

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

### 虚血性神経細胞死とその制御機構に関する研究

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

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、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。培養アストロサイトにおいて低酸素により ORP150 は強く誘導され細胞は生き延びる一方、神経細胞においては弱い誘導しか認められず細胞は死にいたる。また、ヒト脳梗塞剖検例において脳梗塞発症早期においては虚血中心の神経細胞にごくわずかに、また慢性期においては虚血周囲のアストロサイトに強い ORP150 の誘導が認められた。アデノウイルスベクターを用い ORP150 を過剰発現させると、低酸素による神経細胞死が防がれた。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。さらに、この神経保護機構に Brain-derived neurotrophic factor 等の神経保護因子の細胞外への分泌が関与することを明らかにした。ORP150 の発現を高めることにより虚血性神経障害を防げる可能性がある。

#### A. 研究目的

外因性脳障害後の機能低下に対する効果的な治療法が存在しない理由は外因性脳損傷による細胞死及び機能低下のメカニズムが明らかにされていないからであり、この為治療法の糸口がつかめないのが現状である。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年代にはいつ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。この点において、これまで我々は低酸素負荷時にアストロサイトにおいて発現誘導されるストレスタンパク 150kDa Oxygen regulated protein (ORP150)が低酸素環境下において細胞が生きるために必須であることを示してきた。今年度はこの小胞体ストレスタンパクの虚血性脳障害における役割について解析を行った。

## B. 研究方法と結果

ORP150 は小胞体に存在するシャペロンである。培養アストロサイトは低酸素負荷に対し耐性を示すが、一方培養神経細胞は低酸素により細胞死をきたす。この際、アストロサイトにおいては ORP150 が強く誘導されるが、神経細胞においては誘導が弱い。したがって、低酸素下で誘導される ORP150 が細胞の生存に重要な役割を果たしていると推測される。本年度は主に遺伝子工学的手法を用いて虚血性神経細胞死における 150 kDa Oxygen Regulated Protein 150 (ORP150)の役割を明らかにすることを目的とし、以下の実験結果を得た。

### (I) 脳梗塞患者における ORP150 の発現

脳梗塞で亡くなった患者の剖検脳における ORP150 の発現をみた。発症後早期 (6 時間以内) においては虚血中心の神経細胞に、慢性期 (発症 3 日以降) においては虚血周辺部のアストロサイトに強い発現を認めた。

### (II) 培養細胞における ORP150 の発現機序の解析

ORP150 は培養神経細胞において低酸素環境下において 2 - 4 時間と早期に一時的な比較的弱い誘導が認められた。一方アストロサイトにおい

ては 6 - 12 時間後より持続的な強い発現誘導が認められた。

### (III) ORP150 トランスジェニックマウスにおける梗塞サイズの解析

ORP150 を神経細胞特異的に過剰発現するマウスを PDGF-promoter を利用し、作成した。このマウスは確かに神経細胞において ORP150 の発現が上昇しており、大脳皮質や海馬では野生型に比べ、約 3 倍の発現を認めた。これらのマウスを用いて、中大脳動脈閉塞後の梗塞サイズを TTC 染色により比較した。トランスジェニックマウスにおいて有意な梗塞サイズの減少が認められた。また、この機構に CASPASE-3 活性化の抑制が関与することがわかった。さらに神経学的所見においても有意に改善が認められた。

### (IV) ORP150 が神経保護作用を示すメカニズムの解析

トランスジェニックマウスと野生型マウスのからの初代神経培養細胞を低酸素環境下におき、遠心分離により分画した小胞体分画、細胞質分画、および培養上清中の BDNF の量を ELISA 法で定量した。小胞体低酸素環境下では BDNF をはじめとする神経栄養保護因子は小胞体に蓄積し細胞外へ分泌されない。ところが ORP150 を過剰発現した神経細胞では、細胞外への神経保護因子の分泌の低下は認められなかった。よって、ORP150 の神経保護機構に神経保護因子の小胞体から細胞外への輸送促進が関与することがわかった。

## D. 考察

分化や発生、免疫細胞系にみられるアポトーシスを介した細胞死は、一般にミトコンドリアを起点とし、それに関するさまざまな因子が同定されてい

る。しかしながら、ORP150 の過剰発現が低酸素による細胞死を抑制するという事実は小胞体を起点とする細胞死の存在を示唆する。デング熱は神経細胞を侵すウイルス感染症であるが、培養神経細胞にデング熱ウイルスを感染させることにより未熟なウイルス構成タンパクが小胞体に蓄積し、細胞死を引き起こす可能性が報告されている。また、マクロファージなどの貪食細胞が取り込んだ変性蛋白・脂質などを処理する際に小胞体由来の活性酸素が細胞死を引き起こす可能性が報告されている。このように虚血による神経細胞死において小胞体の機能変化がアポトーシスのトリガーになっている可能性がある。また、BDNF をはじめとする神経栄養因子は細胞外に分泌されて細胞膜上に存在する受容体と結合し神経保護作用を示す。低酸素あるいは虚血時には神経栄養因子は小胞体に蓄積され細胞外に分泌されないが、ORP150 が過剰に存在すると小胞体から細胞外への輸送を促進することにより神経保護作用を示すと考えられる。あるいは虚血時におこって小胞体の機能変化からミトコンドリアへのシグナル伝達を抑制している可能性も考えられる。本研究は神経細胞に的を絞り実験を行ったが、心筋梗塞をはじめとする他の虚血性疾患の治療に役立つかもしれない。

