

図2 神経細胞における転写因子CREBのグルタミン酸刺激に対する防御作用¹³⁾
 CREプロモーターを介した遺伝子転写を抑制するCREデコイオリゴヌクレオチド (Decoy Oligo) を培養神経細胞に導入した。蛍光標識したオリゴヌクレオチド (Oligo) は神経細胞に取り込まれている (FITC-Oligo)。その他の図は、神経細胞をそのマーカー蛋白質であるMAP2 (microtubule associated protein 2) に対する抗体で免疫染色した像である。コントロール (上段中央) およびDecoy Oligo (上段右側) ではMAP2陽性の神経細胞が多くみられる。グルタミン酸刺激24時間後 (下段) では、MAP2陽性の神経細胞数が減少するが (左)、Decoy Oligoの前処置により神経細胞数の減少が増強されている (中央)。コントロールOligoの前処置は、グルタミン酸刺激後の神経細胞数の減少に影響を与えていない。

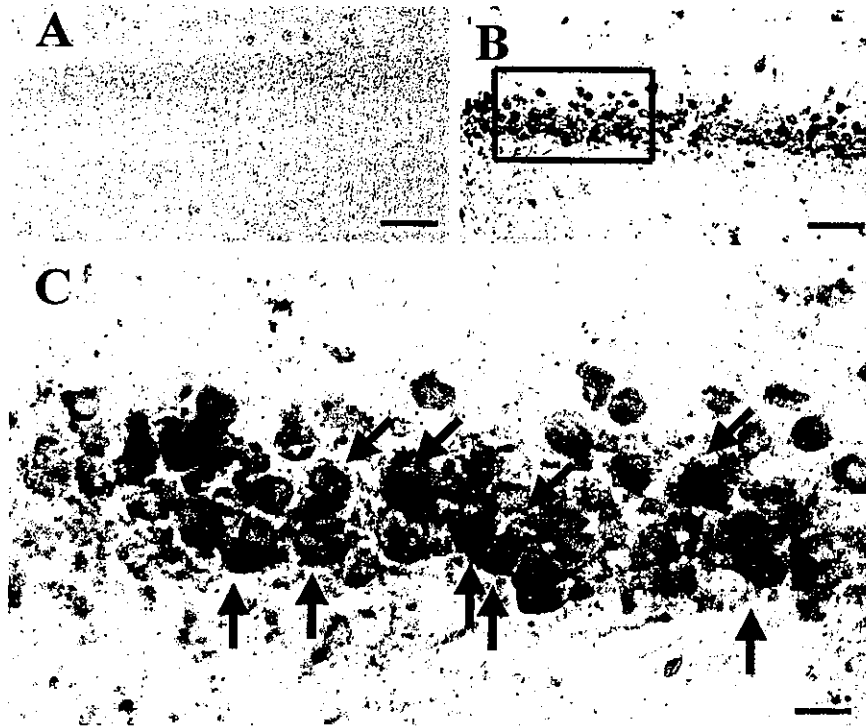


図3 脳虚血・再灌流後の神経細胞におけるCREエレメントを介した遺伝子発現¹³⁾
 CREプロモーターに結合したβ-gal遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでのリン酸化CREBの発現を赤色で、β-gal遺伝子の発現を青色で示す。コントロール脳海馬では、両者とも発現がみられなかった (A) が、脳虚血再灌流後には、大部分の神経細胞がリン酸化CREB陽性 (B,Cでの赤色) となり、そのうち一部はβ-gal遺伝子の発現 (B,Cでの青色) を認める。CはBの一部 (boxで示す) の領域の拡大を示す。

離させることが報告されている¹⁰⁾。アポトーシスを抑制するBcl-2遺伝子ファミリーのなかでは、Bcl-2, Bcl-x, Bcl-wの虚血後の動態が検討されている。Bcl-x遺伝

子には、アポトーシスを抑制するBcl-xLとアポトーシスを促進するBcl-xSが存在するが、脳ではBcl-xLが主要な発現蛋白であり、脳虚血後、虚血に抵抗性を有

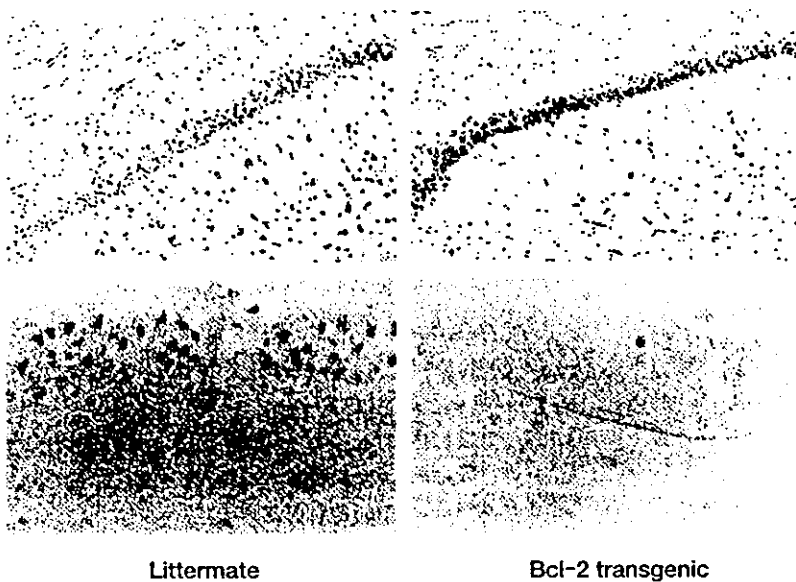


図4 Bcl-2トランスジェニックマウスでの虚血性神経細胞死の軽減¹⁸⁾
一過性前脳虚血(12分間)再灌流後の海馬CA1領域のニッスル染色像を上段に、TUNEL染色像を下段に示す。Littermateでは、海馬CA1領域に核DNA断片化を示すTUNEL反応陽性を伴う神経細胞死を認めるが、Bcl-2過剰発現マウスでは神経細胞死は免れており、TUNEL反応も陰性である。

する海馬CA3神経細胞で発現することが報告されている¹¹⁾。また、Bcl-w蛋白質も、中大脳動脈閉塞後虚血辺縁部の神経細胞で発現することが示されている¹²⁾。これまでの結果をまとめると、虚血侵襲後、神経細胞ではBcl-2, Bcl-x, Bax, Bcl-wなど各種のBcl-2遺伝子ファミリーのmRNAが誘導されるが、蛋白質の発現は、生存する神経細胞ではBcl-2, Bcl-xL, Bcl-wなどアポトーシスを抑制する物質の蛋白質が、また、死滅する神経細胞ではBax蛋白質の発現が先行してみられ、神経細胞死への関与が示唆されている。Bcl-2の転写制御には転写因子CREBが関与していることが明らかになってきている。われわれは、脳虚血やグルタミン酸刺激を受けた神経細胞でCREBのリン酸化がすみやかに起こり、Bcl-2の発現、増加を介して神経細胞保護的にはたらくことを明らかにした(図2, 3)¹³⁾。アポトーシス促進因子のなかでは、BH3-only proteinであるBadは、Aktキナーゼの基質である。BDNFやIGFといった神経栄養因子は、Aktキナーゼを活性化しBadをリン酸化することにより不活性化することが、その作用機構と考えられている。

一方、Bcl-2遺伝子を導入して虚血性脳障害が軽減したとの報告が遺伝子導入法、トランスジェニックマウスを用いた検討から散見される。Bcl-2遺伝子をヘルペスウイルスベクターに組み込んでラット脳内に投与して中大脳動脈閉塞を作成すると、虚血作成前のみならず虚血作成6時間後にBcl-2遺伝子を脳内に投与しても保護効

果が観察されている¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。また、Bcl-2遺伝子を脳神経細胞に過剰発現させたマウスでは、中大脳動脈による脳梗塞サイズ¹⁷⁾、一過性前脳虚血後の海馬神経細胞死¹⁸⁾ともに軽減されること(図4)、Bcl-2遺伝子欠損マウスでは、反対に中大脳動脈閉塞後の脳梗塞サイズが拡大することが報告されている¹⁹⁾。また、女性ホルモンであるエストロゲンの中大脳動脈閉塞モデルにおける脳梗塞サイズ縮小効果は、Bcl-2遺伝子の発現増加を介したものであることが、Bcl-2トランスジェニックマウスを用いた検討から示されている²⁰⁾。

2. カスパーゼ

脳虚血後のミトコンドリアからのシトクロームC遊離、カスパーゼ活性化に関してはここ3~4年の研究で多くのことが明らかになってきた。当初は、interleukin-1- β 変換酵素(ICE)であるカスパーゼ1に関して、その阻害薬であるz-VAD-FMKの脳室内投与、ICEのドミナントネガティブ体を脳に過剰発現させたマウスで、中大脳動脈閉塞後の脳梗塞サイズが縮小することが報告された^{21) 22)}。その後、神経細胞のアポトーシスに関与する主要なカスパーゼと考えられるカスパーゼ3の研究が中心になった。カスパーゼ3はミトコンドリアからのシトクロームCの遊離により活性化されるが、カスパーゼ3活性は一過性前脳虚血、中大脳動脈閉塞再灌流後、上昇することが明らかになってきている²³⁾⁻²⁶⁾。その機序

