVJ-AVE liposome を用いた human *bcl-2* 遺伝子導入により、中枢神経の虚血に対する脳保護作用が発現している可能性が高いと考えられ、遺伝子導入による脳保護療法の開発は可能であると考えられる。今後の検討課題として、

統計学的な有意差検定とともに、さらに方法論的改良による導入効率のさらなる向上と、ターゲティング、遺伝子発現の調節などがあげられる。

3. 実験脳損傷モデルにおける組織型プラスミノーゲンアクチベータ(tPA) mRNA 発現について

MK-801 が tPA mRNA 発現を抑制したことより、この発現は NMDA レセプターの活性化を介するものと考えられた。これまでに本モデルにおける c-fos mRNA の発現を検討し、c-fos は 2 時間後に強く障害側皮質全体で発現し同様に MK-801 で発現抑制が得られることを報告した。この機序として損傷後に生じた spreading depression の存在がその後の c-fos、tPA mRNA 発現を誘導している可能性が示唆された。

皮質損傷モデルでの tPA mRNA の発現は顔面神経損傷モデルでの発現と大きく異なっていた。顔面神経モデルでは損傷後持続的に発現し、また MK-801 は抑制効果を示さず、誘導メカニズムが異なっているものと考えられた。機能的にも、末梢神経モデルでは、tPA の発現は神経突起進展と関係していると考えられたが、中枢神経系ではこのような機能のほかに、神経障害性に作用する可能性も示唆されている。今後は蛋白レベルの変動、抑制因子である PAI の変化などにも注目して検討していく必要がある。

4. 血行動態解析用 DSA システムの問題点の検討

本システムにより形態情報としての血管走行と機能情報としての血流速度を融合して表示することにより、脳循環障害患者の病的血行動態の詳細を把握し、より適切な治療方針立案に役立つものと考えられる。本法は、DSA を用いて脳灌流指標を簡便かつ迅速に算出でき

ることから、血管内治療をはじめとする各種治療の効果判定に有用なモニターとなると考えられる。問題点として、入力関数の変動による影響があるが、これは理論的にかいけつできるものと考えられる。

E. 結論

今回の知見から鑑みても、脳損傷の病態には多種多様の細胞や分子レベルの反応が関与しているものと想像される。また、このような個々の反応は互いに関連しつつ病態の全体像を構成するものと考えられる。今後ともさらに多くの細胞レベル、分子レベルの反応とともにそれらの相互関連を明らかにし、血行動態、画像診断を統合して脳損傷病態の解明に努めるとともに、得られた病態解析結果に基づいて適切な薬剤、遺伝子の導入を行うことにより新たな脳保護法の開発に努めたい。

F. 研究発表

1) 論文発表

Nonaka M, Yoshimine T, Kumura E, Kohmura E, Wakayama A, Hayakawa T: Decrease in N-acetylaspartate without commensurate accumulation of acetate in focal cerebral ischemia in rat. *Neurol Res* 21:771-774, 1999

Hagihara Y, Saitoh Y, Kaneda Y, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Arita N: Brain protection by the transfection of *bcl-2* gene into the entire central nervous system (CNS). *Restor Neurol Neurosci* 13:221-222, 1998

Hagihara Y, Saitoh Y, Kaneda Y, Kohmura E, Yoshimine T: Widespread gene transfection into the central

nervous system of primates. Gene
Ther.(in press)

Kohmura E, Yuguchi T, Sakaki T,
Nonaka M, Fujinaka T, Hayakawa T,
Yoshimine T: Changes in tissue-
plasminogen activator mRNA
expression following cortical ablation
in the rat brain. J Mol Neurosci (in
press)

Hirata M, Yoshimine T, Kato A, Hirabuki
N, Nakamura H, Ito M, Hayakawa T:
Computational imaging of cerebral
perfusion by real time processing of
DSA images. Neurol Res 20:327-332,
1998