#### E. 結論

以上より、小胞体に局在する ORP150 が虚血耐性にとっての key factor であることがわかった。今後の研究方向として、小胞体とミトコンドリアのクロストーク、特に小胞体ストレスによる細胞死にミトコンドリアの機能変化が如何に関わっているかを明らかにすることが重要と思われる。また、遺伝子治療によって ORP150 の発現

を上昇させておく、或いは ORP150 の発現を誘導させるような薬剤を開発することにより脳梗塞或いは脳血管性痴呆などの虚血性神経細胞死を原因とする疾患の治療となりうる可能性を期待するものである。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A, Mitsuda N, Tsukamoto Y, Taniguchi M, Che YH, Ozawa K, Hori O, Nishimura H, Yamashita A, Okabe M, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S, Tohyama M. (2001) ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat. Med.* 7, 317-323.
2. Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M. (2001) Vascular Endothelial Growth Factor Rescues Hippocampal Neurons from Glutamate-Induced Toxicity: Signal Transduction Cascades. *FASEB J.* in press.
3. Mitsuda N, Ohkubo N, Tamatani M, Lee YD, Taniguchi M, Namikawa K, Kiyama H, Yamaguchi A, Sato N, Ogihara T, Vitek MP, Tohyama M. (2001) Activated CREB regulates neuronal expression of presenilin-1. *J. Biol. Chem.* In press.
4. Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M. (2001) Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J. Biol. Chem.* 276:5256-5264.
5. Ohkubo N, Mitsuda N, Tamatani M, Yamaguchi A, Lee YD, Ogihara T, Vitek MP, Tohyama M, (2001)

Apoprotein E4 stimulates CREB's transcriptional Activity through the ERK pathway. J. Biol. Chem. 276:3034-3053.

6. Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, Yamaguchi A, Tohyama M. (2000) A Pathway of Neuronal Apoptosis Induced by H/R: Roles of NFkB and Bcl-2. J. Neurochem. 75:683-693.

7. Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T. (2000) Induction of aquaporin-4 mRNA after middle cerebral artery occlusion in rat. Brain Res. Mol. Brain. Res. 78:131-137.

8. Bando Y, Ogawa S, Yamauchi A, Kuwabara K, Ozawa K, Tamatani M, Yanagi H, Tohyama M. (2000) The 150 kDa Oxygen-regulated protein

(ORP150) functions as a novel molecular chaperone in the protein transport of the MDCK cells. Am. J. Physiol. 278:C1172-1182

#### 学会発表

1) 2000年解剖学会(横浜)NF kappa B の活性化は低酸素再酸素化後の神経細胞死を抑制する

2) 2000年神経化学学会(金沢)小胞体の機能制御による虚血性神経細胞死の防御

3) 2000年神経化学学会(金沢)VEGFは虚血による神経細胞死を防ぐ

4) 2000年神経化学学会(金沢)Aktの活性化は p53 による細胞死を抑制する

#### 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

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

### 『中枢神経損傷における Microglia 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学 教授  
協力研究者 片岡 和夫 近畿大学医学部脳神経外科学 助教授

研究要旨:脳に損傷が加わった後,時間の経過とともに二次的脳損傷が生じてくる.脳血管の破綻に伴う脳浮腫の増強,遅発性脳出血は二次的脳損傷の代表とも言える. Microglia は急性期から脳損傷部位に集積し,活性化された microglia は『神経細胞を傷害する NO 誘導型合成酵素(iNOS)』および『炎症反応を生じる prostaglandin 誘導型合成酵素(COX-2)や血管基底膜を構成する collagen Type IV を破壊する matrix metalloproteinase (MMP)-9』および『非活性型 MMP-9 を活性化させる urokinase type plasminogen activator (uPA)』を発現し脳損傷に影響を与えうる可能性が明らかとなった。

#### A. 研究目的

Microglia は脳損傷部位に集積するが,その役割については明かではない. Microglia は神経細胞を傷害する nitric oxide (NO)の誘導型合成酵素 iNOS および炎症反応を生じる prostaglandin 誘導型合成酵素 COX-2 や血管,細胞を破綻させる MMP や PA などの protease を発現しうる.特に最近では虚血性脳損傷に microglia 由来の tissue type PA (tPA)が大きな役割を果たしていると報告されている.脳血管の破綻に伴う脳浮腫の増強,遅発性脳出血などの二次的脳損傷に microglia が果たしている役割を解明し,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

Mice モデル(Chloral hydrate 400mg/kg 腹腔内投与全身麻酔下) stab wound 損傷脳において定量的 RT PCR 法を用いて protease mRNA 発現および, Zymography を用いた protease 活性を経時的に検討した. uPA, 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 stab wound を作成し(Chloral hydrate 400mg/kg 腹腔内投与全身麻酔下),その病態を検討した. Mouse 由来の microglia を分離培養しその細胞応答について定量的 RT PCR 法を用いて protease, iNOS, COX-2 mRNA 発現を検討した.