は、プロカスペルゼが分解されてp20の活性体が出現することによるが、遺伝子レベルでのカスペルゼ3の発現も亢進することが報告されている^{22)~25)}。Benchouらはマウス中大脳動脈閉塞後経時的にカスペルゼ1, 2, 3, 8, 9の活性を測定した結果、カスペルゼ1, 3, 8は30分~1時間後に活性が上昇したのちいったん低下して、その後6~12時間後に再び活性が上昇することを報告した²⁷⁾。虚血中心部の梗塞を発生する領域では、カスペルゼ1, 8を介して虚血早期からカスペルゼ3の活性化が起こり、虚血周囲のペナンプラ領域ではさらにカスペルゼ9がカスペルゼ3の活性化にかかわるものと想定されている。虚血脳において再灌流後早期からミトコンドリア分画から細胞質へのシトクロームCの遊離が起こることがイムノブロットや免疫組織化学的に示されてきている^{10) 28) 29)}。虚血脳でのシトクロームCのミトコンドリアからの遊離に、カルシウム負荷や酸化ストレスの関与が想定されるが、虚血再灌流時に発生するミトコンドリアでのフリーラジカルが関与することが、Mn-SOD欠損マウスを用いた研究結果から示されている²⁸⁾。このように虚血中心部で形態学的には明らかなネクロシスと思われる領域でも、早期にはアポトーシスに関与する経路が作動していることを示している。カスペルゼ3は虚血性神経細胞死のアポトーシスの中心的役割を果たすと考えられ、その関与が阻害薬であるz-DEVD-FMKの脳室内投与により検討されてきた。Z-DEVD-FMKの脳室内投与が、中大脳動脈閉塞モデルでの脳梗塞サイズの縮小や一過性前脳虚血後の神経細胞死の軽減に有効とする報告がある一方^{24)~26) 30)}、z-DEVD-FMKの投与は虚血性神経細胞死の軽減に効果がないとする報告^{29) 30)}もみられ、カスペルゼ3の脳虚血病態への関与は図①のアポトーシスの経路で示されるほど単純なものではなさそうである。

カスペルゼ3の認識する基質には、フォドリンをはじめ各種のものがあるが、DNA修復酵素であるPARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) も基質の一つである。PARPはDNA損傷や酸化ストレスにより活性化され、DNA修復に関与する酵素だが、虚血脳病態における検討では、その阻害薬3-aminobenzamide (3-AB) の脳室内投与およびPARP欠損マウスで、中大脳動脈閉塞再灌流後の脳梗塞サイズが縮小することが報告されている^{31) 32)}。PARPが活性化されると、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) が消費され、その欠乏がエネルギー

不全を引き起こし細胞死を引き起こすと考えられている。

神経細胞以外の細胞系では、アポトーシスを誘導する経路として、注目されているFas-カスペルゼ8の経路については、脳虚血病態での研究は少ない。Fas遺伝子が虚血負荷後、神経細胞、グリアなど各種の細胞で発現することが認められているが³³⁾、FasのリガンドであるCD95リガンド (Fasリガンド)、TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) が中大脳動脈閉塞再灌流24時間以後に主として神経細胞で発現していることが示されている³⁴⁾。免疫抑制薬のタクロリムス (FK506) の脳梗塞縮小効果には、CD95Lの発現増加に対する抑制効果が関与していること、Fasの変異マウスであるlprマウスでは中大脳動脈閉塞再灌流による脳梗塞サイズが縮小することからも、Fasを介したアポトーシス経路の虚血脳障害への関与が支持されている³⁴⁾。脊髄虚血に際する神経細胞死に際しても、Fasを介したカスペルゼ8の活性化が関与することも報告されている³⁵⁾。

FK506と同じ免疫抑制薬のシクロスポリンAも神経細胞のアポトーシスや虚血性神経細胞死を軽減することが報告されているが³⁶⁾、その機序はFK506とは異なり、ミトコンドリアのシクロフィリンDに結合してシトクロームCの遊離を抑制することによると考えられる。

また、虚血脳においてカスペルゼ3によるICADの分解が起こり、CADが活性されること、CADの発現が虚血に脆弱な海馬CA1神経細胞でみられること³⁷⁾から、形態学的にはアポトーシスとはいいいがたいが、生化学的にはアポトーシスに特有な核DNAの断片化に関与する経路が作動していることを示している。

おわりに

虚血侵襲を受けた神経細胞では、細胞死を促進する遺伝子、細胞死を抑制する遺伝子など多くのアポトーシス関連遺伝子の発現、活性が変動することは明らかである。本稿では、そのなかでもアポトーシスの経路で主要と考えられ、かつ脳虚血モデルでの検討も進んでいるBcl-2遺伝子ファミリーとカスペルゼを中心に概説した。虚血侵襲後にみられるアポトーシス経路を修飾することは、血流再開および微小循環障害の改善、フリーラジカルやカルシウム過負荷の制御などとともに、神経細胞を虚血から保護する有力な手段と考えられる。

●文 献●

- 1) Tominaga T *et al* : Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. *Brain Res* 608 : 21-26, 1993
- 2) Okamoto M *et al* : Internucleosomal DNA cleavage involved in ischemia-induced neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun* 196 : 1356-1362, 1993
- 3) Colbourne F *et al* : Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci* 19 : 4200-4210, 1999
- 4) Graham SH *et al* : Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 99-109, 2001
- 5) 辻本賀英：特集 アポトーシスを操る役者たち。次々と登場する新規分子とその役割。細胞工学 18 : 1760-1804, 1999
- 6) Chen J *et al* : bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport* 6 : 394-398, 1995
- 7) Chen J *et al* : Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is upregulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem* 67 : 64-71, 1996
- 8) Krajewski S *et al* : Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 15 : 6364-6376, 1995
- 9) Matsushita K *et al* : Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 83 : 439-448, 1998
- 10) Cao G *et al* : Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia : Implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 321-333, 2001
- 11) Chen J *et al* : Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 2-10, 1997
- 12) Yan C *et al* : Overexpression of the cell death suppressor Bcl-w in ischemic brain : Implications for a neuroprotective role via the mitochondrial pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 : 620-630, 2000.
- 13) Mabuchi T *et al* : Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo. *J Neurosci* 21 : 9204-9213, 2001
- 14) Linnik MD *et al* : Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke* 26 : 1670-1675, 1995
- 15) Lawrence MS *et al* : Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci* 16 : 486-496, 1996
- 16) Lawrence MS *et al* : Herpes simplex viral vectors expressing bcl-2 are neuroprotective when delivered after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 740-744, 1997
- 17) Martinou JC *et al* : Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13 : 1017-1030, 1994
- 18) Kitagawa K *et al* : Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of Bcl-2 in transgenic mice. *Stroke* 29 : 2616-2621, 1998
- 19) Hata R *et al* : Targeted disruption of the bcl-2 gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury. *Metab Brain Dis* 14 : 117-124, 1999
- 20) Alkayed NJ *et al* : Estrogen and Bcl-2 : Gene induction and effect of transgene in experimental stroke. *J Neurosci* 21 : 7543-7550, 2001
- 21) Friedlander RM *et al* : Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 β converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury. *J Exp Med* 185 : 933-940, 1997
- 22) Hara H *et al* : Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 2007-2012, 1997
- 23) Namura S *et al* : Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18 : 3659-3668, 1998
- 24) Chen J *et al* : Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18 : 4914-4928, 1998
- 25) Gillardon F *et al* : Inhibition of caspases prevents cell death of hippocampal CA1 neurons, but not impairment of hippocampal long-term potentiation following global ischemia. *Neuroscience* 93 : 1219-1222, 1999
- 26) Fink K *et al* : Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 : 1071-1076, 1998
- 27) Benchoua A *et al* : Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 21 : 7127-7134, 2001
- 28) Noshita N *et al* : Manganese superoxide dismutase affects cytochrome C release and caspase-9 activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 557-567, 2001
- 29) Zhan RZ *et al* : Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome C from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 529-540, 2001

- 30) Li H *et al* : Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31 : 176-182, 2000
- 31) Eliasson MJ *et al* : Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3 : 1089-1095, 1997
- 32) Endres M *et al* : Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 1143-1151, 1997
- 33) Matsuyama T *et al* : Localization of Fas antigen mRNA induced in postischemic murine forebrain by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 34 : 166-172, 1995
- 34) Martin-Villalba A *et al* : CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19 : 3809-3817, 1999
- 35) Matsushita K *et al* : Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci* 20 : 6879-6887, 2000
- 36) Uchino H *et al* : Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res* 812 : 216-226, 1998
- 37) Cao G *et al* : Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 21 : 4678-4690, 2001

きたがわ・かずお

北川一夫 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学医学部講師
 1958年、大阪生まれ。
 1983年、大阪大学医学部卒業、第一内科入局。1990年、大阪大学医学部附属病院医員（第一内科）。1990～93年、米国コロンビア大学、マウントサイナイ医科大学研究員。1997年、大阪大学第一内科助手。2000年、大阪大学大学院病態情報内科学助手、大阪大学医学部附属病院神経内科・脳卒中科助手。2001年より現職。専門は、脳卒中学、脳循環代謝学。研究テーマは、実験的脳虚血、脳血管障害の臨床的検討。趣味は、読書、旅行、スポーツ鑑賞。

遺伝子治療，再生医学と脳血管病

北川一夫 松本昌泰 堀 正二

KITAGAWA Kazuo, MATSUMOTO Masayasu, HORI Masatsugu
大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学

Key Words

アデノウイルスベクター，神経栄養因子，神経幹（前駆）細胞，神経細胞新生，Musashi1

今日の脳血管障害の内科治療は、血栓溶解療法、抗凝固・血小板療法の導入、改良などにより急速に進展してきている。しかし10年先に臨床応用が期待される治療法となると、ここにとりあげる遺伝子治療、再生医学の応用が第一にあげられる。これらの臨床応用をめざした基礎実験結果は、ここ2、3年のあいだに急速に集積しつつあるが、臨床で成果が期待されるにはまだまだ多くの課題、問題点を残している。本稿では、遺伝子治療、再生医学に関する現時点での知見、とくに脳梗塞を対象とした基礎実験成果についてわれわれの知見を含めつつまとめることとする。

はじめに

脳梗塞に対する遺伝子治療や再生医学を応用した治療の試みは数年前から実験レベルで試みられており、今日では21世紀の脳梗塞に対する画期的な治療手段の開発につながることを期待されている。本稿では、前半で神経保護的にはたらくことが期待される物質を遺伝子導入して脳梗塞モデルを作成した実験結果、後半では脳虚血後に内因性の神経細胞新生の動態をみた研究成果、神経幹細胞あるいは骨髄細胞を用いて神経細胞新生をめざした実験結果についてまとめてみる。

