

cerebral cortex after focal ischemia using transgenic mice with a CRE-lacZ reporter gene.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Center Use Committee of the Osaka University Graduate School of Medicine (Japan).

Animals and Surgical Procedures

We used male CRE-lacZ transgenic mice, aged 11–18 weeks, carrying a CRE-lacZ reporter gene to examine CRE-mediated gene transcription induced by CREB phosphorylation after ischemia. These transgenic mice were obtained from a colony at the University of Washington (Seattle, WA) (Impey et al., 1996) and backcrossed at least six generations to wild-type C57BL/6 mice (Charles River, Yokohama, Japan). Mice were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic DNA extracted from the tail as described (Impey et al., 1996). They were housed under diurnal lighting conditions with free access to food and water before and after the surgical procedure.

Permanent focal ischemia was produced as described previously (Martinou et al., 1994) with slight modification. In brief, mice were placed in the recumbent position, anesthetized with 2% halothane, and an incision was made from the left eye to the ear. When the temporal muscle was incised on the upper margin and deflected downward with the surrounding tissue, the left middle cerebral artery (MCA) was visible through the semi-translucent temporal surface of the skull. After a small burr hole was made in the temporal bone with a dental drill, the inner layer of the skull was removed with fine forceps, and the dura was opened carefully with a fine needle to expose the MCA. We then used a microbipolar electrocoagulator to pick up and permanently occlude the MCA at the distal portion. During surgical procedures, rectal temperature was maintained at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a heat lamp. After the incision was closed with a silk thread, mice were allowed to recover from anesthesia in a chamber where the temperature was maintained at 35°C to prevent hypothermia. Sham-operated transgenic mice were subjected to identical procedures without the MCA occlusion.

Histochemical Staining

To examine the ischemic lesions induced by MCA occlusion at the distal portion, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was carried out. Ischemic mice ($n = 3$) were killed 48 hr after the MCA occlusion with an overdose of pentobarbital. The brains were removed, sectioned coronally into 1-mm slices with a mouse brain matrix (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan), placed in 2% TTC solution for 30 min at 37°C , and then fixed in 4% formaldehyde.

To investigate temporal changes in CRE-mediated transcription, we studied ischemic mice at 0, 6, 12, 24, and 48 hr ($n = 4$ for each period of ischemia) after permanent focal ischemia and sham-operated mice at 24 hr after sham surgery ($n = 4$). Mice were perfusion-fixed with 1% glutaraldehyde under deep pentobarbital anesthesia. Brains were removed and post-fixed in the same fixative for 6 hr at 4°C . After three washes with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), they were placed in 20% sucrose in PBS at 4°C overnight, frozen in

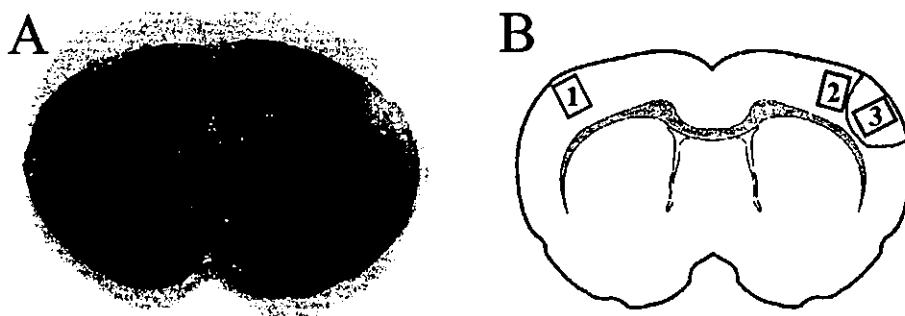
optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura, Tokyo, Japan) on dry ice, and cut into 8- μm thick coronal sections with a cryostat (Leica Instruments, Nussloch, Germany).

To detect CRE-mediated β -galactosidase expression, X-gal staining was carried out as described previously (Mabuchi et al., 2001). Briefly, fixed frozen sections were washed three times with PBS and then incubated overnight at 37°C in the reaction solution consisting of 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl_2 , and 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal; Sigma, St. Louis, MO) in PBS. After reaction with X-gal, sections were immunostained with rabbit polyclonal anti-phosphorylated CREB (pCREB) antibody (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) with an avidin-biotinylated enzyme complex system (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) as follows. After treatment with 0.3% H_2O_2 for 30 min to eliminate endogenous peroxidase activity, brain sections were blocked with 10% normal goat serum and incubated with anti-pCREB antibody (1:400) overnight at 4°C . Sections reacted with biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (1:120; Vector Laboratories) were incubated further with ABC reagent (1:50 in 50 mM Tris-NaCl) for 45 min. Reaction products were visualized by treatment with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) solution (Vector Laboratories) for 20–30 min.

To examine the neuroprotective signals that follow CRE-mediated transcription, we carried out double immunohistochemical staining of β -galactosidase and BCL-2. Ischemic mice under deep pentobarbital anesthesia were sacrificed 48 hr after focal ischemia ($n = 3$) through transcardiac perfusion with cold saline. Brains were removed promptly, frozen on powdered dry ice, and cut into 5- μm thick coronal sections. Air-dried sections were post-fixed in cold 100% methanol for 2 min, blocked with 10% normal goat serum, and incubated with rabbit polyclonal anti- β -galactosidase (1:1,000; Cortex Biochem, San Leandro, CA) and hamster monoclonal anti-mouse BCL-2 antibody (1:100; PharMingen, San Diego, CA) overnight at 4°C . After incubation with rhodamine- and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled secondary antibodies (1:200; Vector Laboratories) for 1 hr at room temperature, double immunofluorescence was evaluated using a laser confocal-scanning microscopy (Radiance 2100; Bio-Rad, Hercules, CA).

To assess the phenotype of X-gal-positive cells, immunostaining was carried out with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-neuronal nuclei (NeuN, 1:100; Chemicon, Temecula, CA) as a marker of neurons, mouse monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:100; Sigma) as a marker of astrocytes, rabbit polyclonal anti-glutathione S transferase pi (GSTpi, 1:200; MBL, Nagoya, Japan) as a marker of oligodendrocytes, rat monoclonal anti-mouse MAC2 (1:100; Cedarlane Laboratories, Hornby, ON, Canada) as a marker of microglia/macrophages, and rabbit polyclonal anti-laminin (1:100; Sigma) as a marker of endothelial cells. At 24 hr after MCA occlusion, CRE-lacZ transgenic mice under deep pentobarbital anesthesia were perfused with cold saline ($n = 4$) or perfusion-fixed with 1% glutaraldehyde ($n = 4$) for immunostaining. Brains were removed, frozen on powdered dry ice, and cut into 8- μm thick coronal sections. Unfixed fresh-frozen sections were fixed with 100% ethanol for 5 min for NeuN and GFAP staining and 100% methanol for 5 min for GSTpi staining. After fixation,

Fig. 1. **A:** Representative image of a TTC-stained coronal section of brain showing an ischemic lesion (white, unstained area) induced by MCA occlusion at the distal portion. **B:** Schematic of a coronal section of mouse brain containing the regions of interest (0.15 mm^2) for investigation of CRE-mediated gene transcription. Nonischemic cortex (1), peri-infarct area (2), and ischemic core (3) at the level 0.8 mm rostral to the bregma according to the mouse brain atlas by Franklin and Paxinos (1997).