#### C. 研究結果

脳損傷後の微小血管破綻に基づく脳浮

腫の発生(二次的脳損傷)には脳内に恒常的に存在するuPAが大きな役割を果たしていることが明かとなった。通常uPAはuPA receptorに結合しprotease活性を示すが、脳損傷時はreceptor非結合性の遊離uPAが脳内微小血管破綻・二次的脳損傷に関与している可能性が明かとなった(Brain Research 887:189-192,2001)。Chemokine/cytokine刺激により活性化されたmicrogliaはiNOS mRNA, COX-2 mRNAを発現しまた血管壁基底膜を構成するcollagen Type IVを破壊するMMP-9 mRNAを発現する一方、同様にcollagen Type IVを破壊するMMP-2の発現は生じないことが明かとなった。またこれまで脳損傷に関与が疑われているtPAについては活性化microgliaはtPA mRNAの発現増加は認めなかった。

#### 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に関与しうることが明らかとなった。急性期ではreceptor非結合uPAがmicroglia由来のMMP-9と併せて脳浮腫を増大させると考えられる。一方、急性期をすぎるとuPAは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のではないかと推定される。活性化microglia由来のtPAが脳損傷形成への関与が推定されていたが、今回の研究によりtPAは活性化microgliaからの発現は乏しく今後の検討課題となった。

#### E. 結論

外傷性脳損傷後の脳内微小血管の破綻

に伴う脳浮腫の増強、遅発性脳出血などの二次的脳損傷にproteaseであるuPAが関与したmicroglia由来のMMP-9も関与しうることが明かとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Kataoka K, Taneda M, Asai T, Yamada Y: Difference in nature of ruptured and unruptured cerebral aneurysms. Lancet 355: 203, 2000
- Kataoka K, Sumii T, Asai T, Yamada Y, Kuroda R, Tsuzuki T, Kinoshita A, Taneda M: Successful treatment of large malignant tumor involving the skull base by radiosurgery combined with intraarterial chemotherapy and embolization. Minim Invasive Neurosurg 43: 30-32: 2000
- Kataoka K, Asai T, Taneda M, Ueshima S, Matsuo O, Kuroda R, Kawabata A, Carmeliet P: Roles of urokinase type plasminogen activator in a brain stab wound. Brain Research 887: 187-190, 2000

##### 2. 学会発表

- 種子田護:手術顕微鏡の機能拡張オプション. 第9回脳神経外科手術機器学会. 2000年4月 名古屋
- 種子田護:神経内視鏡のinstrumentation. 第29回日本脳卒中外科学会. 2000年4月 東京
- 種子田護:無症候性脳動脈瘤についての最近の論点. 手術手技での留意点. 第20回日本脳神経外科コンgres.

2000年5月 横浜

- ・片岡和夫, 朝井俊治, 種子田護, 岩崎弘充, 松尾理, 黒田良太郎: 外傷性脳損傷における urokinase type plasminogen activator の役割. 第 23 回 日本神経外傷学会 2000年4月 福島
- ・片岡和夫, 種子田護, 朝井俊治, 山田恭史, 中村英剛, 寺本佳史: 脳動脈瘤が破裂にいたるメカニズムについて. 第 59 回日本脳神経外科学会 2000年10月 福岡
- ・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 59 回日本脳神経外科学会 2000年10月 福岡
- ・中村英剛, 片岡和夫, 朝井俊治, 黒田良太郎, 種子田護: 二次的脳損傷におけるミクログリアの役割. 活性化ミクログリアによる matrix metalloproteinase-9 の発現. 第 59 回日本脳神経外科学会 2000年10月 福岡

#### G. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他    | なし |

III 研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shiozaki T, et al.	A multicenter prospective randomized controlled trial of the efficacy of mild hypothermia for severely head injured patients with low intracranial pressure.	J Neurosurg	94	50-54	2001
Tamatani M, et al.	ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death.	Nature Med	7	317-323	2001
Yamaguchi A, et al.	Adt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53	J Biol Chem	276	5256-5264	2001
Ohkubo N, et al.	Apolipoprotein E4 stimulates cAMP response element-binding protein transcriptional activity through the extracellular signal-regulated kinase pathway	J Biol Chem	276	3046-3053	2001
Tamatani M, et al.	A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: role of nuclear factor $\kappa$ B and Bcl-2	J Neurochem	75	683-693	2000
Bando Y, et al.	150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in MDCK cells	Am J Physiol Cell Physiol	278	1172-1182	2000
畑 豊、他	フuzzy イnformation グラフレーションの3次元医用画像処理への応用	Medical Imaging Technology	18	681-687	2000
Kobashi S, et al.	A fuzzy rule-based region growing method for segmenting 3-D dynamic MR images.	Biomed Soft Computing Human Sci	6	85-94	2000
Kataoka K, et al.	Roles of urokinase type plasminogen activator in a brain stab wound.	Brain Res	887	187-190	2000



20000453

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。