1 遺伝子治療

各種の脳保護作用を有する薬剤が開発されつつある今日、なぜ脳梗塞の治療に遺伝子治療が注目されているかについて私見をのべる。第一に目的とする脳保護物質が細胞内で作用する薬剤の場合、細胞外から蛋白質を投与しても細胞内に入るとはまず期待できない。このような例としてストレス蛋白質、アポトーシス抑制遺伝子(Bcl-2など)、抗酸化酵素(Mn-SODなど)があげられる。第二に目的とする物質が脳内である程度の期間持続して産生される必要がある場合がある。各種のストレスに対して神経保護作用を有する神経栄養因子はこの例に属する。単一回の投与だけであれば蛋白質そのものの投与でも可能だが、数日から数週間持続して投与すると、反復して脳室内または脳実質内に投与したり、カニューレを留置する必要があり感染の危険や患者に負担を強いることとなる。

実際の脳組織への遺伝子導入に用いるベクターには表1¹⁾に示す各種のものが存在するが、実際にはすでに市販され導入効率もよいアデノウイルスベクターが用いられることが多い。脳虚血モデルへの応用としては当初、虚血作成に先立ってベクターを導入し、1～数日後に脳虚血を作成して効果を検討した報告が多い。アポトーシス抑制遺伝子であるBcl-2をヘルペスウイルスベクター

表① 遺伝子導入に用いられるベクターの特徴¹⁾

	HSV	Retrovirus	Adenovirus	AAV	Liposome
導入遺伝子サイズ(Kb)	30	7.5	30	4	制限なし
宿主細胞	神経細胞	増殖細胞	多くの細胞	多くの細胞	多くの細胞
染色体DNAへの組み込み	なし	あり	なし	あり	ほぼなし
遺伝子発現期間	短い	長い	短い	長い	短い
危険性	細胞毒性	変異原性	細胞毒性	少ない	なし

HSV: Herpes simplex virus; AAV: Adeno-associated virus vector

(HSV) を用いてラット脳実質内に投与した6時間後または翌日に中大脳動脈閉塞(MCAO)を作成したLawrenceら²⁾, Linnikら³⁾の報告, 脳虚血後のエネルギー代謝改善を目的にグルコーストランスポーターの遺伝子をHSVを用いてラット線条体に導入し, 6時間後にMCAOを作成したLawrenceらの報告⁴⁾, 虚血耐性現象への関与が想定されている熱ショック蛋白質72 (HSP72) や細胞内のカルシウム濃度の調節への関与が想定されているCalbindin D28Kの遺伝子をHSVを用いてラット線条体に導入して翌日にMCAOを作成したYenariらの報告⁵⁾⁶⁾では, いずれもその有効性が示されている。しかしHSVを用いた遺伝子導入の効率は必ずしも良好とはいえず, また細胞毒性の懸念もあり, 現在ではむしろ後述のアデノウイルスベクター (Adv) がよく用いられている。Betzらのグループは, 炎症性サイトカインIL-1の受容体の拮抗蛋白質であるIL-1 receptor antagonist protein (IL-1ra) の遺伝子をAdvを用いてマウス側脳室に投与して5日後にMCAOを作成し, 梗塞サイズ縮小, 白血球集積の抑制を報告している⁷⁾。しかしAdvを脳室に投与した場合, 脳室上衣細胞, 髄膜細胞, 血管系への遺伝子の取り込みは期待できるが, 脳実質とくに神経細胞への取り込みを期待するには, 脳実質への投与が必要となる。Advを用いてグリア由来神経栄養因子 (GDNF) 遺伝子をラット大脳皮質へ投与したKitagawaらの報告⁸⁾, アポトーシス抑制遺伝子であるneuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), sensitive to apoptosis gene (SAG) の遺伝子をラット海馬, マウス線条体に投与したXuら⁹⁾, Yangら¹⁰⁾の報告でも, 翌日以後にMCAO, または一過性前脳虚血モデルを作成し, これら遺伝子導入の虚血脳保護に関する有効性を報告している。

しかし実際の臨床例で, あらかじめ遺伝子を投与する

ことはできないため, 虚血発生後に遺伝子を投与して, 標的蛋白質が発現されるのか, あるいは虚血脳に対する保護効果があるのかがつぎの焦点となる。Abeら¹¹⁾はAdvを用いてラットMCAO直後, または再灌流直後に大脳皮質へコントロール遺伝子 (β -galactosidase: β -Gal) を投与してその発現をみたところ, MCAOのみの群では2日後から β -Galの発現がみられるのに対し, 再灌流群では7日後に顕著な β -Galの発現を明らかにしている。また, Ooboshiら¹²⁾はラットMCAO90分後に β -Gal遺伝子を組み込んだAdvを虚血中心部, 虚血辺縁部の大脳皮質に投与し, β -Galの発現を1~7日後に観察したところ, 虚血中心部での β -Gal発現は軽微だが, コントロールの40%程度の残存血流が維持されている虚血辺縁部では β -Galの発現が十分みられることを明らかにした。以上の結果は, 虚血発生後に遺伝子導入をおこなっても, 目的蛋白質の発現が期待できることを示している。実際, 虚血発生後にBcl-2遺伝子をHSVを用いて導入したLawrenceらの報告¹⁴⁾, GDNF遺伝子をアデノ関連ウイルスベクターを用いて導入したTsaiらの報告¹³⁾でも, 神経細胞保護効果が示されている。以上の報告を表②にまとめた。

各種のウイルスベクターを用いた遺伝子治療が今後の脳梗塞の治療法として有望なのはいうまでもないが, その反面, 安全性に関する警鐘も鳴らされている。オリゴヌクレオチドを用いたアンチセンス治療は, 核酸の導入という点では低効率ではあるが安全面ではすぐれている。近年, 転写因子と結合してその転写因子の活性化を介した遺伝子発現を抑制するデコイ・オリゴヌクレオチドによる転写制御が試みられている。われわれも, グルタミン酸暴露後の神経細胞の生存維持への転写因子Cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) の関

表② 遺伝子導入を脳虚血モデルに用いた治療成績

報告者	使用した遺伝子	使用したベクター	動物種	投与時期	虚血モデル
Lawrence ²⁾	Bcl-2	HSV	ラット	6時間前	中大脳動脈閉塞モデル
Lawrence ¹⁴⁾	Bcl-2	HSV	ラット	1.5時間後	中大脳動脈閉塞モデル
Linnik ³⁾	Bcl-2	HSV	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Lawrence ⁴⁾	GLT	HSV	ラット	6時間前	中大脳動脈閉塞モデル
Yenari ⁵⁾	HSP72	HSV	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Yenari ⁶⁾	Calbindin D28K	HSV	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Yang ⁷⁾	IL-1ra	Adenovirus	マウス	5日前	中大脳動脈閉塞モデル
Kitagawa ⁸⁾	GDNF	Adenovirus	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Tsai ¹³⁾	GDNF	AAV	ラット	虚血直後	中大脳動脈閉塞モデル
Xu ⁹⁾	NAIP	Adenovirus	ラット	7日前	4血管閉塞モデル
Yang ¹⁰⁾	SAG	Adenovirus	マウス	5日前	中大脳動脈閉塞モデル

GLT: Glucose Transporter; IL-1ra: Interleukin-1 receptor antagonist; GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic factor; NAIP: Neuronal apoptosis inhibitory protein; SAG: sensitive to apoptosis gene
 HSV: Herpes simplex virus; AAV: Adeno-associated virus

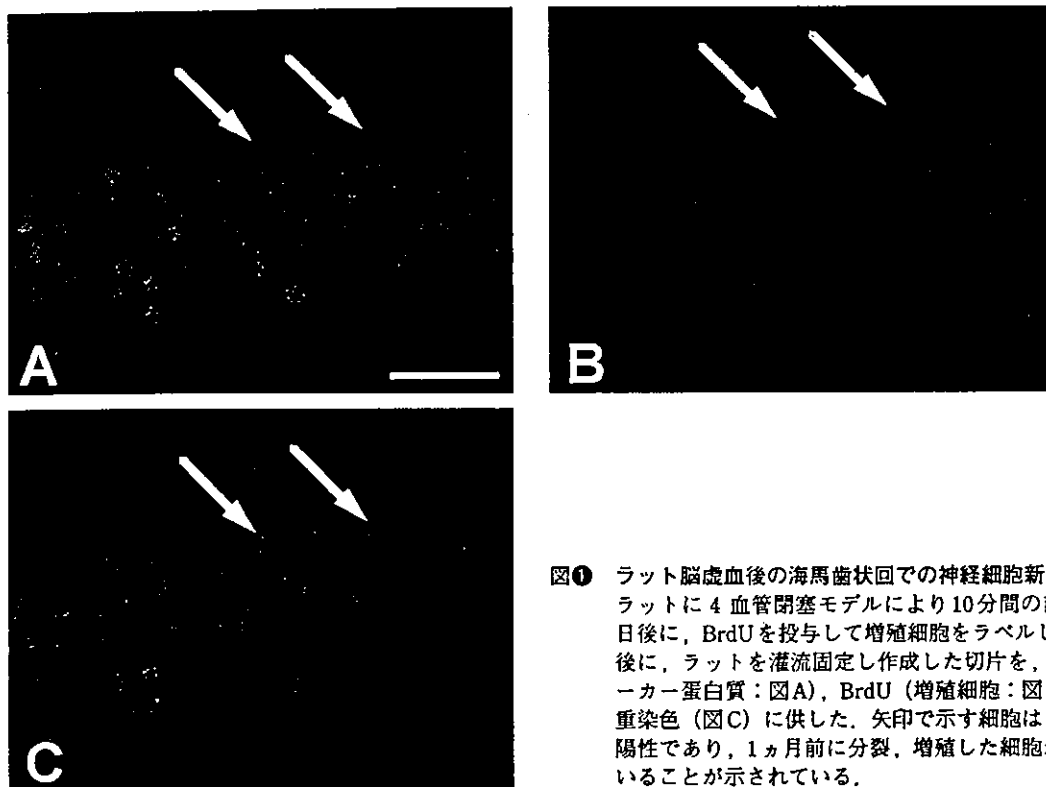
与をデコイ・オリゴヌクレオチドを用いて明らかにしているが¹⁵⁾、デコイ・オリゴヌクレオチドによる転写制御も、安全性の高い遺伝子治療として検討されるべきものと考えられる。