X-gal and ABC immunostaining were carried out as described above. Because mouse monoclonal anti-NeuN and anti-GFAP antibodies were used, a mouse-on-mouse (M.O.M.) immunodetection kit (Vector Laboratories) was used according to the manufacturer's instructions to eliminate background staining.

Quantification

The number of X-gal- or pCREB-positive cells was counted in the regions of interest (ROI; 0.15 mm^2) in the ischemic core, peri-infarct area, and nonischemic cortex (Fig. 1) at the level 0.8 mm rostral to the bregma according to the mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 1997), and the ratio of X-gal-positive cells to pCREB-positive ones was calculated. Counting was carried out on three consecutive slices, and the mean value for each area was calculated. The percentages of each phenotype of X-gal-positive cells in the peri-infarct area were calculated as the X-gal/NeuN, X-gal/GFAP, X-gal/GSTpi, X-gal/MAC2, and X-gal/laminin double-positive cells for total X-gal positive cells in the ROI.

Statistical Analysis

All values are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni/Dunn post-hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Temporal Profile of CRE-Mediated Transcription

TTC staining revealed cerebral infarction in the cortex of the MCA territory in all mice subjected to ischemia (Fig. 1). In the ischemic core, the number of pCREB-positive cells significantly decreased to 42% at 6 hr, 26% at 12 hr, 11% at 24 hr, and 11% at 48 hr compared to that at time zero. X-gal-positive cells were observed rarely in the ischemic core from 0–48 hr after ischemia (Fig. 2A,C). In contrast, the number of pCREB-positive cells remained constant in the peri-infarct area from 0–48 hr after ischemia, ranging between 41–78 cells per 0.15 mm^2 . The peri-infarct area showed a significant and persistent increase in the number of X-gal-positive cells from 6–48 hr (Fig. 2A). Most X-gal-positive cells were also pCREB-positive, but the number of X-gal-positive cells was smaller than that of pCREB-positive cells (Fig. 2B,D). In the nonischemic cortex, the number of pCREB-positive

cells remained constant from 0–48 hr after ischemia ranging between 45–88 cells per 0.15 mm^2 ; however, the number of X-gal-positive cells and the percentage of X-gal-positive cells in pCREB-positive cells was significantly smaller than that in the peri-infarct area from 6–48 hr (Fig. 2C,D). Temporal changes in the number of X-gal-positive cells and the percentage of X-gal-positive cells in pCREB-positive cells in each area after focal ischemia are summarized in Figure 2C and 2D. Furthermore, in the peri-infarct area at 48 hr after ischemia, production of BCL-2 protein was found in β -galactosidase-positive cells (Fig. 3A–C). In the ischemic core, neither β -galactosidase-positive nor BCL-2-positive cells were detected at 48 hr after ischemia (data not shown). In the sham group, X-gal-positive cells were rarely observed in any area.

Phenotype of X-gal-Positive Cells

We examined the phenotypes of X-gal-positive cells in the peri-infarct area 24 hr after ischemia. Representative images of X-gal staining and immunostaining of cell markers are shown in Figure 4A–J. Although a few cells were positive for staining of GFAP (Fig. 4G), GSTpi (Fig. 4H), MAC2 (Fig. 4I), or laminin (Fig. 4J), many X-gal-positive cells were positive for NeuN (Fig. 4A,F) and negative for GFAP (Fig. 4B), GSTpi (Fig. 4C), MAC2 (Fig. 4D), and laminin (Fig. 4E). Semiquantitative analysis revealed that more than 50% of X-gal-positive cells were NeuN positive and that the rest were positive for GFAP, GSTpi, MAC2, or laminin (Table I).

DISCUSSION

We observed that CRE-mediated gene transcription, which shows a pattern of localization that is not always consistent with that of CREB phosphorylation, occurs primarily in neurons of the peri-infarct area. Previous studies have investigated the temporal profile of CREB phosphorylation after focal cerebral ischemia (Tanaka et al., 1999, 2001). These experiments revealed that CREB phosphorylation after ischemia is persistent in the peri-infarct area, which contrasts with the transient CREB phosphorylation in the ischemic core. In the present study, a similar temporal change in CREB phosphorylation after ischemia was observed in each cortex area examined; however, CRE-mediated gene transcrip-

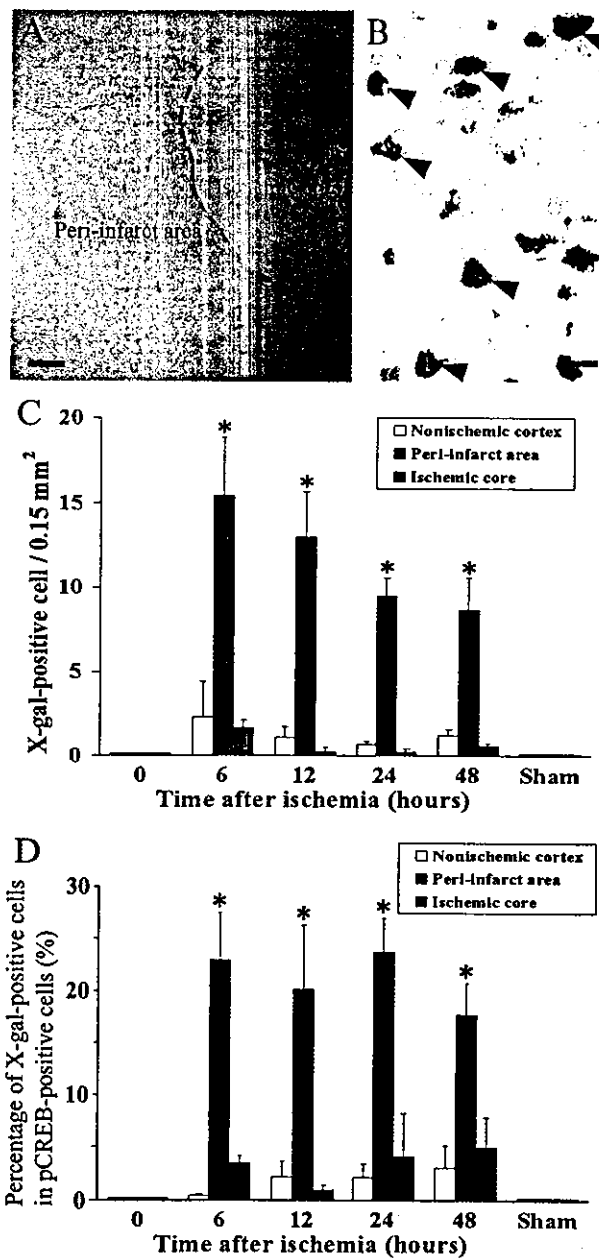


Fig. 2. **A:** In the peri-infarct area, a lot of X-gal-positive cells (blue) were observed at 24 hr after ischemia. In contrast, X-gal-positive cells were observed rarely in the ischemic core. Scale bar = 80 μ m. **B:** Most X-gal-positive cells (blue) were also pCREB-positive (red) in the peri-infarct area (arrowheads). Scale bar = 10 μ m. **C, D:** The temporal profile of X-gal-positive cells and the ratio of X-gal-positive cells to pCREB-positive cells in the cerebral cortex after focal ischemia. The open, shaded, and solid columns represent the nonischemic cortex, peri-infarct area, and ischemic core, respectively. Each column and bar is the mean \pm SD ($n = 4$ for each time point). * $P < 0.05$ versus nonischemic cortex and ischemic core at each time point.

tion induced by CREB phosphorylation was observed only in the peri-infarct area. CREB phosphorylation at Ser¹³³ is necessary but not sufficient for activation of CRE-mediated gene transcription (Hu et al., 1999a), which also requires recruitment of CREB binding protein (CBP), a transcriptional coactivator, to CREB. Previous studies have also shown a discrepancy between CREB phosphorylation and CRE-mediated gene expression under several different conditions (Bito et al., 1996; Liu et al., 1996; Mayr et al., 2001).

