

**Table 5** Results of multivariate regression analysis for PS

Variable	$\beta$ (95% CI)	$\beta$ (95% CI)
Age	0.33 (0.232–0.431)	0.34 (0.236–0.437)
Sex	0.12 (0.002–0.231)	0.11 (–0.005–0.23)
Hypertension	0.15 (0.047–0.25)	0.14 (0.039–0.239)
Diabetes	0.12 (0.017–0.223)	0.12 (0.017–0.225)
Hypercholesterolaemia	0.14 (0.008–0.264)	0.14 (0.006–0.263)
Statin use	0.10 (–0.027–0.23)	0.097 (–0.033–0.228)
Cigarette pack-years	0.060 (–0.05–0.171)	0.078 (–0.032–0.19)
History of CYD	0.075 (–0.029–0.18)	0.074 (–0.032–0.179)
cICAM-1	0.10 (0.001–0.205)	
cP-selectin		0.065 (–0.037–0.167)

the contribution of several classical risk factors (i.e. age, sex, hypertension, hypercholesterolaemia and diabetes mellitus), but the relationship for cP-selectin was no longer significant (Table 5).

With regard to the relationship between cICAM-1 or cP-selectin and other indicators, the cICAM-1 level was related to the maximum IMT ( $r=0.22$ ,  $P=0.001$ ) and to the number of plaques ( $r=0.23$ ,  $P=0.001$ ) by univariate analysis. When multivariate analysis was done, the relationship for the number of plaques [ $\beta=0.110$ , confidence interval (CI), 0.007–0.213] and maximum IMT ( $\beta=0.114$ ; CI, 0.01–0.219) remained significant after accounting for the contribution of several classical risk factors. cP-selectin levels were related to maximum IMT ( $r=0.15$ ,  $P=0.008$ ), but not to the number of plaques, on univariate analysis. However, multivariate analysis did not confirm the relationship with maximum IMT.

## DISCUSSION

A previous large-scale study showed that cICAM-1 levels were elevated in patients who had carotid atherosclerosis when compared with controls who had a normal IMT [2], while another study showed a significant relationship between cICAM-1 and the severity of carotid atherosclerosis (based on the mean IMT) [21]. However, studies that used the maximum IMT or maximum stenosis as an indicator have found no relationship with cICAM-1 [17–21]. The present study showed that cICAM-1 levels were related to the number of carotid plaques, maximum IMT and the PS. In contrast, there was no significant difference in cICAM-1 levels between groups that were stratified according to maximum stenosis. Because the present study was cross-sectional, we could not draw conclusions about the direction of association between cICAM-1 levels and carotid atherosclerosis. However, it is well known that adhesion molecules play important roles in the development of atherosclerosis and it has been reported that, unlike other adhesion molecules,

ICAM-1 expression on endothelial cells is selectively upregulated by shear stress [26]. Strong focal expression of ICAM-1 is seen at the carotid bifurcation in patients with no or low-grade stenosis [27], whereas cICAM-1 levels are reported to increase in the early stage of carotid atherosclerosis [2]. Although the source of cICAM-1 in the serum is uncertain, circulating forms of adhesion molecules may be derived from vascular wall components, including endothelial and smooth muscle cells [28]. In the present study, atherosclerotic plaque was defined as an IMT  $\geq 1.1$  mm based on our previous study [22], which is in accordance with those in several other studies [13,29]. Small atherosclerotic plaques in early stages of atherosclerosis comprise smooth muscle cells and macrophage-derived foam cells [30], and the macrophage is transendothelial migrated forms of a leucocyte [31]. The present study showed that cICAM-1 levels are significantly associated not only with maximum IMT but also with the number of plaques and PS. Taken together, these findings indicate that cICAM-1 levels may partly reflect the total extent of arterial involvement by atherosclerosis rather than the rate of carotid stenosis, and that elevation of cICAM-1 levels may precede the development of stenosis, which may help to explain previous inconsistent findings in studies based on different measures of carotid disease.

The strength of the relationship between cICAM-1 and cP-selectin levels in all of our subjects ( $r=0.292$ ,  $P<0.001$ ) was similar to that shown by a population-based study ( $r=0.23$ ,  $P=0.001$ ) [6], and that in patients with stable coronary syndrome ( $r=0.314$ ,  $P=0.007$ ) [32]. It was also similar to that found between cICAM-1 and circulating E-selectin ( $r=0.22$ ,  $P=0.0001$ ) and between cICAM-1 and circulating vascular cell-adhesion molecule-1 ( $r=0.17$ ,  $P=0.0001$ ) in a population-based study [2]. Focal expression of E-selectin in carotid arteries with no or low-grade stenosis is reported to be far weaker than expression of ICAM-1 [27]. Because we found that cP-selectin levels did not increase significantly until the advanced stage of carotid atherosclerosis, P-selectin may also show weak expression in carotid arteries with no or low-grade stenosis, and the increase of cP-selectin during the atherosclerotic process may follow the elevation of cICAM-1. Consistent with these findings, cP-selectin levels were previously reported to be higher in patients with carotid stenosis than in control subjects [20].