2 再生医学 (神経細胞新生)

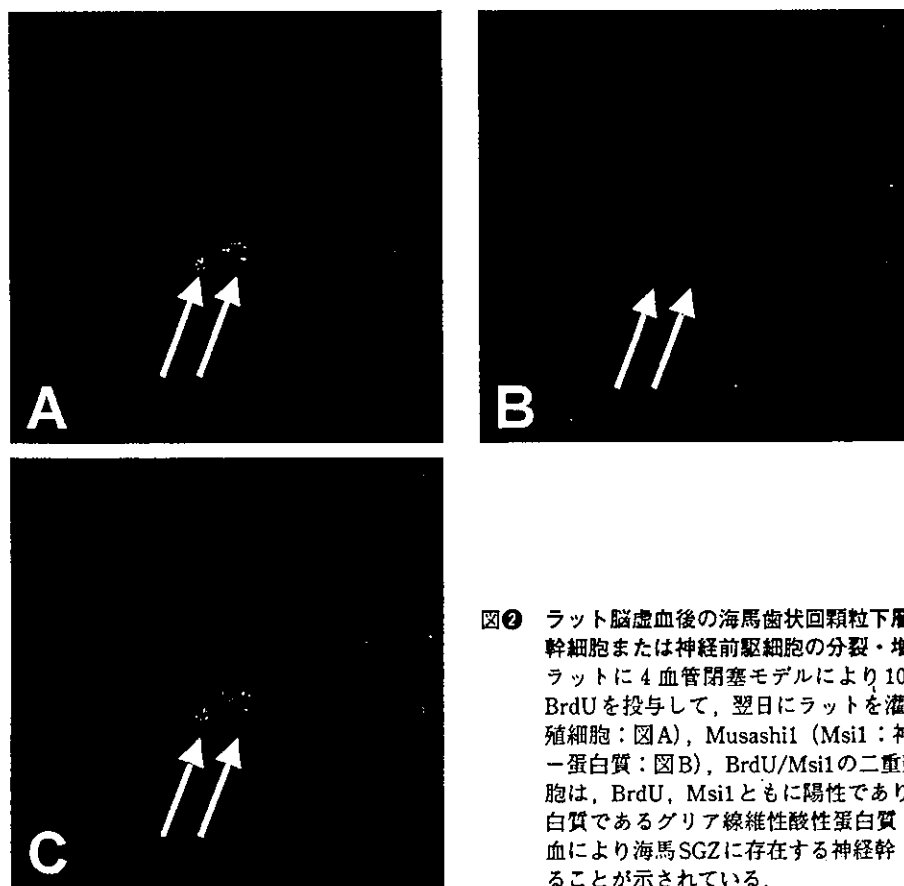
脳梗塞で重篤な神経後遺症を残す主因は、神経細胞が高度に分化した細胞であり一旦脱落、消失すると補完できないことがあげられる。従来、成熟動物脳では神経細胞は再生されないと考えられてきたが、近年、神経幹細胞が成熟動物脳の側脳室周囲と海馬歯状回に存在し、分裂、増殖、神経細胞への分化が起こることが明らかとなり、脳梗塞をはじめ各種神経疾患で脱落した神経細胞を補える可能性がでてきて俄然脚光を浴びようになってきた。脳虚血の領域で神経細胞新生 (Neurogenesis) をはじめて報告したのはSharpらのグループである¹⁶⁾。彼らは砂ネズミの両側総頸動脈5分間閉塞再灌流後に10日後をピークとした海馬歯状回Subgranular zone (SGZ)での核酸チミジンのアナログであるBrdU (Bromodeoxyuridine)を取り込んだ増殖細胞数の増加とその後の神経細胞への分化を示した。そのうち海馬SGZでの神経細胞新生が虚血により促進されることが、ラット¹⁷⁾、マウス¹⁸⁾の一過性前脳虚血モデルを用いた検討から明らかにされた (図①)。しかし、SGZでの増殖細胞の性状に関しては明らかにされ

ていなかった。われわれは、神経幹細胞の選択的マーカーであるMusashi1に対する抗体を用いて検討をおこなったところ、虚血侵襲後SGZで分裂、増殖する細胞の大部分はMusashi1陽性 (図②)でアストロサイトのマーカーであるグリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) 陰性であることから、神経幹細胞または神経前駆細胞の可能性が強いことを明らかにした¹⁹⁾。またSGZで分裂、増殖した細胞はすみやかに幼若神経細胞のマーカーであるPolysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM)を発現することが示されている²⁰⁾。しかし、脳虚血により神経幹 (または前駆) 細胞の分裂、増殖が促進される機構は明らかになっていない。海馬とは離れた領域の虚血侵襲、たとえば中大脳動脈閉塞モデルでも海馬SGZで神経細胞新生が促進されることがラット、マウスで明らかになっており^{21)~23)}、神経幹 (前駆) 細胞への直接的な虚血侵襲ではなく、脳梗塞により二次的に分泌される神経栄養因子、シナプス入力 of 遮断などの関与が想定されている。塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を欠損させた動物では、海馬SGZでの虚血後の神経細胞新生の促進がみられないこと²²⁾や、虚血作成前のグルタミン酸受容体拮抗薬^{24) 25)}やアセチルサリチル酸²⁶⁾の投与により神経細胞新生促進が抑制されることが報告されているが、その解釈は十分にされていない。

一方、海馬SGZ以外で成熟動物脳で神経幹 (前駆) 細胞が存在する側脳室SVZでも虚血侵襲により分裂、



図① ラット脳虚血後の海馬歯状回での神経細胞新生
 ラットに4血管閉塞モデルにより10分間の前脳虚血を負荷した7日後に、BrdUを投与して増殖細胞をラベルした。BrdU投与1ヵ月後に、ラットを灌流固定し作成した切片を、NeuN（神経細胞のマーカー蛋白質：図A）、BrdU（増殖細胞：図B）、NeuN/BrdUの二重染色（図C）に供した。矢印で示す細胞は、BrdU、NeuNともに陽性であり、1ヵ月前に分裂、増殖した細胞が神経細胞に分化していることが示されている。



図② ラット脳虚血後の海馬歯状回顆粒下層 subgranular zone (SGZ) での神経幹細胞または神経前駆細胞の分裂・増殖
 ラットに4血管閉塞モデルにより10分間の前脳虚血を負荷した7日後に、BrdUを投与して、翌日にラットを灌流固定し作成した切片を、BrdU（増殖細胞：図A）、Musashi1 (Msi1：神経幹または前駆細胞の選択的マーカー蛋白質：図B)、BrdU/Msi1の二重染色（図C）に供した。矢印で示す細胞は、BrdU、Msi1ともに陽性であり、またアストロサイトのマーカー蛋白質であるグリア線維性酸性蛋白質（GFAP）陰性であることから、脳虚血により海馬SGZに存在する神経幹（前駆）細胞の分裂・増殖が生じていることが示されている。

増殖が促進されることが報告されている^{22) 27)}。SVZでの分裂、増殖の促進に引きつづいて嗅球での神経細胞新生がみられることが報告されている²⁷⁾。しかし、実際に梗塞の生ずる大脳皮質での神経細胞新生を報告しているのはWesterらのグループで、ラット中大脳動脈閉塞モデルで虚血後BrdUを取り込んだ細胞のうち3%程度が神経細胞のマーカーである微小管結合蛋白質2 (MAP2) を発現していることを報告している^{28) 29)}。しかし、同様な虚血モデルで大脳皮質での神経細胞新生はみられないとする報告もあり²⁷⁾、脳梗塞周辺部での神経細胞新生が生じているのか、また生じているとすればその神経幹(前駆)細胞の由来はどこなのか、など不明な点も多く残されている。

これまでは、内因性の神経細胞新生について触れてきたが、幹細胞医学の進歩はめざましく、すでにパーキンソン病では神経細胞移植の臨床成績が報告されている³⁰⁾。神経幹細胞も成人ヒト脳からの分離に成功されており、倫理的問題はあるものの将来の脳梗塞の治療に用いられる可能性がある。また骨髄細胞は血管、神経細胞、筋肉細胞など他種類の細胞へ分化しうることが明らかになってきている。Choppらのグループは、ラット中大脳動脈閉塞モデルで骨髄細胞を、脳実質への投与³¹⁾、頸動脈からの投与³²⁾、経静脈的な投与³³⁾によりいずれも脳梗塞組織で割合は少ないながらも、神経細胞に分化することを報告している。脳梗塞組織で内因性の神経細胞新生を促進させるとともに、体外から細胞移植することにより、より効率的な神経細胞新生を促すことが期待される。

おわりに

脳梗塞に対する遺伝子治療、再生医学とくに神経細胞新生に関する基礎的な研究成果の概略を述べた。冒頭に述べたように、これらの治療は21世紀の脳梗塞に対する新しい治療法として期待されているものであるが、現時点ではその有効性、危険性、最善のアプローチ法など不明な点が多く残されており、臨床応用に向けて、多くの基礎的な研究成果の蓄積が期待される。

●文 献●

1) Papadopoulos MC *et al* : Principles of gene therapy : potential applications in the treatment of cerebral ischemia. *Br*

- J Neurosurg* 14 : 407-414, 2000
- 2) Lawrence MS *et al* : Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci* 16 : 486-496, 1996
- 3) Linnik MD *et al* : Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke* 26 : 1670-1675, 1995
- 4) Lawrence MS *et al* : Overexpression of the glucose transporter gene with a herpes simplex vector protects striatal neurons against stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 : 181-185, 1996
- 5) Yenari MA *et al* : Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 44 : 584-591, 1998
- 6) Yenari MA *et al* : Calbindin D28K overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 32 : 1028-1035, 2001
- 7) Yang GY *et al* : Attenuation of ischemic inflammatory response in mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 : 840-847, 1998
- 8) Kitagawa H *et al* : Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 : 1336-1344, 1999
- 9) Xu DG *et al* : Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 3 : 997-1004, 1997
- 10) Yang GY *et al* : Attenuation of ischemia-induced mouse brain injury by SAG, a redox-inducible antioxidant protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 722-733, 2001
- 11) Abe K *et al* : In vivo adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemic and reperfused rat brain. *Brain Res* 763 : 191-201, 1997
- 12) Ooboshi H *et al* : Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain. Ischemic flow threshold for transgene expression. *Stroke* 32 : 1043-1047, 2001
- 13) Tsai TH *et al* : Recombinant adeno-associated virus vector expressing glial cell line-derived neurotrophic factor reduces ischemia-induced damage. *Exp Neurol* 166 : 266-275, 2000
- 14) Lawrence MS *et al* : Herpes simplex viral vectors expressing bcl-2 are neuroprotective when delivered after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 740-744, 1997
- 15) Mabuchi T *et al* : Phosphorylation of camp response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo. *J Neurosci*, in press, 2001
- 16) Liu J *et al* : Increased neurogenesis in the dentate gyrus after

- transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18 : 7768-7778, 1998
- 17) Kee NJ *et al* : Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res* 136 : 313-320, 2001
 - 18) Takagi Y *et al* : Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 831 : 283-287, 1999
 - 19) Yagita Y *et al* : Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 32 : 1890-1896, 2001
 - 20) Iwai M *et al* : Induction of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in postischemic gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cell proliferation. *Brain Res* 902 : 288-293, 2001
 - 21) Jin K *et al* : Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 4710-4715, 2001
 - 22) Yoshimura S *et al* : FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 5874-5879, 2001
 - 23) Takasawa K *et al* : Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, in press, 2001
 - 24) Bernabeu R *et al* : NMDA and AMPA/kainite glutamate receptor modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin I in normal and ischemic hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 : 1669-1680, 2000
 - 25) Arvidsson A *et al* : N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14 : 10-18, 2001
 - 26) Kumihashi K *et al* : Acetylsalicylic acid reduces ischemia-induced proliferation of dentate cells in gerbils. *Neuroreport* 12 : 915-917, 2001
 - 27) Zhang RL *et al* : Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105 : 33-41, 2001
 - 28) Gu W *et al* : Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 : 1166-1173, 2000
 - 29) Jiang W *et al* : Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32 : 1201-1207, 2001
 - 30) Freed CR *et al* : Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344 : 710-719, 2001
 - 31) Chen J *et al* : Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 189 : 49-57, 2001
 - 32) Li Y *et al* : Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56 : 1666-1672, 2001
 - 33) Chen J *et al* : Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32 : 1005-1011, 2001

きたがわ・かずお

北川一夫 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学医学部講師

1958年、大阪生まれ。

1983年、大阪大学医学部卒業、第一内科入局。1990年、大阪大学医学部附属病院医員（第一内科）。1990～93年、米国コロンビア大学、マウント医科大学研究員。1997年、大阪大学第一内科助手。2000年、大阪大学大学院病態情報内科学助手、大阪大学医学部附属病院神経内科・脳卒中科助手。2001年より現職。専門は、脳卒中学、脳循環代謝学。研究テーマは、実験的脳虚血、脳血管障害の臨床的検討。趣味は、読書、旅行、スポーツ鑑賞。

Top Journal Up To Date

心血管事故の既往のある高リスク患者での チエノピリジン(チクロピジンおよびクロピドグレル)と アスピリンの再発予防効果の比較

北川一夫, 松本昌泰*

KITAGAWA Kazuo, MATSUMOTO Masayasu

大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学 *広島大学大学院病態探求医科学 (第三内科)

Hankey GJ *et al* : Thienopyridines or aspirin to prevent stroke and other serious vascular events in patients at high risk of vascular disease? A systematic review of the evidence from randomized trials. *Stroke* 31 : 1779-1784, 2000

目的

脳梗塞, 心筋梗塞の既往のある患者でのアスピリンをはじめとした抗血小板薬の使用は, 再発のリスクを約20~30%低下させることが明らかになってきている¹⁾。しかし, アスピリンとその他の抗血小板薬の比較では, 脳梗塞患者を対象としたTASS研究(Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group)²⁾で, アスピリンにくらべてチクロピジンは10%再発のリスクを下げると報告されているが, 1994年に発表されたAntiplatelet Trialists' Collaborationのメタ解析(対象約3,500例)では, チクロピジンのアスピリンに対する有効性の差は有意でなく, またチクロピジン投与例のほうが下痢, 皮膚発疹, 好中球減少症などの副作用が多いため, チクロピジンがアスピリンよりすぐれた薬剤であるかどうか一定の見解がなかった¹⁾。最近になって, チクロピジンと同じチエノピリジン誘導体に属するクロピドグレルが登場し, 心血管事故の既往を有する患者での再発予防にアスピリンより有効かつ安全な薬剤であることがCAPRIE試験(clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events)³⁾により報告されている。本論文では, 一過性脳虚血発作, 脳梗塞, 心筋梗塞, 末梢動脈疾患などに罹患した高リスク患者で, 心血管合併症の再発予防に, アスピリンとチエノピリジン(チクロピジンとクロピドグレル)を比較した4つの二重盲検試験を総括し, 両者の有用性と安全性について比較, 検討する。

方法

心血管合併症の再発予防を目的に, アスピリンとチクロピジンまたはクロピドグレルの二重盲検試験を実施した4つの研究(CAPRIE, Tohgi *et al*, Schoop, TASS)の対象例22,656例での, 心血管事故発症頻度, 副作用の発現頻度について解析した。

結果

4研究全体での対象患者の内訳は, 一過性脳虚血発作および脳梗塞が9,840例, 心筋梗塞が6,302例, 末梢血管疾患が6,514例で, これらの介入試験の平均期間は2年であった。全体での心血管事故の発生頻度は, アスピリン治療群が13.0%(1,354/11,329), チエノピリジン治療群が12.0%(1,476/11,327)で, チエノピリジン群のほうが2年間で1,000例の患者を治療すると11例の心血管事故の発生を防ぐことができ, 心血管事故の発生頻度は9%低下(オッズ比0.91, 95%CI 0.84-0.98)していた。また脳卒中だけの発生頻度も, アスピリン治療群が6.4%(717/11,159), チエノピリジン治療群が5.7%(717/11,157)で, チエノピリジン群のほうが2年間で1,000例の患者を治療すると7例の脳卒中の発生を防ぐことができた(オッズ比0.88, 95%CI 0.79-0.98)。また, 一過性脳虚血発作および脳梗塞9,840例での脳卒中再発頻度は, アスピリン治療群が12.0%, チエノピリジン治療群が10.4%で, チエノピリジン群のほうが2年間で1,000例の患者を治療すると14例の脳卒中の発生を防ぐことができた(オッズ比0.86, 95%CI 0.75-0.97)。

表① 心血管事故の既往のある高リスク患者でのチエノピリジン（チクロピジンおよびクロピドグレル）とアスピリンの平均2年間の再発予防効果の比較

予後	チエノピリジン	アスピリン	オッズ比 (95%信頼区間)
全血管事故 (脳卒中, 心筋梗塞, 末梢動脈疾患)	1,354 / 11,329 (12.0%)	1,476 / 11,327 (13.0%)	0.91 (0.84-0.98)
脳卒中	636 / 11,159 (5.7%)	717 / 11,157 (6.4%)	0.88 (0.79-0.98)
虚血性脳卒中	615 / 11,159 (5.5%)	676 / 11,157 (6.1%)	0.90 (0.81-1.01)
心筋梗塞	380 / 11,159 (4.5%)	431 / 11,157 (4.8%)	0.88 (0.76-1.01)

アスピリン群で副作用の発現頻度では、頭蓋内出血は0.3-0.4%と両群間で差がなかったが、消化管出血、上部消化管症状（消化不良、吐き気など）はアスピリン群で有意に多く、皮膚発疹、下痢はチエノピリジン群で有意に多かった。また好中球減少症は、アスピリン群にくらべ、チクロピジン群でのみ有意に多かった。

考察

チエノピリジン系薬剤は、心血管事故の既往のある患者での二次予防に、アスピリンより軽微ではあるが有意に有効性が高いと判断される。副作用の点からは、チエノピリジンのなかでも、チクロピジンは下痢、皮膚発赤、好中球減少症の副作用の発現頻度がクロピドグレルより高く、クロピドグレルのほうがアスピリンと同程度に安全な望ましい薬剤と考えられる。

コメント

これまで、アスピリンとチエノピリジン系薬剤（チクロピジンとクロピドグレル）の心血管事故再発予防効果、および安全性を二重盲検で検討した臨床大規模試験としては、虚血性脳卒中、心筋梗塞、末梢動脈疾患症例19,185例でアスピリン（325mg/日）とクロピドグレル（75mg/日）を比較したCAPRIEと一過性脳虚血発作および軽症脳梗塞症例3,069例を対象としてアスピリン（1,300mg/日）とチクロピジン（500mg/日）を比較したTASS研究があり、今回の検討でもこの2つの大規模研究の症例をあわせると全体の98%以上を占めている。両薬剤を比較すると、アスピリンにくらべると、クロピドグレルのほうが心血管事故の再発予防に対する有効性がやや高く、安全性はほぼ同等で、薬価が高く、また、チクロピジンの有効性はクロピドグレルと同程度だが皮膚発疹、好中球減少症などの副作用が多い、

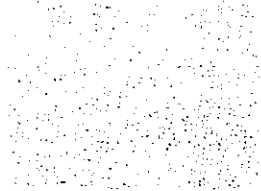
といえる。しかし、わが国では、クロピドグレルは現在チクロピジンと有効性、安全性を比較した二重盲検試験がフェーズⅢで進行中であり、まだ市販されておらず、現時点では心血管事故の危険性の高い患者ではアスピリンよりチクロピジンがよく使われている。また、本論文で取り上げた研究でのアスピリンの使用量は325mg以上と比較的用量が多く、現在わが国で広く使用されている低用量アスピリン82.5mg-100mgでは、再発予防効果は同等で、副作用として消化管出血発生率はより低い、と考えられる。またESPS2（European Stroke Prevention Study 2）研究⁴⁾で脳梗塞の再発予防にアスピリン単独、ジピリダモール単独よりアスピリンとジピリダモールの併用療法が有意に有効性が高いとの報告もあることから、より心血管事故の危険性の高い患者では、チエノピリジンとアスピリンの併用療法の有効性についても検証される必要がある。