Although accumulating data suggest that CREB has a neuroprotective role after ischemic insult, the mechanism is not understood fully. Several recent studies have suggested that BCL-2, an antiapoptotic protein that has a neuroprotective function (Martinou et al., 1994; Lawrence et al., 1996; Kitagawa et al., 1998) and a CRE motif in the promoter region (Wilson et al., 1996), may be a major effectors of the CREB-dependent neuroprotective pathway. Some neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF) (Riccio et al., 1999), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Pugazhenthil et al., 1999), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Bonni et al., 1999), induce CREB phosphorylation and subsequent expression of BCL-2 associated with neuronal survival. Studies in cultured neurons revealed that a CRE-decoy oligonucleotide inhibits BCL-2 expression after excitotoxic stimuli and exacerbates neuronal cell damage (Mabuchi et al., 2001) and that overexpression of CREB reduces apoptosis through upregulation of BCL-2 expression (Pugazhenthil et al., 2003). We observed the colocalization of β -galactosidase, the expression of which was mediated by CREB in CRE-lacZ transgenic mice, and BCL-2 in the peri-infarct area 48 hr after ischemia, suggesting that CRE-mediated expression of BCL-2 might contribute to neuronal survival in the penumbra after focal cerebral ischemia. There is also data suggesting that BCL-2 contributes to induction of ischemic tolerance (Shimazaki et al., 1994; Shimizu et al., 2001).

In the present study, more than 50% of the cells in the peri-infarct area with CRE-mediated gene expression were neurons. Subsets of astrocytes, oligodendrocytes, microglia/macrophages, and endothelial cells were X-gal-positive. In primary astrocyte cultures, overexpression of glial maturation factor increases phosphorylation of CREB and secretion of BDNF and NGF (Zaheer et al., 2001). Additionally, the involvement of astrocytes in neurogenesis has been shown in vitro (Song et al., 2002). Taken together, these findings suggest that CRE-mediated gene transcription in astrocytes in the peri-infarct area may promote survival of adjacent neurons or neurogenesis through release of trophic factors (Chen and Swanson, 2003). Experiments with oligodendrocyte primary cultures revealed that CREB might play important roles in proliferation, differentiation, and maturation at different stages of oligodendrocyte development (Sato-Bigbee et al., 1999; Johnson et al., 2000; Afshari et al., 2001). In a rat focal cerebral ischemia model, Tanaka et al. (2001) reported an association of CREB phosphorylation with sur-

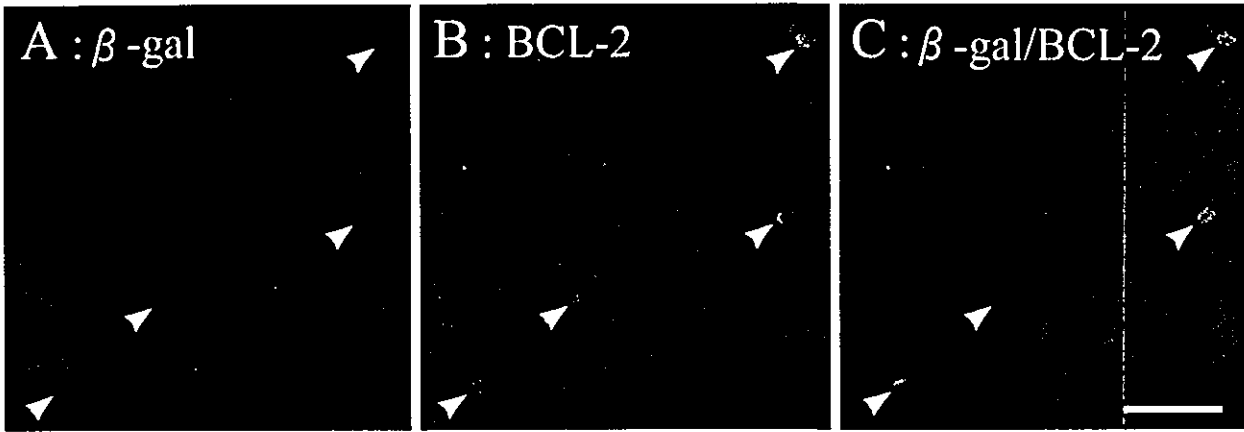


Fig. 3. High-magnification confocal images of immunostaining for β -galactosidase (A, red), BCL-2 (B, green) and both (C, yellow) in the peri-infarct area at 48 hr after focal ischemia. The double immunofluorescence image demonstrates that expression of antiapoptotic protein BCL-2 is found in β -galactosidase-positive cells in which CRE-mediated gene transcription occurred. Scale bar = 30 μ m.

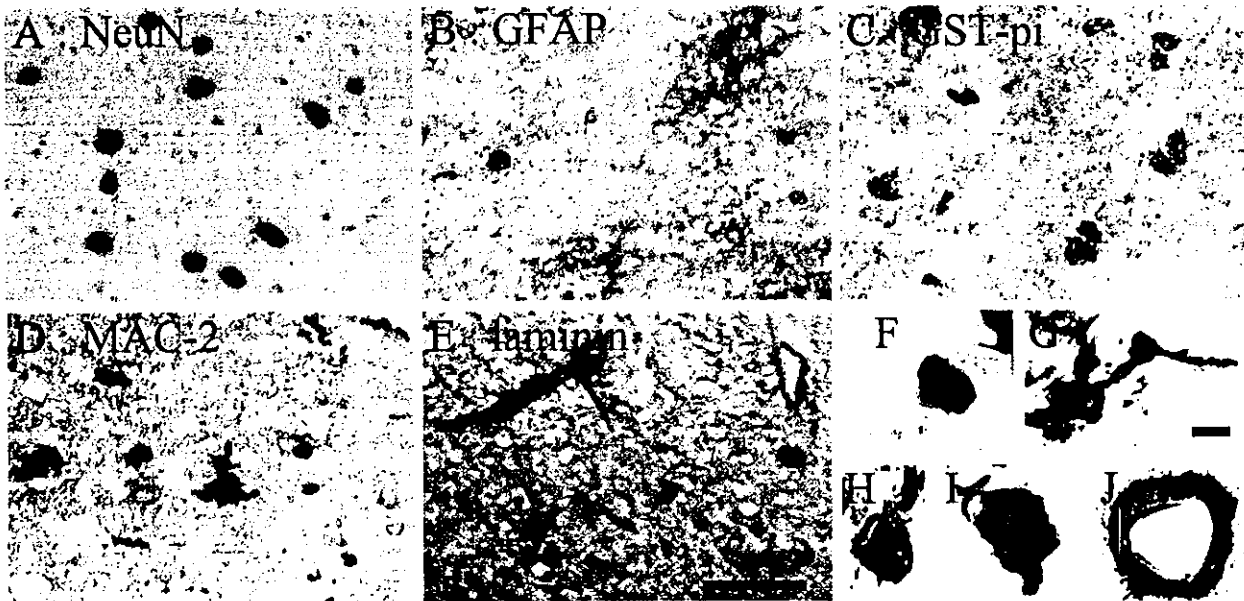


Fig. 4. Phenotypes of X-gal-positive cells in the peri-infarct area at 24 hr after focal ischemia. Most X-gal-positive cells (blue) show colocalized immunostaining with NeuN (A, F; higher magnification image), but not GFAP (B), GST-pi (C), MAC2 (D), or laminin (E). Representative photomicrographs show that a few X-gal-positive cells expressed GFAP (G), GST-pi (H), MAC2 (I), and laminin (J). Scale bar = 30 μ m in A-E, 5 μ m in F-J.