P-selectin is an adhesion molecule that supports the adherence of rolling leucocytes to the endothelium, and such adhesion is reinforced by ICAM-1-mediated bonding [31]. P-selectin and ICAM-1 are reported to be key adhesion molecules in the promotion of atherosclerosis [33–36], and expression of P-selectin in the endothelium overlying atherosclerotic plaques in humans is strongly correlated with ICAM-1 expression [37]. However, P-selectin is also expressed on the surface of activated platelets [38], and a previous study has

suggested that an elevated cP-selectin level may be a marker of platelet activation [39]. In fact, the origin of these circulating adhesion molecules has not yet been fully clarified. The increase of cP-selectin in patients with severe carotid atherosclerosis may be partly derived from activated platelets [39], since an experimental study has shown that P-selectin expression may play a role in platelet aggregation stimulated by pulsatile shear stress, which resembles blood flow in stenotic arteries [40]. This is also in accordance with our previous finding of increased platelet accumulation in the carotid arteries of patients with 50% or more stenosis and a PS > 10 [24]. Because carotid plaque growth is accelerated by plaque fissuring and thrombosis when a plaque causes more than 40% diameter reduction [41], the increase of cP-selectin may be a consequence of silent plaque rupture and platelet activation.

Because the present study focused on outpatients with classical risk factors for CVD, the confounding effects of antiplatelet and statin medication should be considered. Statins were used more frequently in patients with more severe carotid atherosclerosis in the present study. Because statins are reported to reduce cP-selectin levels [42], statin use may lead to an underestimation of true levels of cP-selectin in advanced carotid atherosclerosis and bias our findings toward a null result. The population of patients on antiplatelet medication was equal to that of those with a history of CVD. The relationship between cICAM-1 and the severity of carotid atherosclerosis remained significant, even after adjusting for the contribution of classical risk factors including statin use and history of CVD.

In conclusion, we found that cICAM-1 levels increased in parallel with the total extent of carotid arterial affected by atherosclerosis, but that cP-selectin levels did not increase until the stage of advanced carotid atherosclerosis, and both proteins predicted the severity of carotid atherosclerosis independently of classical risk factors. Ultrasonographic examination, which uses several scales to estimate the severity of carotid atherosclerosis, including measurement of carotid plaques, may be used to assess the origin of circulating forms of the other adhesion molecules.

## REFERENCES

- Ross, R. (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126
- Hwang, S.-J., Ballantyne, C. M., Sharrett, A. R. et al. (1997) Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* **96**, 4219–4225
- Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Roitman-Johnson, B., Stampfer, M. J. and Allen, J. (1998) Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* **351**, 88–92
- Blann, A. D., Faragher, E. B. and McCollum, C. N. (1997) Increased soluble P-selectin following myocardial infarction: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Blood Coagulation Fibrinolysis* **8**, 383–390
- Blann, A. D. and McCollum, C. N. (1998) Increased soluble P-selectin in peripheral artery disease: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Thromb. Haemostasis* **80**, 1031–1032
- Ridker, P. M., Buring, J. E. and Rifai, N. (2001) Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* **103**, 491–495
- Ridker, P. M. (2001) Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet* **358**, 946–948
- Bots, M. L., Hofman, A. and Grobbee, D. E. (1994) Common carotid intima-media thickness and lower extremity arterial atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 1885–1891
- Hougaku, H., Matsumoto, M., Handa, N. et al. (1994) Asymptomatic carotid lesions and silent cerebral infarction. *Stroke* **25**, 566–570
- Nagai, Y., Metter, E. J., Earley, C. J. et al. (1998) Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation* **98**, 1504–1509
- Tanaka, H., Nishino, M., Ishida, M., Fukunaga, R. and Sueyoshi, K. (1992) Progression of carotid atherosclerosis in Japanese patients with coronary artery disease. *Stroke* **23**, 946–951
- Bots, M. L., Hoes, A. W., Koudstaal, P. J., Hofman, A. and Grobbee, D. E. (1997) Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* **96**, 1432–1437
- Chambless, L. E., Heiss, G., Folsom, A. R. et al. (1997) Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993. *Am. J. Epidemiol.* **146**, 483–494
- Handa, N., Matsumoto, M., Maeda, H., Hougaku, H. and Kamada, T. (1995) Ischemic stroke events and carotid atherosclerosis. Results of the Osaka Follow-up Study for Ultrasonographic Assessment of Carotid Atherosclerosis (the OSACA Study). *Stroke* **26**, 1781–1786
- O'Leary, D. H., Polak, J. F., Kronmal, R. A., Manolio, T. A., Burke, G. L. and Wolfson, Jr, S. K. (1999) Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N. Engl. J. Med.* **340**, 14–22
- Blann, A. D., Seigneur, M., Boisseau, M. R., Taberner, D. A. and McCollum, C. N. (1996) Soluble P selectin in peripheral vascular disease: relationship to the location and extent of atherosclerotic disease and its risk factors. *Blood Coagulation Fibrinolysis* **7**, 789–793
- Blann, A. D., Farrell, A., Picton, A. and McCollum, C. N. (2000) Relationship between endothelial cell markers and arterial stenosis in peripheral and carotid artery disease. *Thromb. Res.* **97**, 209–216
- DeGaba, T. J., Sirén, A.-L., Penix, L. et al. (1998) Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* **29**, 1405–1410
- Fassbender, K., Bertsch, T., Mielke, O., Muhlhauser, F. and Hennerici, M. (1999) Adhesion molecules in cerebrovascular diseases. Evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large- and small-vessel disease. *Stroke* **30**, 1647–1650
- Frijns, C. J., Kappelle, L. J., van Gijn, J., Nieuwenhuis, H. K., Sixma, J. J. and Fijnheer, R. (1997) Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* **28**, 2214–2218
- Rohde, L. E., Lee, R. T., Rivero, J. et al. (1998) Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1765–1770