文献

- 1) Antiplatelet Trialists' Collaboration : Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy, I : prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 308 : 81-106, 1994
- 2) Hass WK *et al* : A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. *N Engl J Med* 321 : 501-507, 1989
- 3) CAPRIE Steering Committee : A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 348 : 1329-1339, 1996
- 4) Diener HC *et al* : European Stroke Prevention Study 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neurol Sci* 143 : 1-13, 1996

血管性脳損傷の分子生物学

Molecular mechanism of ischemic brain damage



助教授

松本 昌泰

Masayasu MATSUMOTO

講師

北川 一夫

Kazuo KITAGAWA

教授

堀 正二

Masatsugu HORI

大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学

KEY WORDS

脳虚血モデル
微小循環
アポトーシス
ストレス応答
神経細胞新生

SUMMARY

各種の脳虚血モデルの確立や分子生物学の長足の進歩により、脳虚血・再灌流にともなう病的破綻の過程やダイナミックな細胞応答現象の存在が分子レベルで明らかとされてきた。虚血という甚大なストレスに曝された脳領域で、物言わぬ微小循環系細胞や脳実質細胞が繰り広げる細胞の生死を賭けた応答や修復の過程は、まさに壮大なドラマにも例えられよう。その役者やシナリオが本物の目を持った観客の応答によって変えられるように、ハッピーエンドのシナリオになるような時宜を得た新薬にエールを送りたいものである。

はじめに

各種の画像診断法の導入や新たな治療薬の登場により脳卒中の診療は大きく変貌しつつある。なかでも Brain Attack という言葉に象徴される脳卒中超急性期治療時代の到来¹⁾は、実験的脳虚血モデルを用いた基礎的研究によって明らかにされてきた分子病態を見据えた画期的治療法の開発を加速させるものと期待されている。既に我が国では、世界初の脳保護薬としてラジカル消去薬の Edaravone が脳梗塞急性期の治療薬として認可されており、脳虚血基礎病態究明の重要性が再認識されつつある。

本稿では、脳虚血の分子病態の究明に欠かせない病態モデルや脳虚血・再灌流に際しての細胞応答現象について、著者らの研究成果を交えながら概説を試みる。

実験的脳虚血モデル

本来、虚血性脳障害の究明とは、虚血負荷に対する脳組織各コンパートメント(神経細胞、グリア細胞などの細胞種の違いなど)の障害応答や病的破綻の過程を究明することである。したがって、虚血負荷を規定する各種の要因(表1)を認識するとともに、目的に応じた再現性良好な虚血負荷を可能とする脳虚血モデルの確立が前提条件となる²⁾。今日では、既に各種の優れた脳虚血病態モデルが確立されているが、なかでもラットやスナネズミを用いた脳虚血モデルが、蓄積されたデータの多さや虚血作製法が比較的容易で確実であるという各種の利点のため従来より頻用されてきた³⁾。しかしながら、発生工学的手法の進歩とともに、特定の遺伝子のノックアウト(k/o)マウスやトランスジェニック(Tg)マウスが、多様な遺伝子のダイナミックな変化を伴う脳虚血病態の解析に急速に応用されるようになってきている(図1)。そ

図1 脳虚血病態の現症概要
(文献2より引用)

部位	大脳皮質、白質、基底核、脳幹、小脳など
広がり	局所、広範
程度	完全、不完全(軽度~重度)
均等性	均等、不均等
発現様式	急速、緩徐
持続時間	数秒、数分、数時間、数日など
頻度	1回~数回/分~週など
血流再開	あり(急速、緩徐)、なし

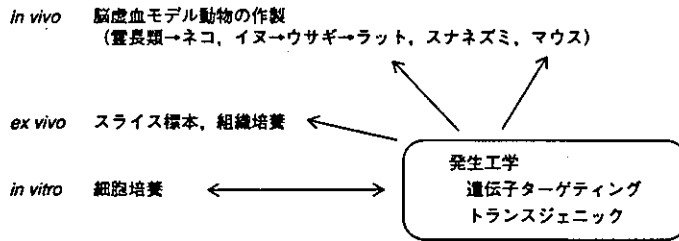


図2 脳虚血病態の概要

既に、*in vitro* から *in vivo* までの目的に応じた各種の脳虚血モデルが確立されているが、発生工学などの遺伝子操作技術の導入により新たな時代を迎えている。

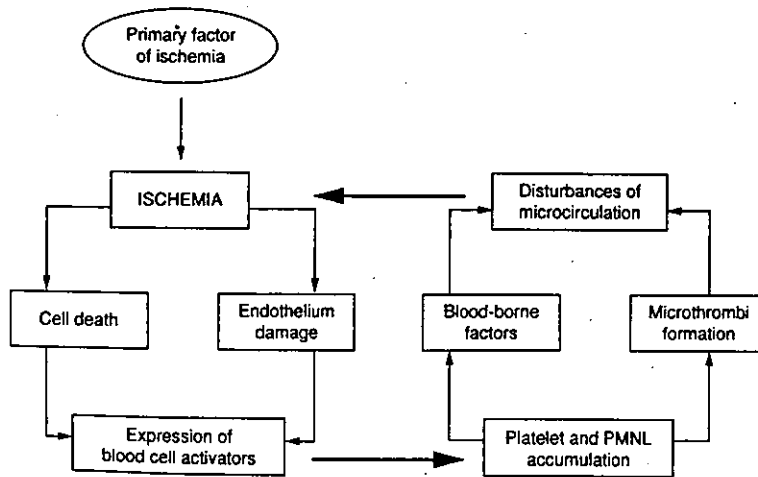


図3 脳虚血後の微小循環障害(二次虚血)の進展における血小板凝集と白血球(PMNL)の集積と役割

虚血により細胞死や内皮細胞の障害が惹起されると、血球系細胞の活性因子が誘導され、その局所に集積した血小板や多核白血球は血栓を形成するのみならずサイトカインなどの各種の液性因子を産生し微小循環を障害し、これは虚血を更に悪化させて悪循環を形成することになる。(文献9より引用)

の意味で、著者らもマウスを用いた再現性良好な脳虚血モデルを独自に確立し、脳虚血病態の究明に応用してきた^{4,7)}。ただし、スナネズミやマウスのような小動物を用いた脳虚血モデルでは、わずかな血行動態変化や脳温の変化、麻酔深度の変化などが脳虚血病変の形成に大きな影響を及ぼすことにくれぐれも注意する必要がある。また、脳虚血・再灌流モデルを用いた研究を実施する際には、そのモデルの利点と欠点を熟知しておくことがますます重要になってきており、各々のモデルで得られた結果を正しく解釈する上でも欠かせない。

脳虚血・再灌流と微小循環障害

いかなる虚血モデルを用いた場合でも、虚血による脳神経組織傷害や応答の多寡を規定する要因のなかで、まず一義的に重要なのが虚血負荷の程度であることは疑いの余地がない。その意味で、虚血侵襲そのものを大きく規定すると考えられる微小循環レベルでの一次及び二次虚血の問題が注目を集めている(図2)^{8,9)}。特に、ペナンプラ領域(虚血中心の周囲で軽度から中等度の虚血に曝されるが、なお可逆性のある領域)では微小循環障害が進行しやすいものと思われるが、血流再開後の本領域における二次的な微小循環障害の有無や程度は脳虚血の治療戦略上も重要である。著者らも、ICAM-1のk/oマウスでは虚血・再灌流後の顕著な梗塞縮小効果が観察されることを明らかとしてきており⁹⁾、内皮細胞における接着因子の発現は、その近傍を流れる血小板や白血球の接着を介して一連の病的類炎症過程を進展させるものと想定される。

上述の微小循環系細胞のみならず、
脳の実質細胞である神経細胞やグリア
細胞も虚血ストレスに対してダイナ

ミックなストレス応答を示すことが
次々と明らかとなっており、特に
ペナンブラ領域では、細胞種に応じた
様々な遺伝子の発現を伴う細胞応答カ
スケードとも言える現象が見られる

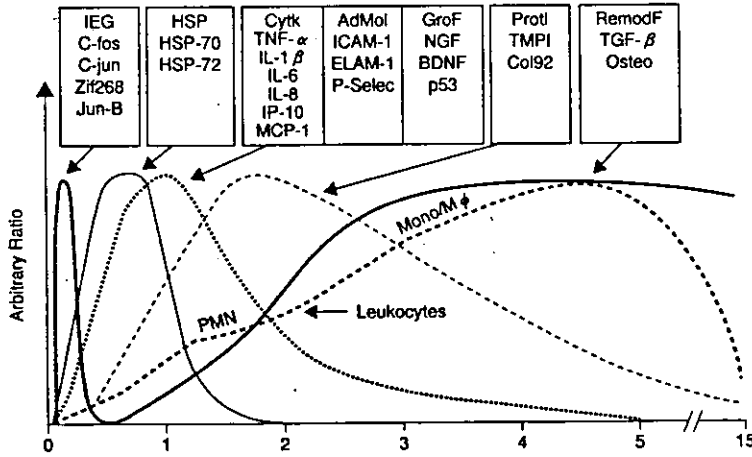
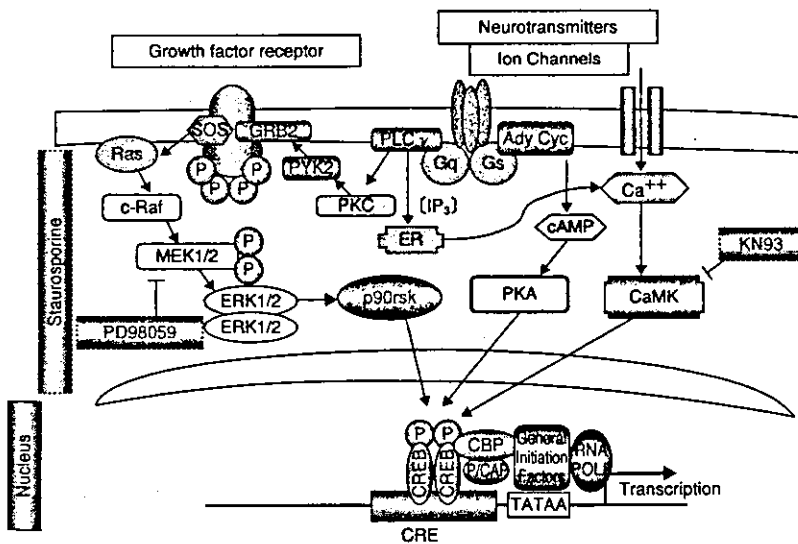