vival of oligodendrocytes and maintenance of myelination in the corpus callosum. Although our model differs from theirs, CRE-mediated gene transcription in oligodendrocytes could be associated with oligodendrocytic proliferation, survival, or both (Dewar et al., 2003). Because lipopolysaccharide-induced CREB phosphorylation in microglia (Ajmone-Cat et al., 2003) and macrophages

(Eliopoulos et al., 2002) seems to be an inflammatory response, CRE-mediated gene transcription in microglia/macrophages after ischemia may contribute to inflammation. It is unclear if such inflammation is harmful to the CNS (Schwartz, 2003). In endothelial cells, CREB has been suggested to play a role in angiogenesis (Mayo et al., 2001). Angiogenesis is promoted at the boundary zone

TABLE I. Phenotypes of X-Gal-Positive Cells in the Peri-Infarct Area 24 hr After Focal Ischemia*

Marker	Cell marker ⁺ X-gal ⁺ cells/ total X-gal ⁺ cells (%)
NeuN	55.9 ± 12.3
GFAP	9.5 ± 9.9
GSTpi	12.9 ± 3.4
MAC2	11.0 ± 2.8
Laminin	6.3 ± 6.3

*Values shown are mean ± SD. Each data point was determined from 12 sections from four animals. NeuN, neuronal nuclei, a marker of neurons; GFAP, glial fibrillary acidic protein, a marker of astrocytes; GSTpi, glutathione S transferase pi, a marker of oligodendrocytes; MAC2, a marker of microglia/macrophages; laminin, a marker of endothelial cells.

after focal cerebral ischemia (Zhang et al., 2002), and CRE-mediated gene expression in endothelial cells after ischemia might modulate angiogenesis in the peri-infarct area. Further studies are needed to clarify if these responses in nonneuronal cells are neuroprotective or neurotoxic.

Although we could not investigate whether CREB pathway is essential for neuronal survival or not in the present study, our results together with those of previous studies suggest that CREB-dependent gene expression after ischemic insult is a neuroprotective response (Walton and Dragunow, 2000; Mabuchi et al., 2001; Lonze and Ginty, 2002). If the differences in the function of CREB in various cell types or phases after ischemia are understood fully and CREB-dependent gene expression can be manipulated safely, CREB may be a novel target for neuroprotective therapy against acute ischemic stroke.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. A. Kanzawa and M. Ikuzawa for secretarial assistance.

REFERENCES

- Afshari FS, Chu AK, Sato-Bigbee C. 2001. Effect of cyclic AMP on the expression of myelin basic protein species and myelin proteolipid protein in committed oligodendrocytes: differential involvement of the transcription factor CREB. *J Neurosci Res* 66:37–45.
- Ajmone-Cat MA, De Simone R, Nicolini A, Minghetti L. 2003. Effects of phosphatidylserine on p38 mitogen activated protein kinase, cyclic AMP responding element binding protein and nuclear factor-kappaB activation in resting and activated microglial cells. *J Neurochem* 84:413–416.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203–1214.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358–1362.
- Chen Y, Swanson RA. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137–149.
- Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP. 2003. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:263–274.
- Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tschlis PN. 2002. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J* 21:4831–4840.
- Finkbeiner S. 2000. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25:11–14.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Ghosh A, Greenberg ME. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239–247.
- Hu BR, Fux CM, Martone ME, Zivin JA, Ellisman MH. 1999. Persistent phosphorylation of cyclic AMP responsive element-binding protein and activating transcription factor-2 transcription factors following transient cerebral ischemia in rat brain. *Neuroscience* 89:437–452.
- Hu SC, Chrvia J, Ghosh A. 1999. Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling. *Neuron* 22:799–808.
- Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR. 1996. Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16:973–982.
- Johnson JR, Chu AK, Sato-Bigbee C. 2000. Possible role of CREB in the stimulation of oligodendrocyte precursor cell proliferation by neurotrophin-3. *J Neurochem* 74:1409–1417.
- Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. 1991. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:299–307.
- Kirino T. 2002. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1283–1296.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, et al. 1990. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528:21–24.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tsujimoto Y, Ohtsuki T, Kuwabara K, Matsushita K, Yang G, Tanabe H, Martinou JC, Hori M, Yanagihara T. 1998. Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of BCL-2 in transgenic mice. *Stroke* 29:2616–2621.
- Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, Steinberg GK, Sapolsky RM. 1996. 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.
- Liu FC, Graybiel AM. 1996. Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron* 17:1133–1144.
- Lonze BE, Ginty DD. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605–623.
- Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, Takasawa K, Ohtsuki T, Xia Z, Storm D, Yanagihara T, Hori M, Matsumoto M. 2001. 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.
- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, et al. 1994. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13:1017–1030.
- Mayo LD, Kessler KM, Pincheira R, Warren RS, Donner DB. 2001. Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 276:25184–25189.
- Mayr BM, Canettieri G, Montminy MR. 2001. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10936–10941.
- Nakajima T, Iwabuchi S, Miyazaki H, Okuma Y, Inanami O, Kuwabara M, Nomura Y, Kawahara K. 2002. Relationship between the activation of cyclic AMP responsive element binding protein and ischemic tolerance in the penumbra region of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 331:13–16.

- Pugazhenthil S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JE. 1999. Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 274:27529-27535.
- Pugazhenthil S, Nesterova A, Jambal P, Audesirk G, Kern M, Cabell L, Eves E, Rosner MR, Boxer LM, Reusch JE. 2003. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *J Neurochem* 84:982-996.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286:2358-2361.
- Sato-Bigbee C, Pal S, Chu AK. 1999. Different neuroligands and signal transduction pathways stimulate CREB phosphorylation at specific developmental stages along oligodendrocyte differentiation. *J Neurochem* 72:139-147.
- Schwartz M. 2003. Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J Cereb Blood Flow Metab* 23:385-394.
- Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A. 1998. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20:727-740.
- Shimazaki K, Ishida A, Kawai N. 1994. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci Res* 20:95-99.
- Shimizu S, Nagayama T, Jin KL, Zhu L, Loeffert JE, Watkins SC, Graham SH, Simon RP. 2001. bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:233-243.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.
- Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y. 1999. Temporal profile of CREB phosphorylation after focal ischemia in rat brain. *Neuroreport* 10:2245-2250.
- Tanaka K, Nogawa S, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y. 2001. Phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in oligodendrocytes in the corpus callosum after focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1177-1188.
- Walton M, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. 1996. The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. *Brain Res Mol Brain Res* 43:21-29.
- Walton M, Woodgate AM, Muravlev A, Xu R, During MJ, Dragunow M. 1999. CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J Neurochem* 73:1836-1842.
- Walton MR, Dragunow I. 2000. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci* 23:48-53.
- Wilson BE, Mochon E, Boxer LM. 1996. Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol* 16:5546-5556.
- Zaheer A, Yorek MA, Lim R. 2001. Effects of glia maturation factor overexpression in primary astrocytes on MAP kinase activation, transcription factor activation, and neurotrophin secretion. *Neurochem Res* 26:1293-1299.
- Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, Goussev A, Powers C, Yeich T, Chopp M. 2002. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:379-392.
- Zirpel L, Janowiak MA, Veltri CA, Parks TN. 2000. AMPA receptor-mediated, calcium-dependent CREB phosphorylation in a subpopulation of auditory neurons surviving activity deprivation. *J Neurosci* 20:6267-6275.