厚生科学研究費補助金（脳研究事業）
（分担）研究報告書

中枢神経系損傷におけるプロテアーゼの役割に関する研究

分担研究者 種子田 護 近畿大学医学部脳神経外科教授
協力研究者 片岡 和夫 近畿大学医学部脳神経外科助教授

研究要旨：Protease は脳内で恒常的に発現し、脳損傷後の組織修復、血管新生を担う重要な役割をはたしている。外傷性線条体損傷後黒質では transneuronal degeneration を生じる。この病態には理論上 protease である tPA が関与することが強く示唆されているが、我々は tPA knock-out mice を用いて線条体損傷後の黒質における transneuronal degeneration には tPA は関与していないことを明らかにした。また uPA が外傷急性期に脳浮腫の発生に関与することを明らかにした。その一方、急性期をすぎると microglia/macrophage が uPA receptor を発現し receptor binding uPA が脳損傷後の血管新生に関与することが明らかになった。脳損傷を生じる脳動脈瘤の病態においても macrophage 由来の protease が動脈瘤壁脆弱化に関与しうることを明らかにした。

A. 研究目的

脳内で恒常的に発現している protease が脳病態にどのように関与しているかを解明し、脳損傷の予防とその治療法の開発について検討する。

B. 研究方法

Protease である urokinase type plasminogen activator (uPA), tPA, uPA receptor, uPA inhibitor である PAI-1 の遺伝子を欠損させた knock out mouse および control mouse を使用して脳外傷実験（全身麻酔下）を行いその病態を検討した。Mouse 由来の microglia, macrophage を分離培養しその細胞応答について分子生物学的に検討した。臨床例で脳損傷をきたす脳動脈瘤標本を組織学的

に検討した。

C. 研究結果

PAI-1 knock out mouse では脳浮腫の拡大を認める一方、血管新生の有意な増加を認めた。uPA knock out mouse では脳浮腫の発生は抑制されたが、uPA receptor knock out mouse では脳浮腫は control と差は認めなかった。損傷脳では uPA の mRNA の増加を認めた。Striatopallidum 損傷により黒質では transneuronal degeneration を生じる。tPA knock out mouse に実験的 striatopallidum 損傷を加えても control と同様の黒質変性を認めた。培養 microglia, macrophage では uPA および uPA receptor の強い発現を認めた。破裂脳動脈瘤組織では動脈瘤

壁全体が脆弱化している場合と動脈瘤壁一部が脆弱化している場合があることが明らかになった。また macrophage 由来の protease である cathepsin が破裂動脈瘤壁に有意に認められた。

D. 考察

線溶系 protease である uPA は脳外傷後の二次的脳損傷形成のみならず組織修復に関係する血管新生に関与していることが明らかとなった。急性期では receptor 非結合性の uPA が脳浮腫を増大させる一方、急性期をすぎると uPA は macrophage, microglia などの細胞上で receptor と結合し組織修復のための血管新生に関与する可能性が明らかとなった。

Striatopallidum 損傷後の黒質での transneuronal degeneration は glutamate と tPA の関与が推定されていたが、今回の研究により tPA はこの病態には関与しない可能性が高いことが明らかとなった。

脳動脈破裂のメカニズムとして動脈瘤が急激に新生しその際に破裂する場合と動脈瘤で動脈硬化を生じその病態に基づく macrophage 由来の protease が動脈瘤壁脆弱化に関与していることが本研究により明らかとなった。

E. 結論

脳外傷後の脳浮腫などの二次的脳損傷形成および組織修復のための血管新生に protease が関与していることが明らかとなった。また脳動脈瘤の病態にも macrophage 由来の protease

が影響を与えていることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawabata A, Kuroda R, Nishikawa H, Asai T, Kataoka K, Taneda M: Enhancement of vascular permeability by specific activation of protease-activated receptor-1 in rat hindpaw: a protective role of endogenous and exogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 126:1856-1862, 1999

Kataoka K, Asai T, Sakata I, Taneda M: Remote lesion in the substantia nigra caused by striatopallidal abscess. *Acta Neurochir (Wien)* 141:669-670, 1999

Kinoshita A, Kataoka K, Taneda M: Multilevel vertebral body replacement with a titanium mesh spacer for aneurysmal bone cyst. *Min Inv Neurosurg* 42:156-158, 1999

Kataoka K, Asai T, Taneda M, Ueshima S, Matsuo O, Kuroda R, Carmeliet P, Collen D: Nigral degeneration following striatopallidal lesion in tissue type plasminogen activator deficient mice. *Neurosci Lett* 266:220-222, 1999

Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M: Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Stroke* 30:1396-1401, 1999