図1. ラットの大脳動脈閉塞後における脳神経細胞遺伝子発現の時間経過

虚血に曝された大脳皮質における遺伝子発現は5波からなり、まず転写因子の発現(第一波)、次にストレスタンパクの発現(第二波)、サイトカイン、ケモカイン、接着因子など炎症メディエーターや神経栄養因子やp53などの癌遺伝子の発現が見られる(第三波)、更に、プロテイナーゼやその内因性阻害物質の遺伝子発現が続き(第四波)、遅れて障害組織の吸収過程などに関わるリモデリングタンパクの発現が見られる(第五波)。また比較のために、白血球の液(早期は多核球、晩期は単球やマクロファージが集積)も示している。(文献10より引用)



()¹⁰。なかでも虚血性神経細胞死
の決定要因として、アポトーシスやス
トレス応答に関わる各種遺伝子が注目
されている。また、組織修復応答や神
経細胞新生の重要性も認識されつつあ
る。

1. プログラム細胞死(programmed cell death: PCD)関連遺伝子

PCD関連遺伝子については数多くの
遺伝子が同定されてきており、これら
遺伝子の虚血性神経細胞死への関与に
ついては既に多くの研究結果が報告さ
れている。なかでもミトコンドリア経
路に関わる bcl-2 ファミリー, Apaf-1
とともにアポソームを形成するチトク
ローム C や活性化される caspase ファ
ミリーは、虚血性神経細胞死において
中心的役割を果たす要因として注目さ
れている¹¹⁾。bcl-2 ファミリーにはア
ポトーシスを抑制する作用を示す
bcl-2, bcl-x-long, bcl-w などに対し
て、アポトーシスを促進する bax, bad,
bid などの存在が知られており、前者
の遺伝子は虚血に対して抵抗性を示す
領域の神経細胞で発現するのに対し、
後者は虚血に対して脆弱な神経細胞で
細胞死に先立って発現することが明ら

スナネズミの一過性前脳虚血再灌流モデルや培
養神経細胞のグルタミン酸負荷モデルに見られ
る早期かつ一過性の CREB リン酸化の亢進には、
図に示すような細胞内情報伝達系が考えられる。
更に、Staurosporine (非特異的タンパクキナーゼ
阻害薬)や KN93 (CaMK阻害薬)では阻害されるが、
PD98059 (ERK阻害薬)によっては阻害されない
など、各種の阻害薬を用いた検討から、グルタ
ミン酸受容体である NMDA 受容体からの Ca イ
オンの細胞内流入→細胞内 Ca イオンの上昇→
CaMK の活性化→CREB リン酸化の亢進の経路が
主であることが強く示唆された。

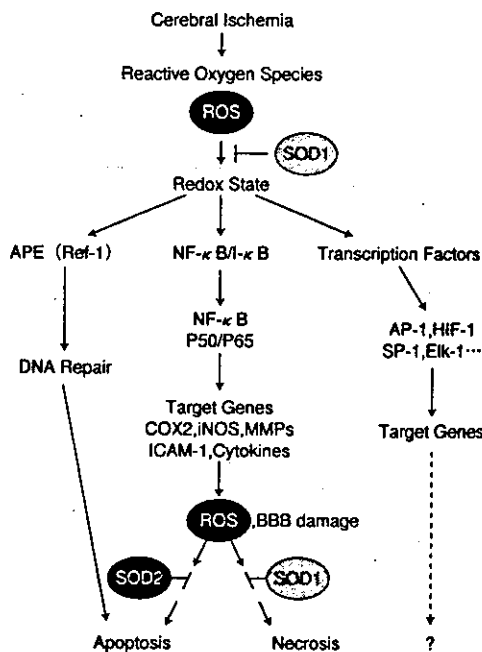
かとなっている¹¹⁾。また、著者らの bcl-2 遺伝子過剰発現マウスを用いた検討では、虚血海馬における選択的神経細胞死に対する保護効果も確認されており⁷⁾、更にその遺伝子発現には CaMK の活性化による cyclic AMP response element binding protein (CREB) のリン酸化の亢進を介した機序¹²⁾ が関わることを強く示唆する結果を得ている¹²⁾。

2. ストレス応答関連遺伝子

一方、アポトーシスに至らない程度の虚血に際しては、「虚血耐性」現象に代表されるストレス応答が発現する¹³⁾¹⁴⁾。この現象の分子メカニズムは明らかになっていないが、細胞レベルでの応答現象としては各種のストレスタンパクの発現が関わる可能性がある¹³⁾¹⁴⁾。著者らはこの点についての究明を押し進めるため、ORP150¹⁵⁾、IRP94¹⁶⁾、HSP40¹⁷⁾などのストレスタンパクを新たに同定し、IRP94 と同様のファミリーを形成する HSP110/105¹⁸⁾ などを含めて、脳虚血病態におけるこれらのストレスタンパク発現の意義について検討してきた。しかしながら、虚血耐性現象は単独の要因のみでは説明できず、虚血・再灌流時に発現される NF- κ B などの酸化ストレス応答系の各種転写因子を介した応答¹⁹⁾が関わる可能性も否定できない²⁰⁾。事実、NF- κ B の活性化が虚血耐性の発現に大きく関わりとの報告²⁰⁾も見られるが、各種転写因子の役割を含め、今後の更なる検証が必要と思われる。

3. 組織修復応答と神経細胞新生

中枢神経系には、グルタミン酸などの神経伝達物質以外に、神経伝達調節物質、オートコイド、NO、CO、神経



虚血再灌流により一旦 ROS が産生されると細胞の酸化還元状態が変化し、構成的に発現している DNA 修復酵素の APE/Raf-1 と DNA 修復機構の活性が低下してアポトーシスが招来される(左側の経路)。また、ROS は、転写因子の NF- κ B の活性化を通じて cyclooxygenase-2 (COX2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinases (MMPs), intercellular adhesion molecules (ICAM-1) や各種サイトカインなどの NF- κ B 結合領域を有する多くの遺伝子を誘導し、更なる ROS 産生や血液・脳関門の破綻によってアポトーシスやネクローシスを招来する(中央の経路)。また、他の転写因子である AP-1 や HIF-1 などを経た未知の経路の存在も虚血病態を修飾するものと考えられている(右側の経路)。(文献19より引用)

- A: MAP2 immunoreactivity was preserved
- B: immunostained with anti-albumin Ab within area A

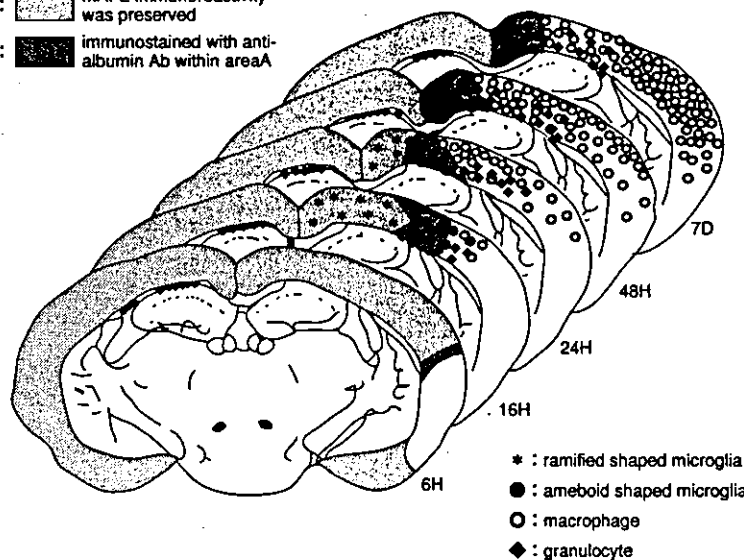


図3 脳卒中の病理的変化を示した脳切片の免疫染色結果。脳内虚血後6時間、16時間、24時間、48時間、7日間の脳切片を、microtubule-associated protein 2 (MAP2) に対する免疫染色に陰性の梗塞病巣が次第に拡大している。一方、MAP2免疫染色陽性の領域(A)は血清アルブミンの漏出した領域(B)で梗塞病巣と境を接している。梗塞病巣の拡大に先立ち、B領域では活性化されたミクログリア(ameboid shaped microglia)が観察され、マクロファージや好中球は主として梗塞病巣の辺縁部に位置しており、特にマクロファージは16~48時間にかけて拡大する梗塞病巣の辺縁部に著しく集積している。(文献21より引用改変)

栄養因子などの細胞間情報伝達を担う各種の微量分子や独自のサイトカインネットワークの存在も知られており、これらが脳虚血病態時における細胞間クロストークを介した応答現象に極めて重要な働きをすることが判明してきている。なかでも IL-1 β , TNF α , IL-6 などの炎症性サイトカインの発現などが脳虚血病態修飾要因として注目を集めている¹⁰⁾。更に、神経細胞の機能発現に重要な役割を担っているアストログリアやオリゴデンドログリアなども、独自の細胞応答を示しながら、ミクログリアなどととも積極的に組織修復や瘢痕形成に関わることが明らかとなっている⁽²¹⁾⁽²²⁾。また、脳虚血に対する応答として神経細胞新生が亢進することも明らかとなっており²³⁾、病態生理上の意義や今後の新たな治療への応用も期待される。

おわりに

虚血によってもたらされる様々な細胞応答現象の発現が明らかになるにつれ、虚血障害が脳にとって極めて甚大なストレスとなることをあらためて思い知らされるとともに、障害を果敢に乗り越えようと応答する生体の巧妙さも浮き彫りになってきている。後者の応答を高め、虚血障害を克服しようと努力する我々自身もまさに広義の応答であると気づく時、苦境に立つ細胞から勇気づけられる思いがするのは著者ばかりではあるまい。一刻も早く英知を集めた恩返しをしたいものである。