- 22 Handa, N., Matsumoto, M., Maeda, H. et al. (1990) Ultrasonic evaluation of early carotid atherosclerosis. *Stroke* **21**, 1567–1572
- 23 Hashimoto, H., Kitagawa, K., Hougaku, H. et al. (2001) C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation* **104**, 63–67
- 24 Moriwaki, H., Matsumoto, M., Handa, N. et al. (1995) Functional and anatomic evaluation of carotid atherothrombosis. A combined study of indium 111 platelet scintigraphy and B-mode ultrasonography. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 2234–2240
- 25 Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., Mannori, G. and Ceconi, O. (1994) Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu. Rev. Med.* **45**, 361–378
- 26 Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W. J., Dewey, C. F. and Gimbrone, M. A. (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **94**, 885–891
- 27 Endres, M., Laufs, U., Merz, H. and Kaps, M. (1997) Focal expression of intercellular adhesion molecule-1 in the human carotid bifurcation. *Stroke* **28**, 77–82
- 28 Leeuwenberg, J. F., Smeets, E. F., Neeffjes, J. J. et al. (1992) E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells *in vitro*. *Immunology* **77**, 543–549
- 29 Bots, M. L., Hofman, A. and Grobbee, D. E. (1997) Increased common carotid intima-media thickness. Adaptive response or a reflection of atherosclerosis? Findings from the Rotterdam Study. *Stroke* **28**, 2442–2447
- 30 Fuster, V. (1997) Present concepts of coronary atherosclerosis-thrombosis, therapeutic implications and perspectives. *Arch. Mal Coeur Vaiss* **90**, 41–47
- 31 Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell (Cambridge, Mass.)* **76**, 301–314
- 32 Parker, III, C., Vita, J. A. and Freedman, J. E. (2001) Soluble adhesion molecules and unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis* **156**, 417–424
- 33 Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L. and Beaudet, A. L. (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**, 189–194
- 34 Dong, Z. M., Brown, A. A. and Wagner, D. D. (2000) Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* **101**, 2290–2295
- 35 Johnson, R. C., Chapman, S. M., Dong, Z. M. et al. (1997) Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J. Clin. Invest.* **99**, 1037–1043
- 36 Nageh, M. F., Sandberg, E. T., Marotti, K. R. et al. (1997) Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1517–1520
- 37 Johnson-Tidey, R. R., McGregor, J. L., Taylor, P. R. and Poston, R. N. (1994) Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Co-expression with intercellular adhesion molecule-1. *Am. J. Pathol.* **144**, 952–961
- 38 Wu, K. K. (1996) Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *J. Intern. Med.* **239**, 17–34
- 39 Blann, A. D. and Lip, G. Y. (1997) Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* **128**, 135–138
- 40 Merten, M., Chow, T., Hellums, J. D. and Thiagarajan, P. (2000) A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation* **102**, 2045–2050
- 41 Kicichl, S. and Willeit, J. (1999) The natural course of atherosclerosis. Part I: incidence and progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1484–1490
- 42 Murphy, R. T., Foley, J. B., Mulvihill, N., Crean, P. and Walsh, M. J. (2001) Impact of pre-existing statin use on adhesion molecule expression in patients presenting with acute coronary syndromes. *Am. J. Cardiol.* **87**, 446–448

Received 15 October 2002/16 December 2002; accepted 6 February 2003  
 Published as Immediate Publication 6 February 2003, DOI 10.1042/CS20020290

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①<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>

	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<sup>2)</sup>, Linnikら<sup>3)</sup>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<sup>4)</sup>, 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<sup>5) 6)</sup>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<sup>7)</sup>。しかしAdvを脳室に投与した場合, 脳室上皮細胞, 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<sup>8)</sup>, 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<sup>9)</sup>, Yangら<sup>10)</sup>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<sup>11)</sup>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 ( $\beta$ -galactosidase:  $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -Galの発現を明らかにしている。また, Ooboshiら<sup>12)</sup>はラットMCAO90分後に $\beta$ -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,  $\beta$ -Galの発現を1~7日後に観察したところ, 虚血中心部での $\beta$ -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 $\beta$ -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<sup>14)</sup>, 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<sup>13)</sup>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 <sup>2)</sup>	Bcl-2	HSV	ラット	6時間前	中大脳動脈閉塞モデル
Lawrence <sup>14)</sup>	Bcl-2	HSV	ラット	1.5時間後	中大脳動脈閉塞モデル
Linnik <sup>3)</sup>	Bcl-2	HSV	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Lawrence <sup>4)</sup>	GLT	HSV	ラット	6時間前	中大脳動脈閉塞モデル
Yenari <sup>5)</sup>	HSP72	HSV	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Yenari <sup>6)</sup>	Calbindin D28K	HSV	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Yang <sup>7)</sup>	IL-1ra	Adenovirus	マウス	5日前	中大脳動脈閉塞モデル
Kitagawa <sup>8)</sup>	GDNF	Adenovirus	ラット	1日前	中大脳動脈閉塞モデル
Tsai <sup>13)</sup>	GDNF	AAV	ラット	虚血直後	中大脳動脈閉塞モデル
Xu <sup>9)</sup>	NAIP	Adenovirus	ラット	7日前	4血管閉塞モデル
Yang <sup>10)</sup>	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<sup>15)</sup>, 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, 消失すると補充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<sup>16)</sup>。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<sup>17)</sup>, マウス<sup>18)</sup>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<sup>19)</sup>。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<sup>20)</sup>。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<sup>21) - 23)</sup>, 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<sup>22)</sup>や, 虚血作成前のグルタミン酸受容体拮抗薬<sup>24) 25)</sup>やアセチルサリチル酸<sup>26)</sup>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,