● 演題 2

虚血性神経細胞死のメカニズム

大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学 北川 一 夫

はじめに

神経細胞の虚血に対する脆弱性は、グルタミン酸毒性-カルシウム負荷、フリーラジカル、アポトーシス機構などが複雑に関与していると想定されている。虚血性神経細胞死へのアポトーシスの関与は形態学的には否定的な報告が多いが、カスパーゼ活性化などアポトーシスにかかわる分子機構についてはその関与を支持する報告が多い。血管閉塞による虚血侵襲が強い場合、神経細胞は細胞内応答を示すことなく死滅するが、軽度な場合には細胞内カルシウム濃度上昇、フリーラジカルの産生による酸化還元状態の変化などにより、遺伝子発現を含む各種の細胞内応答現象を示す。その結果、死滅する細胞もあれば耐性を獲得する神経細胞も出現する。より軽微な虚血ストレスで誘導される現象は細胞保護的に、脆弱な神経細胞を死滅させる強めの虚血ストレスでみられる遺伝子発現、細胞内応答現象は細胞死を促進する機構と想定されるが、おのおので特異的に関与する細胞内応答現象、遺伝子発現については明確にされていない。

本稿では、虚血性神経細胞死へのグルタミン酸毒性、フリーラジカル、アポトーシスの関与についてわれわれが研究を進めてきた事柄、さらに虚血およびグルタミン酸負荷後の神経細胞での転写因子 CREB を介した遺伝子発現の役割、特に虚血耐性現象や神経細胞保護における役割に関する実験結果を述べる。

1 グルタミン酸毒性-カルシウム負荷

1980年代後半から、虚血に対する神経細胞の選択的脆弱性に興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の遊離、受容体の活性化に伴う細胞内へのカルシウム流入に伴うカルシウム過負荷が関与しているとする説が有力視されてきた(図 1)¹⁾。しかし、各種のグルタミン酸受容体拮抗薬の臨床治験成績が芳しくなかったことからヒト脳梗塞病態にこの機構がどれくらい関与するか疑問視されている²⁾。しかし、グルタミン酸受容体の活性化を伴うかどうかはともかくとしても、虚血により細胞内にカルシウムが流入し、細胞内で上昇した Ca^{2+} は、Ca 依存性の各種の酵素、プロテアーゼ、リパーゼ、一酸化窒素合成酵素の活性化を引き起こしていく。

このうちわれわれは主として、プロテアーゼ特にカルパインが虚血後早期から活性化され、細胞骨格蛋白質(微小管結合蛋白質 2, フォドリンなど)の分解を引き起こす点について検討してきた。しかしこの酵素の活性化の程度は、実験に用いる動物種により大きく異なり、特に砂ネズミでは虚血後カルパインの活性化がラット、マウスに比べ速やかに生じることが明らかになった(図 2)³⁾。

カルパインの阻害薬は、ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて、血管閉塞 6 時間後に投与しても脳保護効果がみられると報告されているが⁴⁾、動物種により虚血に伴う蛋白分解酵素の活性化程度が異なるというのは、これらカルパイン阻害薬の臨床応用を考える際に必要と考え

Key words : 虚血性神経細胞死, グルタミン酸, フリーラジカル, アポトーシス, 虚血耐性

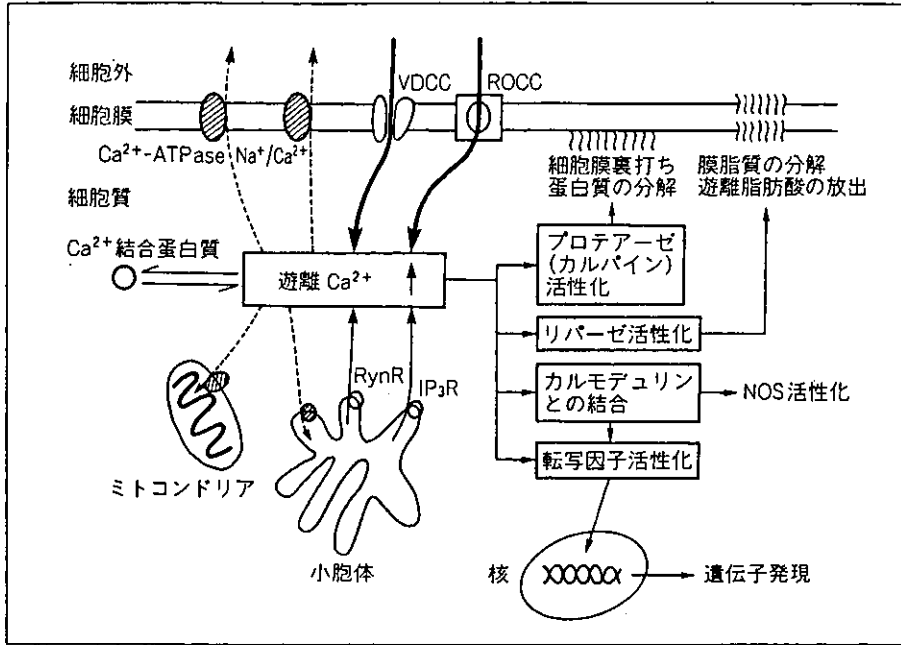


図 1 脳虚血時にみられる Ca^{2+} の動態¹⁾
 脳虚血に際して大量のグルタミン酸が細胞外へ遊離され、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC), 受容体結合型 Ca^{2+} チャンネル (ROCC) を介して、細胞外から細胞内への Ca^{2+} が流入する (太線)。細胞には細胞内遊離 Ca^{2+} を下げる機構, Ca^{2+} ポンプ, Na^{+}/Ca^{2+} アンチポーターが細胞膜, ミトコンドリア, 小胞体に存在するが虚血時には十分に作動しない (点線)。細胞内で上昇した Ca^{2+} は、プロテアーゼ、リパーゼ活性化、カルモジュリンとの結合を介した一酸化窒素合成酵素 (NOS) の活性化、転写因子活性化などに関与しているものと考えられている。

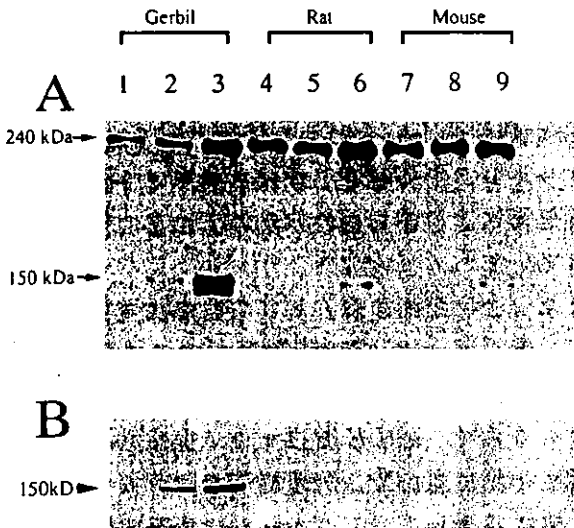


図 2 虚血脳におけるカルパイン活性化の動物種による差³⁾

砂ネズミ (Gerbil), ラット (Rat), マウス (Mouse) 脳の断頭による完全虚血に際するカルパイン活性化によるフォドリン分解を示す。A はフォドリン (240 kDa) を認識する抗体, B はフォドリンのカルパインによる分解産物 (150 kDa) のみを認識する抗体を用いたイムノブロットを示す。1, 4, 7 はコントロール脳, 2, 5, 8 は 15 分虚血, 3, 6, 9 は 30 分虚血脳を示す。ラット, マウスでは完全虚血 30 分でもわずかにフォドリンの分解がみられるのみだが, 砂ネズミでは虚血 15 分ですでに明らかなカルパインによるフォドリンの分解を認める。