文 献

- 1) 松本昌泰, 堀 正二: Brain attack: その概念と意義. カレントセラピー 17: 1496-1501, 1999
- 2) 松本昌泰, 鎌田武信: 脳虚血による神経細胞死. 代謝 28: 911-922, 1991
- 3) 松本昌泰: 脳血管障害の病態モデル. 後藤文男, 高倉公明, 他編, Annual Review 神経 1993. 東京, 中外医学社, 112-118, 1993
- 4) Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, et al: C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. Brain Res 752: 209-218, 1997
- 5) Kitagawa K, Matsumoto M, Yang G, et al: Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. J Cereb Blood Flow Metab 18: 570-579, 1998
- 6) Kitagawa K, Matsumoto M, Mabuchi T, et al: Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 18: 1336-1345, 1998
- 7) Kitagawa K, Matsumoto M, Tsujimoto Y, et al: Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of BCL-2 in transgenic mice. Stroke 29: 2616-2621, 1998
- 8) 松本昌泰: 2. 疾患と微小循環障害 b. 脳疾患. 血栓と循環 4: 186-193, 1996
- 9) Akopov S, Sercombe R, Seylaz J: Cerebrovascular reactivity: Role of endothelium/platelet/leukocyte interactions. Cerebrovasc Brain Metab Rev 8: 11-94, 1996
- 10) Barone FC, Feuerstein GZ: Inflammatory mediators and stroke: New opportunities for novel therapeutics. J Cereb Blood Flow Metab 19: 819, 1999
- 11) Graham SH, Chen J: Programmed cell death in cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 21: 99-109, 2001
- 12) Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, et al: Phosphorylation of CREB in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate *in vitro* and ischemia *in vivo*. J Neurosci (in press)
- 13) 松本昌泰, 堀 正二: 熱ストレス蛋白ファミリーの生物学的機能 - その臨床における意義 -. 日老医誌 35: 521-529, 1998
- 14) 北川一夫, 松本昌泰, 堀 正二: 脳虚血耐性発現のメカニズム. Clinical Neuroscience 17: 520, 1999
- 15) Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, et al: Purification and characterization of a novel stress protein, the 150kDa oxygen regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. J Biol Chem 279: 5025-5032, 1996
- 16) Yagita Y, Kitagawa K, Taguchi A, et al: Molecular cloning of a novel member of HSP110 family gene, ischemia responsive protein 94kDa (irp94), expressed in rat brain after transient forebrain ischemia. J Neurochem 72: 1544-1551, 1999
- 17) Tanaka S, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al: Synergistic induction of HSP40 and HSC70 in the mouse hippocampal neurons after cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbil hippocampus. J Neurosci Res (in press)
- 18) Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al: Induction of the HSP110/105 family in the rat hippocampus in cerebral ischemia and ischemic tolerance. J Cereb Blood Flow Metab 21: 811-819, 2001
- 19) Chan PH: Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab 21: 2-14, 2001
- 20) Blondeau N, Wildmann C, Landunski M, et al: Activation of the nuclear factor-kappa B is a key event in brain tolerance. J Neurosci 21: 4668-4677, 2001
- 21) Mabuchi T, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al: Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. Stroke 31: 1735-1743, 2000
- 22) Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al: Delayed, but marked, expression of apolipoprotein E is involved in tissue clearance after cerebral infarction. J Cereb Blood Flow Metab 21: 1199-1207, 2001
- 23) Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al: Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. Stroke 32: 1890-1896, 2001

心原性脳塞栓症とアテローム血栓性脳梗塞の診断

北川一夫 (大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学講師)
松本昌泰 (広島大学大学院病態探究医科学〈第三内科〉教授)

脳梗塞には、アテローム血栓性脳梗塞、心原性脳塞栓症、ラクナ梗塞の3病型が存在する。かつてはわが国ではラクナ梗塞が最も多かったが、近年では心原性脳塞栓症、アテローム血栓性脳梗塞の頻度が増加している。脳卒中は近年Brain Attackとして、Heart Attackと同様に救急治療を要する疾患と考えられているが、なかでも心原性脳塞栓症、アテローム血栓性脳梗塞では急性期における治療が機能予後や生命予後を左右する疾患として注目されている。

心原性脳塞栓症

脳梗塞の15~20%を占めるが、各病型のなかでは最も重篤な状態を呈しうる疾患であり、一旦発症すると生命は救い得ても機能予後が不良な場合が多い。心腔内に生じた血栓が剥がれ、大動脈に流れ込み脳動脈を急激に栓塞するため、血管支配領域の脳実質に重度の虚血を呈することが多い。臨床的には突発完成型の局所神経脱落症状で発症し、意識障害を伴うこと、運動麻痺や感覚障害に加えて大脳皮質症候(失語、失認、失行など)を呈する重症例が多い。

一方、発症時に広範な半球症状を呈する脳塞栓症例の一部(10%程度)には数時間から数日のうちに急速に症状が改善する例があり、spectacular shrinking deficitと呼ばれ

ている。栓塞した血栓の早期の溶解、再開通によるものと考えられている。しかし血管の再開通が数日後に起こると、出血性梗塞を呈することが多い。塞栓子は大きい場合が多く、頭蓋内内頸動脈、中大脳動脈起始部、脳底動脈といった頭蓋内主幹動脈を急激に閉塞する場合が多い。また塞栓子が小さい場合でも皮質領域の脳梗塞を呈するのが典型的とされる。しかし塞栓子が穿通枝領域に流入して小梗塞を呈した場合は、ラクナ梗塞との鑑別が必要となる。心臓疾患を基礎疾患(表)として有する場合が大部分であり、なかでも半数近くを非弁膜症性心房細動が占めている。

心房細動には持続性以外に発作性のものもあり、両者とも脳塞栓症の危険因子であるため、ホルター心電図による検索が必要となる。非弁膜症性心房細動では、60歳以上の高齢者、高血圧・糖尿病の既往、冠動脈疾患、うっ血性心不全を認める例では特に血栓が生

表 心原性脳塞栓症の基礎心疾患

1. 心房細動	8. 心房粘液腫
2. 洞不全症候群	9. 卵円孔閉存
3. リウマチ性弁膜症	10. 先天性心疾患
4. 心筋梗塞	(右左シフトを
5. 人工弁(特に機械弁)	有する場合)
6. 心筋症	11. 僧帽弁逆脱症
7. 心内膜炎(感染性・非細菌性血栓性)	12. 心房中隔瘤
	13. 心臓ペースメーカー

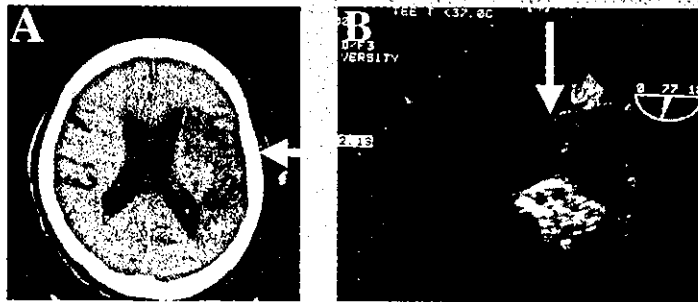


図1
心原性脳塞栓症

心房細動の既往があり右片麻痺、失語で突発発症した74歳の女性症例である。CTでは左前頭葉から頭頂葉にかけて広範な低吸収域(図A中矢印)を認める。経食道心エコーで、左心耳に血栓(図B中矢印)の存在が確認された。

じやすく積極的な抗凝固療法または抗血小板療法が1次予防に用いられることが多い。本病型は高齢者に多いが、若年者でも基礎心疾患を有する場合に発症し、若年者脳梗塞でまず第1に考えるべき疾患でもある。

図1には心房細動の既往があり突発する右片麻痺、失語で発症した症例を示す。また、下肢静脈血栓症などにより発生した血栓が、心臓内の右左シャント(卵円孔開存など)を有する症例において、肺循環を介さず大動脈に流入して脳動脈を栓塞する場合を奇異性脳塞栓症と呼んでいる。心臓内の血栓の検索、心臓内シャントの有無の検索には、通常の経胸壁心エコーでは不十分であり、経食道心エコー検査が必要となる。また本症例では再発の可能性を予測する上で、TAT、D-dimer、fragment F1+2などの凝固線溶系分子マーカーの測定が有用であり、これらの値が高値を示す場合、心腔内血栓を持つものが多く、再発の可能性も高い。

アテローム血栓性脳梗塞

脳を灌流する動脈のアテローム硬化を基盤として発症するので、中高年以上で動脈硬化危険因子である高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙を有し、虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症などの合併も多くみられる。臨床経過としては、一過性脳虚血発作(trans-

sient ischemic attack, TIA)を前駆する場合が多く、急性期には意識障害、皮質症状(失語、失行、失認、半側空間無視)や同名半盲を伴うことが多く、ラクナ梗塞との鑑別上重要である。NINDS分類の3つの発症メカニズム、血栓性、塞栓性、血行力学性の機序が考えられる。しかし個々の症例で必ずしも単一のメカニズムではなく複数の要因が絡んでいると考えられる場合も多い。

脳を灌流する主幹動脈でアテローム硬化の好発部位は、頸動脈分岐部、内頸動脈サイフォン部、中大脳動脈水平部、脳底動脈、椎骨動脈起始部などである事が知られている。頸動脈分岐部の評価には頸動脈超音波検査が非侵襲的かつ有用である。また大動脈弓部も動脈硬化の好発部位であり、その精査には経食道心エコーが必要である。以下に各発症メカニズムと代表的な症例を呈示した上で解説する。

1. 血栓性メカニズム アテローム硬化病変が基盤に存在し、その上に形成された血栓が血管を閉塞することによって末梢の灌流領域に虚血を引き起こす。脳血栓症の特徴とされる症状の段階的増悪は本メカニズムに起因する場合が多い。またBranch atheromatous diseaseは中大脳動脈水平部や脳底動脈など穿通動脈枝が分岐している部位でアテローム硬化がある場合に、穿通動脈開口