Kataoka K, Taneda M, Asai T, Yamada Y: Difference in nature of ruptured and unruptured cerebral aneurysms. Lancet 355:203, 2000

2. 学会発表

Kataoka K, Asai T, Taneda M, Ueshima S, Matsuo O, Kuroda R, Carmeliet P, Collen D: A study of nigral transneuronal degeneration after striato-pallidal lesion in relation to tissue type plasminogen activator. Brain '99, 1999 June, Copenhagen

Kataoka K, Asai T, Taneda M, Ueshima S, Matsuo O, Kuroda R, Carmeliet P, Collen D: Roles of plasminogen activators on vascular responses after brain stab wound. Brain '99, 1999 June, Copenhagen

種子田護：低侵襲外科のめざすもの：内視鏡支援による低侵襲顕微鏡手術。第58回日本脳神経外科学会

総会 1999年10月東京

朝井俊治, 片岡和夫, 中村英剛, 黒田良太郎, 種子田護：低温下でのマクロファージ/ミクログリアの機能変化：低体温療法による二次的脳損傷抑制のメカニズムについて。第58回日本脳神経外科学会総会 1999年10月東京

片岡和夫, 朝井俊治, 山田恭史, 上嶋 繁, 松尾 理, 種子田護：外傷性脳浮腫における plasminogen activator の役割。第58回日本脳神経外科学会 1999年10月東京

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

虚血性神経細胞死とその制御機構に関する研究

研究者 玉谷実智夫

大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座助教授

研究要旨：虚血による神経細胞死においてどのアポトーシス関連蛋白が関与し、いかなるシグナル伝達のネットワークを作っているかは明らかでない。本研究では低酸素刺激による神経細胞死のメカニズムに関し、主にミトコンドリアに存在するアポトーシス関連蛋白である Bcl-2 ファミリー及び小胞体に局在するストレス蛋白 150kDa Oxygen regulated protein (ORP150)に着目し、これらの機能の解析を行った。低酸素により Bcl-2 蛋白量の低下、ミトコンドリアからの cytochrome c release、及び caspase-3 活性化が起こり、神経細胞が死に至るパスウェイが示された。また、アデノウイルスベクターを用い ORP150 を過剰発現させると、低酸素による細胞死が防がれた。更に、ORP150 を過剰発現したトランスジェニックマウスにおいては中大脳動脈閉塞による細胞死と神経所見の改善が認められた。これらの結果は虚血性神経細胞死にミトコンドリアのみならず、小胞体の機能変化が関与することを示唆している。

A. 研究目的

脳血管障害による痴呆は深刻な社会問題となっている。痴呆の原因となる神経細胞死を救う手だては種々考案されているが根本的な解決にはほど遠い。脳組織への血流が遮断されると脳エネルギー代謝は停止し、脳は重篤な機能障害に陥る。さらに血流障害が持続すると脳神経細胞は死滅し、やがて不可逆的な器質的損傷が生じる。このように脳虚血により発生する神経細胞死は脳細胞への血流の途絶という単純な原因で発生するが、神経細胞死に導く要因として興奮性アミノ酸の神経毒性、細胞内カルシウム濃度の上昇、酸素及びグルコースの枯渇、フリーラジカルの産生等が報告され、実際の虚血性神経細胞死においてはこれらの要因が複雑にからみあっていると考えられる。また、従来、脳虚血の際に認められる神経細胞死はネクローシス（壊死）の形態を

とると考えられてきたが、最近では penumbra においてアポトーシスを示す報告があいついでなされている。アポトーシスを介する細胞死は精密に制御された遺伝子の転写を介して起こり、1990年代にはいってその制御に関わる重要な遺伝子が次々とクローニングされ個々の役割が解析されてきた。しかしながら、虚血による神経細胞死においてどのアポトーシス関連蛋白が関与し、いかなるシグナル伝達のネットワークを作っているかは明らかでない。本研究では虚血の主要因子と思われる低酸素に注目し、培養神経細胞を用い低酸素刺激による神経細胞死のメカニズムに関し、主にミトコンドリアに存在するアポトーシス関連蛋白である Bcl-2 ファミリー及び小胞体に局在するストレス蛋白 150kDa Oxygen regulated protein (ORP150)に着目し、これらの機能の解析を行った。