られる。

2 フリーラジカル

脳虚血病態へのフリーラジカルの関与は、

1970 年代後半から示唆されてきた。われわれは、1 のグルタミン酸-Ca 仮説が全盛のころに、砂ネズミの遅発性神経細胞死へのフリーラジカルの関与を、superoxide dismutase (SOD) を用

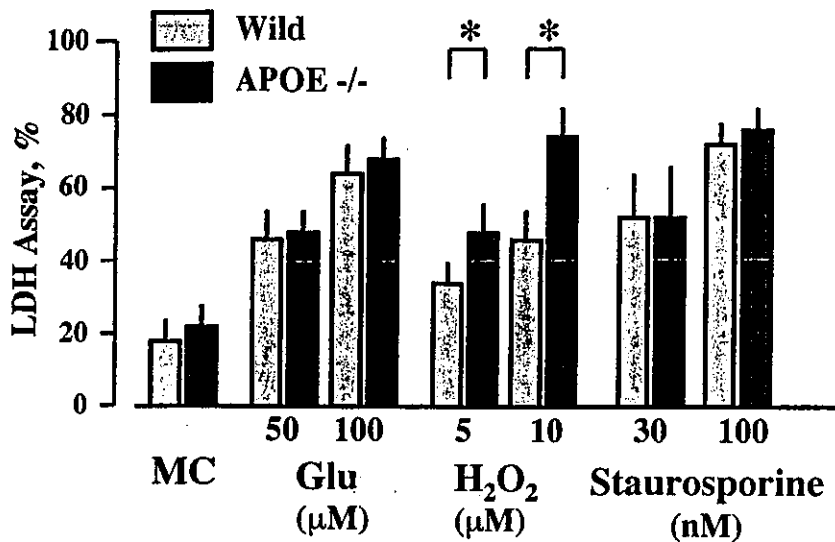


図 3 APOE を欠損した神経細胞のグルタミン酸、フリーラジカル、アポトーシス刺激に対する感受性

APOE 欠損マウス (APOE^{-/-}) と野生型マウス (Wild) から初代培養神経細胞を作成し、グルタミン酸 (Glu) 負荷、過酸化水素 (H₂O₂) 負荷、アポトーシス刺激 (Staurosporine) を加え、神経細胞の生存度を APOE^{-/-} と Wild 間で LDH アッセイにより比較した。グルタミン酸、Staurosporine 負荷による細胞死の程度には両者間で差がなかったが、過酸化水素負荷に対しては APOE を欠損した神経細胞は野生型の神経細胞に比し脆弱であった。

いて示唆してきた⁵⁾。しかし脳梗塞へのフリーラジカルの関与が注目されてきたのは、①フリーラジカルの産生が計測機器の進歩により脳虚血モデルで直接証明されたこと、②フリーラジカル捕捉薬が、動物実験で神経細胞だけではなく脳白質成分に対しても保護効果を示したこと、③多くのグルタミン酸拮抗薬が臨床試験で無効であるのに対して、フリーラジカル捕捉薬は臨床試験で有効な報告が多く、特にわが国ではフリーラジカル捕捉薬の一つであるエダラボンが認可されたこと、などが挙げられる。

脳虚血再灌流病態におけるフリーラジカル産生源は、好中球の NADPH 酸化酵素、神経細胞のミトコンドリア電子伝達系、アラキドン酸代謝カスケード、一酸化窒素合成酵素、グリア細胞の誘導型一酸化窒素合成酵素、血管内皮細胞のキサンチン酸化酵素などが挙げられる。フリーラジカルは大量に発生すれば直接脂質、蛋白質、核酸の過酸化障害を引き起こす。しかし少量のフリーラジカルは細胞内の酸化還元状態

を変化させ、各種の遺伝子発現を引き起こし⁶⁾、そのうち一部は細胞保護的に作用することが示されている。細胞内抗酸化酵素である Mn-SOD も酸化ストレスにより誘導されることや、酸化ストレスを引き起こす炎症性サイトカインの前処置により虚血耐性が誘導されることが示されている⁷⁾。

また、近年 APOE 蛋白質が虚血脳に対して保護的に働くことが APOE 欠損マウスを用いた検討から明らかにされているが、その分子機構を探るうえで、APOE 欠損マウス由来の培養神経細胞と野生型由来の培養細胞を、グルタミン酸、酸化ストレス、アポトーシス刺激に曝露したところ、APOE を欠損した神経細胞では酸化ストレスに対してのみ野生型に比べ脆弱であることが明らかとなり、APOE は抗酸化活性を介して虚血脳に保護的に働くことが示唆された (図 3)⁸⁾。

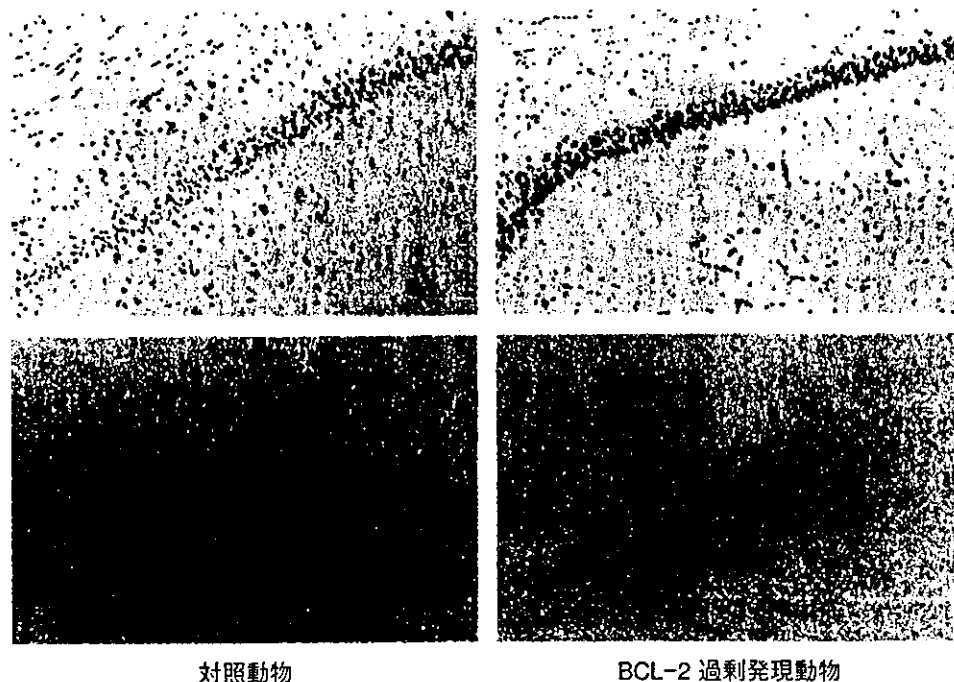


図 4 BCL-2 トランスジェニックマウスでの虚血性神経細胞死の軽減
一過性前脳虚血 (12 分間) 再灌流後の海馬 CA1 領域のニッスル染色像を上段に、
TUNEL 染色像を下段に示す。対照動物では、海馬 CA1 に核 DNA 断片化を示す
TUNEL 反応陽性を伴う神経細胞死を認めるが、BCL-2 過剰発現マウスでは神経細胞
死は免れており、TUNEL 反応も陰性である。