増殖が促進されることが報告されている<sup>22) 27)</sup>。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<sup>27)</sup>。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<sup>28) 29)</sup>。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<sup>27)</sup>、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<sup>30)</sup>。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<sup>31)</sup>、頸動脈からの投与<sup>32)</sup>、経静脈的な投与<sup>33)</sup>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 NAIIP 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

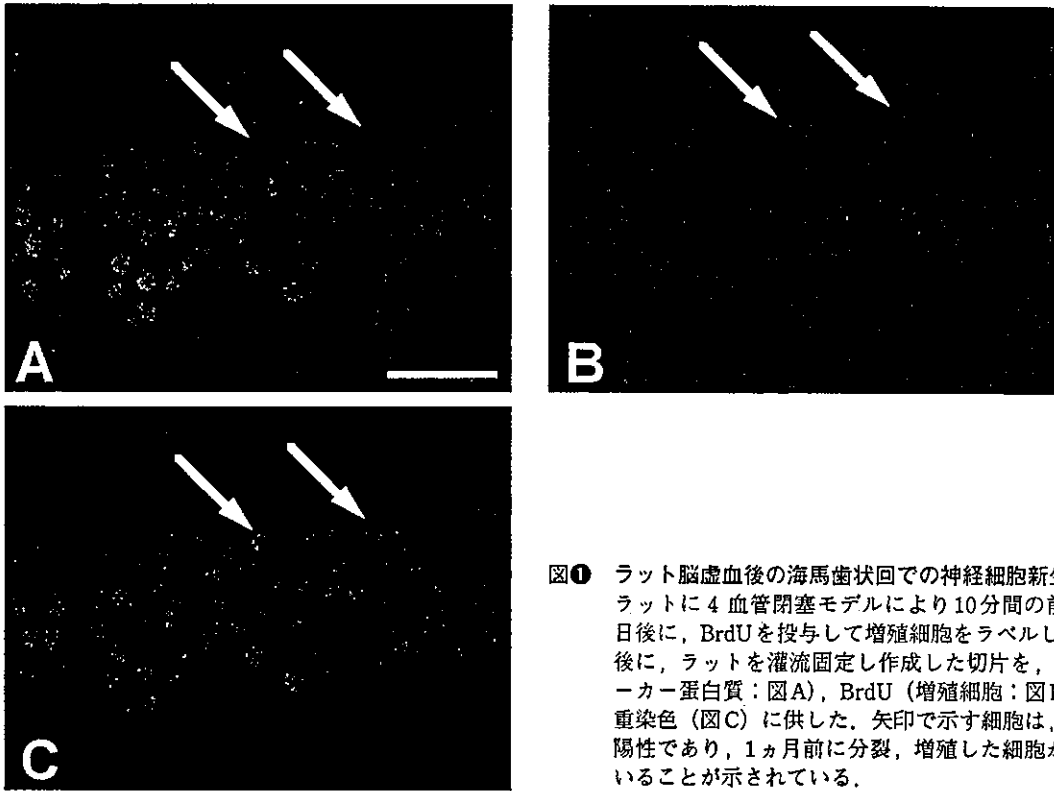
12) Ooboshi H *et al* : Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain. Ischemic flow threshold for transgene expression. *Stroke* 32 : 1043-1047, 2001

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

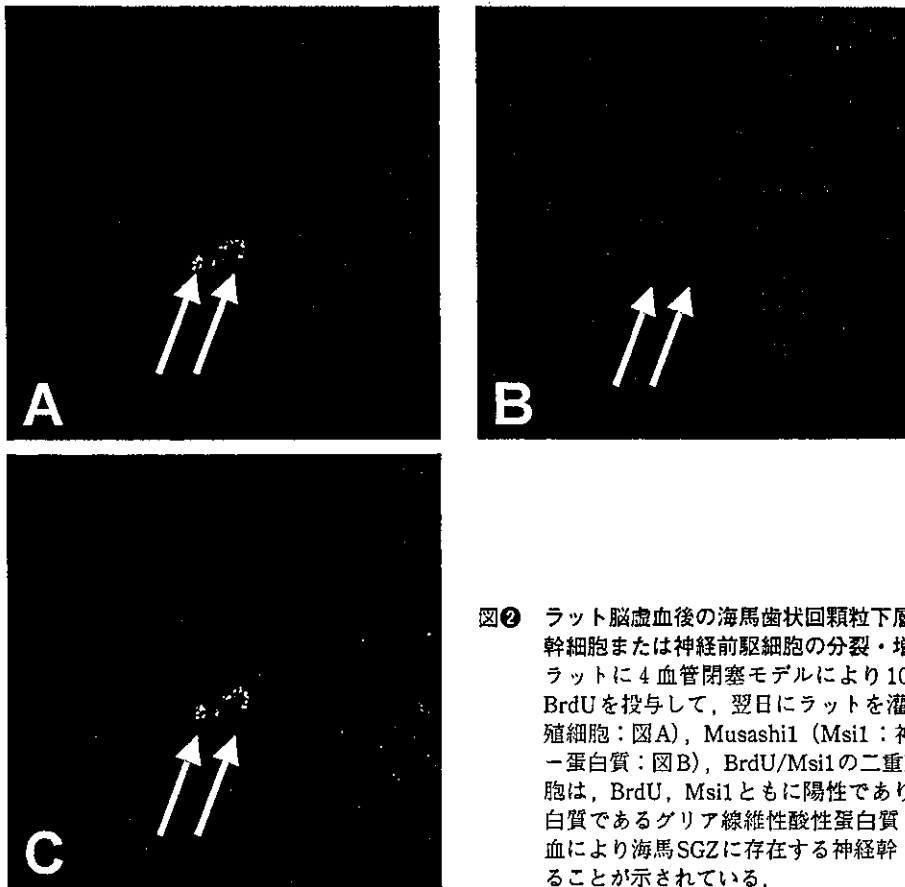
14) Lawrence MS *et al* : Herpes simplex viral vectors expressing bcl-2 are neuroprotective when delivered after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 740-744, 1997