3 アポトーシス

1990 年代に入ってから細胞死機構の解明が進み、虚血性神経細胞死においてもアポトーシスの関与が注目されてきた⁹⁾。虚血により傷害を受けた神経細胞は、形態学的にはアポトーシスの特徴を示さないが、アポトーシスに関わるとされる細胞内情報伝達機構、特にカスパーゼの関与が明らかとなっている。アポトーシスを促進する遺伝子、抑制する遺伝子が存在するが、なかでもアポトーシスの制御に重要とされているのが BCL-2 遺伝子ファミリーである。アポトーシス抑制遺伝子である BCL-2 を過剰発現させたマウスでは、Martinou ら¹⁰⁾は、中大脳動脈閉塞モデルで脳梗塞サイズの縮小を、われわれ¹¹⁾は一過性前脳虚血モデルで神経細胞死の軽減効果を報告した (図 4)。またカスパーゼ阻害薬による脳保護効果も報告され、アポトーシス抑制を用いた脳梗塞の治療法の開発が待たれている。なかでも脳由来神経栄養因子をはじめと

した各種の神経栄養因子の虚血脳保護効果には、アポトーシス抑制作用が含まれていると考えられる。

4 転写因子 CREB を介した遺伝子発現の役割

われわれは、砂ネズミ海馬での虚血耐性現象を報告して以来、虚血耐性現象への遺伝子発現の関与、特にストレス蛋白質に注目し、新規ストレス蛋白質で HSP110 ファミリーの一つである irp94 (ischemia-responsive protein 94) のクローニング¹²⁾および HSP40 蛋白質の虚血脳での発現¹³⁾を報告してきた。しかし、虚血耐性現象ならびに神経細胞における虚血侵襲に対する防御機構を考えるうえで、単一分子の遺伝子発現だけでは十分に説明できないと考えようになり、神経細胞に豊富に存在しその細胞生存、分化に関与する転写因子 cyclic AMP-responsive protein binding protein (CREB) の虚血スト

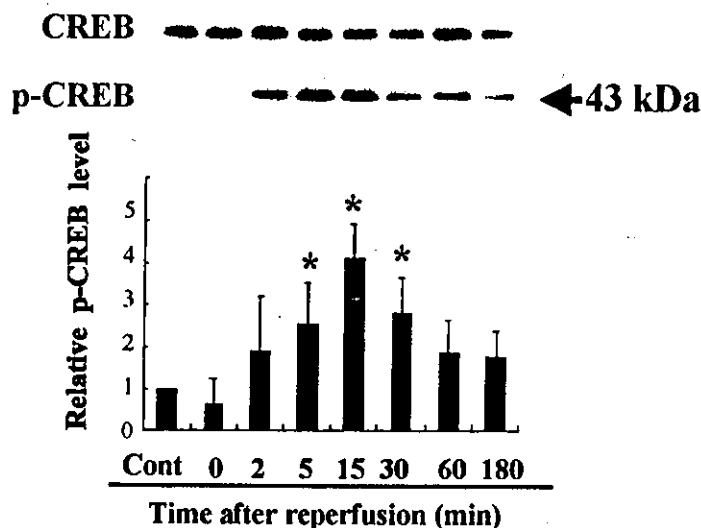


図 5 脳虚血再灌流における転写因子 CREB リン酸化の亢進
 砂ネズミ海馬における虚血再灌流時における CREB リン酸化は
 15 分をピークとして観察される。CREB リン酸化は培養神経細胞
 のグルタミン酸刺激でも同様にみられ、CRE プロモーターを介し
 た遺伝子発現により神経細胞保護的に作用しているものと想定さ
 れる。

レスを受けた神経細胞での動態とその意義に注目した¹⁴⁾。一過性脳虚血およびグルタミン酸刺激では、細胞が死なな程度刺激でも、CREB のリン酸化亢進が観察された (図 5)。この CREB のリン酸化は、NMDA 受容体を介した細胞外から細胞内へのカルシウム流入が引き金となり、主としてカルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼの活性化が関与していることを明らかにしたうえで、CRE 配列を介した遺伝子発現が生じること、CREB のリン酸化を抑制すると BCL-2 遺伝子の発現が低下し、神経細胞死が増加することを明らかにし、神経細胞の虚血ストレスに対する防御機構として CREB を介した遺伝子発現の重要性を明らかにした。

ま と め

心筋梗塞における Heart Attack と同様、脳卒中急性期を Brain Attack ととらえ、超急性期から専門病院での血栓溶解療法をはじめとした専門的な治療が予後を大きく左右することはいうまでもない。これまでの臨床試験の多くが、さまざまな重度の脳梗塞症例や虚血後再開通して

いる例としていない例を同一基準で評価しているものが多く、いくら動物実験で有効な結果が得られていても臨床試験では無効との烙印を押された薬剤もあるものと想定される。虚血性神経細胞死のメカニズムを地道に明らかにしていくことは、脳卒中急性期治療手段が確立するであろう 21 世紀において脳保護を考えるうえで重要な命題であろう。

文 献

- 1) 北川一夫, 松本昌泰, 堀正二. Ca^{2+} と病態: 脳虚血. 蛋白質核酸酵素 1998;43:1884-90.
- 2) 松本昌泰, 堀正二. 脳保護療法の行方. MEDICO 2000;31:471-4.
- 3) Kitagawa K, Matsumoto M, Saido TC, et al. Species differences in fodrin proteolysis in the ischemic brain. J Neurosci Res 1999;55:643-9.
- 4) Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, et al. Six-hour window of opportunity of calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1998;29:152-8.
- 5) Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T, et al. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. Neuroscience 1989;35:551-8.

- 6) Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:2-14.
- 7) 北川一夫, 松本昌泰, 堀正二. 脳虚血耐性発現のメカニズム. *Clin Neurosci* 1999;17:520-4.
- 8) Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. Protective effect of apolipoprotein E against ischemic neuronal injury is mediated through antioxidant action. *J Neurosci Res* 2002;68:226-32.
- 9) 北川一夫, 松本昌泰, 堀正二. アポトーシス関連遺伝子. *分子脳血管病* 2002;1:171-8.
- 10) Martinou JC, Dubois-Dauphins M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talbot D, Catsicas S, Pietra C. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994;13:1017-30.
- 11) 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* 1998;29:2616-21.
- 12) Yagita Y, Kitagawa K, Taguchi A, et al. Molecular cloning of a novel member of the HSP110 family of genes, ischemia-responsive protein 94 kDa (irp94), expressed in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 1999;72:1544-51.
- 13) 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* 2002;67:37-47.
- 14) Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, 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* 2001;21:9204-13.