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



**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。



- 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 synapsinI 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。

## アポトーシス関連遺伝子

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 \*広島大学大学院病態探究医科学 (第三内科)

Key Words

アポトーシス, Bcl-2 遺伝子ファミリー, カスパーゼ, シトクロームC, Fas

細胞死のメカニズムとくにアポトーシスに関与する分子の同定。そのメカニズムの解明には、飛躍的な進歩がみられる。各種疾患時にも、アポトーシスの分子機構が関与することが明らかとなり、脳虚血時にも多くのアポトーシス関連遺伝子の発現や活性が変動することが示されてきている。なかでも、主としてミトコンドリアのシトクロームC遊離を介したカスパーゼの活性化、ミトコンドリア膜への作用によりアポトーシスを促進したり抑制したりするBcl-2 遺伝子ファミリーの動態が虚血性神経細胞死において重要な役割を果たすことが明らかになってきている。

### はじめに

アポトーシスの虚血性神経細胞死への関与は、当初、虚血脳でのアポトーシスの生化学的なマーカーであるDNA ladderの報告<sup>1) 2)</sup>にはじまり、形態学的にはアポトーシスの典型的な特徴を有さないことがその後報告されたものの<sup>3)</sup>、アポトーシスにかかわる重要な因子であるカスパーゼが、虚血侵襲を受けた神経細胞で活性化されることが明らかとなり注目を集めている。動物実験モデルでは、カスパーゼ阻害薬やアポトーシスを抑制するBcl-2遺伝子の過剰発現により神経細胞死を軽減できる

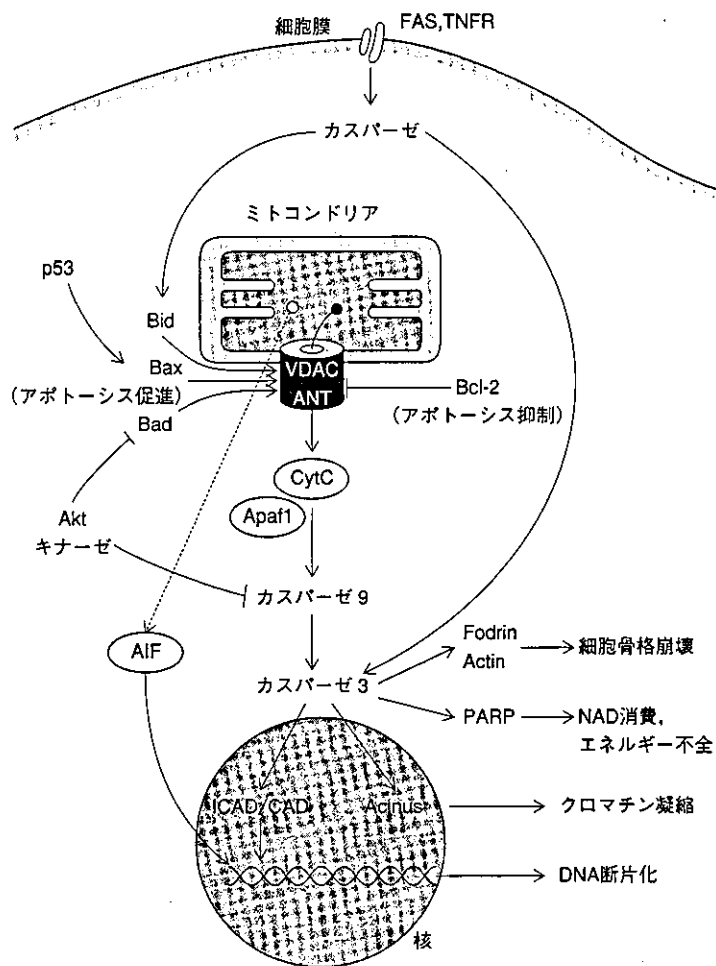
ことが報告され、抗アポトーシス効果による虚血脳保護効果が期待されている。

本稿では、最初にアポトーシスの分子機構を概説したうえで、脳虚血モデルでみられるアポトーシス関連遺伝子の動態を記載し、加えてアポトーシス関連遺伝子の発現や活性を修飾した場合の虚血脳に対する影響に関する報告を、筆者らの結果も含めつつまとめることとする。

### 1 アポトーシスの分子機構 (図1) <sup>4) 5)</sup>

アポトーシスは、1972年にはじめてその現象が記載されて以来、精力的に研究が進められ、ここ10年間にアポトーシスに関与する重要な因子の多くが解明されてきている。その主役として、カスパーゼという一群のシステインプロテアーゼ、Bcl-2ファミリー遺伝子、そして細胞内小器官としてはミトコンドリアが脚光を浴びている。

アポトーシスは、その分子機構から、カスパーゼ依存性のものとカスパーゼ非依存性のものに分類される。後者には、アポトーシス刺激によりミトコンドリアから遊離されるApoptosis inducing factor (AIF) が直接細胞核に作用してクロマチンの凝縮、アポトーシスを誘導する経路が含まれていると考えられている。このAIFによるアポトーシスは後述するアポトーシス抑制因子Bcl-2に



**図① アポトーシス分子機構**  
 アポトーシスのシグナルは、Fasなどの death receptor を介した一部を除けば、大部分がミトコンドリアに集約される。ミトコンドリア膜の permeability transition pore (VDAC: voltage dependent anion channel や ANT: adenine nucleotide transporter, シクロフィリンD などによって構成されている) から遊離されるシトクロームC (CytC), その結果生じるカスパーゼの活性化、カスパーゼによる蛋白質 (fodrin, PARP, ICAD など) の切断を介して、アポトーシスが遂行される。Apaf1: apoptosis protease activating factor 1, AIF: apoptosis-inducing factor, ICAD: inhibitor of CAD, CAD: caspase-activated DNase, PARP: poly(ADP)ribose polymerase  
 →促進 ←抑制

よって抑制できない。一方、カスパーゼ依存性の経路には、ミトコンドリアのシトクロームCの遊離が関与する経路と細胞膜レセプターを介する経路との存在が知られている。カスパーゼは現在14種類以上からなるが、大きく3つのグループに分けられる。サイトカインの活性化にかかわるカスパーゼ1, 4, 5, 11, 12, 13, 14, つぎにあげるエフェクターカスパーゼを活性化する initiator caspase (カスパーゼ2, 8, 9, 10), アポトーシスを実行する最も下流に存在する effector caspase (カスパーゼ3, 6, 7) である。

虚血侵襲に曝された神経細胞のミトコンドリアでは、カルシウム過負荷、産生されたフリーラジカルの攻撃などにより、ミトコンドリア膜電位の低下、内膜透過性亢進が励起され、ミトコンドリアから細胞質へシトクロームCが遊離される。遊離されたシトクロームCは細胞質に存在するカスパーゼ活性化因子 Apaf1 (Apoptotic

protease activating factor-1)に結合し、ATP/dATPの加水分解を伴うことによってまずカスパーゼ9を活性化する。この活性化されたカスパーゼ9がカスパーゼ3を順次活性化する。カスパーゼ3はエフェクターカスパーゼであり、細胞内蛋白質の切断をおこないアポトーシスが実行される。ミトコンドリアからのシトクロームCの遊離は、ミトコンドリアのPT (permeability transition) poreを介して生ずると考えられている。PTの正確な分子機構は不明だが、ミトコンドリア外膜のVDAC (voltage-dependent anion channel), 内膜のANT (adenine nucleotide translocator), マトリックスのシクロフィリンDにより構成されていると考えられ、Bcl-2ファミリー蛋白質の標的となっている。Bcl-2ファミリー蛋白質は、その構造と機能から大きく3つのグループに分けられ(表①), アポトーシスを抑制するグループ(Bcl-2, Bcl-xLなど)は、VDACに結合してその透過性

表① Bcl-2ファミリー蛋白質の分類

分子	アポトーシスへの作用	有するBHドメイン
Bcl-2, Bcl-xL Bcl-w, Mcl-1, A1	アポトーシス抑制	BH1, BH2, BH3, BH4
Bax, Bak, Bok	アポトーシス促進	BH1, BH2, BH3
Bid, Bik, Noxa Blk, Hrk, BNIP3 BimL, Bad, Bmf	アポトーシス促進	BH3 (BH3-only protein)

BH : Bcl-2 homology domain.  
 BH1, 2は蛋白質相互の作用, チャネル形成.  
 BH3は細胞死促進活性, BH4は細胞死抑制活性を有する.

を低下し、シトクロームCの遊離を抑制するのに対し、アポトーシスを促進するグループ（Bax, Bak, Bid, Bik, Bad, Noxaなど）は、VDACに結合するとその透過性を亢進して、シトクロームCの遊離を促進すると考えられている。細胞質に遊離したシトクロームCと結合するApaf1は、C末端側にWD40リピート構造を有し、ここにシトクロームCが結合する。カスパーゼ3は、アクチンやフォドリンといった細胞骨格蛋白質、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)などを分解するとともに、ICAD (inhibitor of caspase-dependent DNase)を分解することにより、CAD (caspase-dependent DNase)を活性化し核DNAの切断をおこなう。また、核クロマチン凝縮因子Acinusを活性化し、アポトーシスに特有の核形態変化を生ずることが示されている。放射線照射などによるDNA損傷時にも、損傷を受けた細胞がアポトーシスで排除されることは知られているが、その際に重要なのががん抑制遺伝子p53である。p53はDNA損傷などにより誘導され、転写活性化因子として機能し、Bax, Noxaといったアポトーシス促進性のBcl-2遺伝子ファミリー蛋白質の転写を促進し、ミトコンドリアからのシトクロームCの遊離を生ずると考えられている。

一方、レセプターを介するアポトーシスの系としては、Fasをはじめとしたtumor necrosis factor (TNF)レセプターファミリー分子にリガンドが結合すると、その細胞内ドメインにFADD/TRADDとよばれるアダプター分子とともにカスパーゼ8が凝集され活性化を受ける。活性化されたカスパーゼ8は、アポトーシス促進因子であ

るBidを分解、活性化して、ミトコンドリアからのシトクロームCを遊離するとともに、カスパーゼ8は直接カスパーゼ3を活性化する。

神経細胞のアポトーシスにおいては、ミトコンドリアからのシトクロームC遊離、カスパーゼ3活性化を介する経路が、最も研究が進んでおり中心的役割を果たしていると思定されている。

## 2 脳虚血におけるアポトーシス関連遺伝子の変動,その修飾による虚血脳に対する影響

1で述べたアポトーシスの経路のなかで、脳虚血後の動態がよく検討されているのが、Bcl-2遺伝子ファミリーとカスパーゼであるので、その両者を中心に記載する。

### ● 1. Bcl-2 遺伝子ファミリー

虚血侵襲を受けた神経細胞において、Bcl-2遺伝子ファミリーの発現が変動することはよく知られている。とくにアポトーシスを促進する遺伝子であるBax蛋白質が、虚血に選択的に脆弱な海馬CA1神経細胞あるいは、中大脳動脈閉塞後死滅する神経細胞に発現し、アポトーシスを抑制する遺伝子Bcl-2蛋白質が虚血に抵抗性を有する海馬CA3神経細胞や、中大脳動脈閉塞後生存する神経細胞で発現することが報告されている<sup>6)~9)</sup>。Bax蛋白質は、神経細胞で虚血後、細胞質からミトコンドリアへ移動し、ミトコンドリア膜透過性を構成するANT (adenine nucleotide translocator)に結合し、シトクロームCを遊

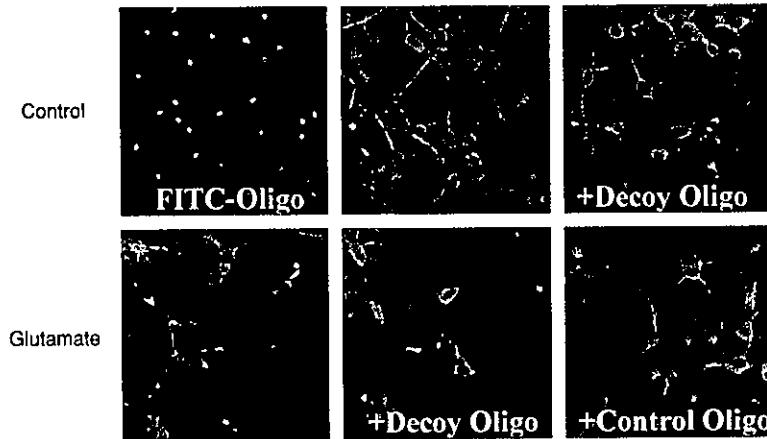


図2 神経細胞における転写因子CREBのグルタミン酸刺激に対する防御作用<sup>13)</sup>  
 CREプロモーターを介した遺伝子転写を抑制するCREデコイオリゴヌクレオチド (Decoy Oligo) を培養神経細胞に導入した。蛍光標識したオリゴヌクレオチド (Oligo) は神経細胞に取り込まれている (FITC-Oligo)。その他の図は、神経細胞をそのマーカー蛋白質であるMAP2 (microtubule associated protein 2) に対する抗体で免疫染色した像である。コントロール (上段中央) およびDecoy Oligo (上段右側) ではMAP2陽性の神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。

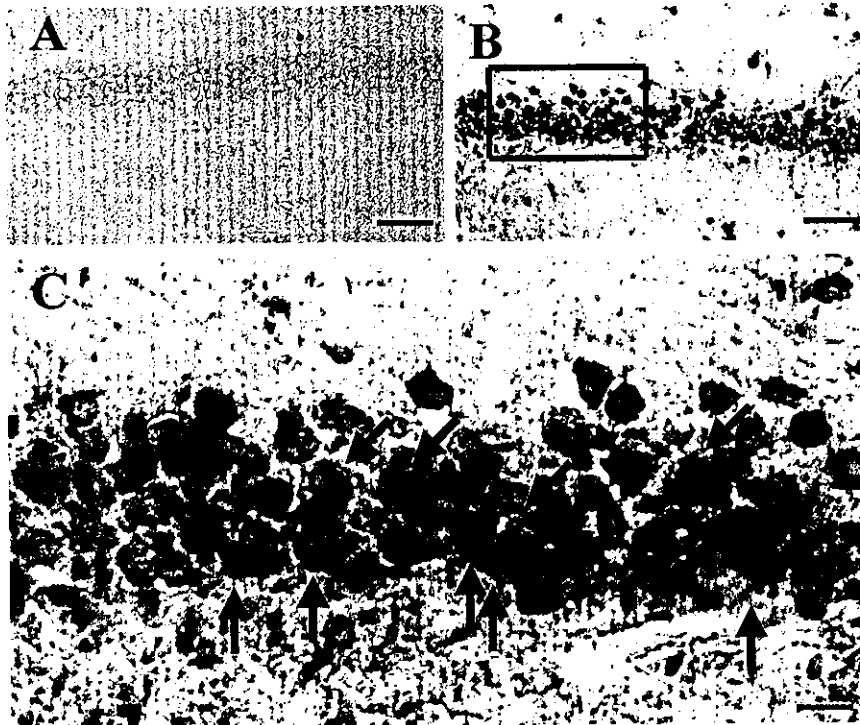


図3 脳虚血・再灌流後の神経細胞におけるCREエレメントを介した遺伝子発現<sup>13)</sup>  
 CREプロモーターに結合した $\beta$ -gal遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでのリン酸化CREBの発現を赤色で、 $\beta$ -gal遺伝子の発現を青色で示す。コントロール脳海馬では、両者とも発現がみられなかった (A) が、脳虚血再灌流後には、大部分の神経細胞がリン酸化CREB陽性 (B,Cでの赤色) となり、そのうち一部は $\beta$ -gal遺伝子の発現 (B,Cでの青色) を認める。CはBの一部 (boxで示す) の領域の拡大を示す。

離させることが報告されている<sup>10)</sup>。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

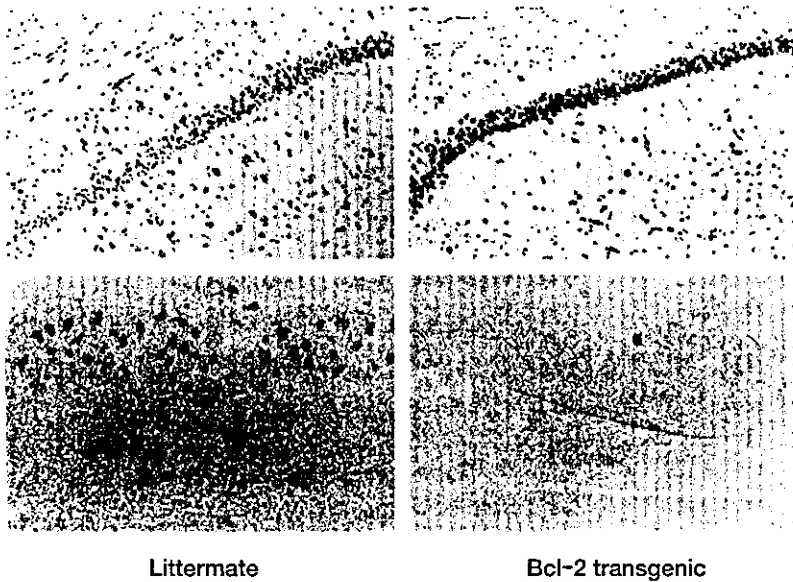


図4 Bcl-2トランスジェニックマウスでの虚血性神経細胞死の軽減<sup>18)</sup>  
一過性前脳虚血(12分間)再灌流後の海馬CA1領域のニッスル染色像を上段に、TUNEL染色像を下段に示す。Littermateでは、海馬CA1領域に、核DNA断片化を示すTUNEL反応陽性を伴う神経細胞死を認めるが、Bcl-2過剰発現マウスでは神経細胞死は免れており、TUNEL反応も陰性である。

する海馬CA3神経細胞で発現することが報告されている<sup>11)</sup>。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<sup>12)</sup>。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)<sup>13)</sup>。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<sup>14)~16)</sup>。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<sup>17)</sup>、一過性前脳虚血後の海馬神経細胞死<sup>18)</sup>と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<sup>19)</sup>。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<sup>20)</sup>。

## ●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- $\beta$ 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<sup>21) 22)</sup>。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<sup>23)~26)</sup>。その機序

は、プロカパーゼが分解されて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パーゼ3の発現も亢進することが報告されている<sup>22)~25)</sup>。Benchouaらはマウス中大脳動脈閉塞後経時的にカパーゼ1, 2, 3, 8, 9の活性を測定した結果、カパーゼ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<sup>27)</sup>。虚血中心部の梗塞を発生する領域では、カパーゼ1, 8を介して虚血早期からカパーゼ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パーゼ9がカパーゼ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<sup>10) 28) 29)</sup>。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<sup>28)</sup>。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。カパーゼ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<sup>24)~26) 30)</sup>、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<sup>29) 30)</sup>もみられ、カパーゼ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。

カパーゼ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<sup>31) 32)</sup>。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-カパーゼ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<sup>33)</sup>、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<sup>34)</sup>。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<sup>34)</sup>。脊髄虚血に際する神経細胞死に際しても、Fasを介したカパーゼ8の活性化が関与することも報告されている<sup>35)</sup>。

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<sup>36)</sup>、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、虚血脳においてカパーゼ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<sup>37)</sup>から、形態学的にはアポトーシスとはいいがたいが、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パーゼを中心概説した。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、血流再開通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 $\beta$  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 $\beta$  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、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<sup>1)</sup>。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)<sup>2)</sup>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<sup>1)</sup>。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)<sup>3)</sup>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<sup>4)</sup>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

# 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. 卵円孔開存
3. リウマチ性弁膜症	10. 先天性心疾患
4. 心筋梗塞	(右左シャントを有する場合)
5. 人工弁(特に機械弁)	11. 僧帽弁逸脱症
6. 心筋症	12. 心房内隔瘤
7. 心内膜炎(感染性・非細菌性血栓性)	13. 心臓ペースメーカー