遺伝子治療研究の現況

北川 一夫

■ はじめに

脳梗塞に対する遺伝子治療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事が期待されている。当初は虚血を作成する以前から遺伝子導入してその効果を検証する実験結果が多かったが、臨床応用を視野に入れた虚血作成後の遺伝子治療を目指した研究も行われてきている。本稿では、これまでの実験的脳虚血モデルに遺伝子治療を試みた研究報告を概説した上で、今後の脳梗塞における遺伝子治療の方向性について筆者の見解を述べてみたい。

実験的脳虚血モデルでのウイルスベクターを用いた遺伝子治療

脳梗塞に対する遺伝子治療が注目されてきた背景には以下の2点があげられる。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こ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。分泌型の蛋白質で神経保護作用を有する神経栄養因子はこの例に属する。このような2つの問題点を遺伝子治療により克服することが可能と考えられる。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

きたがわ かずお 大阪大学講師/大学院医学系研究科病態情報内科学

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場合が多い。脳虚血モデルへの応用としては、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^{2,3)}、グルコーストランスポーター遺伝子⁴⁾、熱ショック蛋白質72(HSP72)⁵⁾、Calbindin D28K⁶⁾、transforming growth factor β 1(TGF β 1)遺伝子⁷⁾、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⁸⁾、グリア由来神経栄養因子(GDNF)遺伝子⁹⁾、アポトーシス抑制遺伝子であるneuronal apoptosis inhibitory protein(NAIP)¹⁰⁾、sensitive to apoptosis gene(SAG)¹¹⁾遺伝子を脳室内または脳実質内に投与した報告では、翌日以後に脳虚血モデルを作成し、これら遺伝子導入の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次の焦点となる。Abeら¹²⁾はアデノウイルスを用いてラット中大脳動脈閉塞直後、または再灌流直後に大脳皮質へ遺伝子導入を行い、2~7日後に顕著な標的遺伝子産物の発現を明らかにしている。またOoboshiら¹³⁾は虚血作成後遺伝子導入を行った場合、虚血中心部での遺伝子発現は軽微だが、虚血辺縁部では十分な遺伝子産物の発現が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行っても、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^{14,15)}、GDNF¹⁶⁾、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor:

表1 遺伝子導入に用いられるベクターの特徴(Papadopoulosら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

HGF)¹⁷⁾, 熱ショック蛋白質 72 (HSP 72)¹⁸⁾, プロスタグランジン (PG) の生成酵素であるシクロオキシゲナーゼ 1 やプロスタサイクリン (PGI 2) 合成酵素¹⁹⁾ 遺伝子を脳室内, 脳実質内に投与すると, 虚血性脳障害が減少することが報告されている。以上の報告を表 2 にまとめた。

脳梗塞モデルでのオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現制御

前項に述べたように, 各種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。一方, 内因性に発現しているか, または虚血侵襲後に発現してくる蛋白質の発現を抑制する目的には, オリゴヌクレオチドを用いたアンチセンス治療が有用である。オリゴヌクレオチドを用いた治療は, 核酸の導入という点では低効率ではあるが, 安全面では優れている。当初はグルタミン酸受容体のサブタイプの一つである NMDA R1 受容体のアンチセンスオリゴヌクレオチドをラット脳室内に予め投与し, 受容体の発現を抑制したあとで中大脳動脈閉塞モデルを作成すると, 脳梗塞サイズが縮小することが報告され注目された²⁰⁾。しかし内因性に発現している蛋白質の含量を低下させるには, アンチセンスオリゴヌクレオチドを虚血作成数日前から投与しておく必要があり, 臨床的な応用は困難である。一方, 脳虚血後の遺伝子誘導を介する蛋白質発現を抑制するには, 虚血発生後のアンチセンスオリゴヌクレオチド (ODN) 投与でもその効果が期待できる。虚血により遺伝子発現が増加するアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 の発現を虚血作成 30 分前または虚血作成後の ODN 脳室内投与により抑制することが可能であり, その

結果, 脳梗塞サイズの増大²¹⁾ や虚血耐性現象が消失すること²²⁾ が示されている。脳虚血後に遺伝子発現の認められる遺伝子の中には, 虚血病態の増悪への関与が想定されている因子も多数存在する。誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) もそのような因子の一つであり, ラット虚血作成 12 時間前から, iNOS に対する ODN を脳室内投与しておく, NOS 活性が抑制され梗塞体積も 30% 縮小することが報告されている²³⁾。虚血後に遺伝子発現がみられ, 虚血病態増悪に関わっている因子の発現をアンチセンス法で制御する治療法の開発は, 臨床的にも応用可能と考えられる。

特定の遺伝子発現を制御するにはアンチセンス法が有用であるが, 脳虚血時の各種遺伝子発現は転写因子の活性化を介して生ずることを加味すると, デコイオリゴヌクレオチドによる転写因子レベルでの発現を制御できればより効率的な遺伝子発現の制御が可能と考えられる。脳虚血に際してのデコイオリゴヌクレオチド投与の効果を検証した報告は殆どないが, われわれはグルタミン酸暴露後の神経細胞生存維持への転写因子 cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) の関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²⁴⁾。

脳虚血病態における遺伝子治療の今後の展開

遺伝子治療が実際の脳卒中臨床に応用されるか否かは, 安全性の問題と遺伝子治療に代用できる治療法が開発されるかどうかにか依存している。とくに後者に関しては, 最近 protein transduction domain 配列を結合したアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-xL を腹腔内投与すると神経細胞に取り込まれ, 中大脳動脈閉塞作成後の投与でも梗塞サイズを縮小することが報告され注目される²⁵⁾。また遺伝子導入手段

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 ら ²⁾	Bcl-2	HSV	ラット	6 時間前	中大脳動脈閉塞モデル
Lawrence ら ¹⁴⁾	Bcl-2	HSV	ラット	1.5 時間後	中大脳動脈閉塞モデル
Linnik ら ³⁾	Bcl-2	HSV	ラット	1 日前	中大脳動脈閉塞モデル
Shimazaki ら ¹⁵⁾	Bcl-2	AAV	砂ネズミ	1 時間後	一過性両側総頸動脈閉塞モデル
Lawrence ら ⁴⁾	GLT	HSV	ラット	6 時間前	中大脳動脈閉塞モデル
Yenari ら ⁵⁾	HSP 72	HSV	ラット	1 日前	中大脳動脈閉塞モデル
Hoehn ら ¹⁶⁾	HSP 72	HSV	ラット	2 時間後	中大脳動脈閉塞モデル
Yenari ら ⁶⁾	Caibindin D 28 K	HSV	ラット	1 日前	中大脳動脈閉塞モデル
Yang ら ⁹⁾	IL-1 ra	Adenovirus	マウス	5 日前	中大脳動脈閉塞モデル
Kitagawa ら ⁹⁾	GDNF	Adenovirus	ラット	1 日前	中大脳動脈閉塞モデル
Tsai ら ¹⁶⁾	GDNF	AAV	ラット	虚血直後	中大脳動脈閉塞モデル
Xu ら ¹⁰⁾	NAIP	Adenovirus	ラット	7 日前	4 血管閉塞モデル
Yang ら ¹¹⁾	SAG	Adenovirus	マウス	5 日前	中大脳動脈閉塞モデル
Lin ら ¹⁹⁾	COX I/PGIS	Adenovirus	ラット	5 時間後	中大脳動脈閉塞モデル
Zhu ら ⁷⁾	TGFβ 1	Adenovirus	マウス	5 日前	中大脳動脈閉塞モデル

GLT : Glucose transporter, IL-1 ra : Interleukin-1 receptor antagonist, GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor, NAIP : Neuronal apoptosis inhibitory protein, SAG : sensitive to apoptosis gene, COX I : cyclooxygenase I, PGIS : prostacyclin synthase, TGFβ 1 : transforming growth factor β 1

についても, ex vivo で骨髄細胞に遺伝子導入して全身的に投与し, 脳内へ移行させる手段も考案されている²⁶⁾。また脳卒中症例で実際に遺伝子治療が行われるようになった場合でも, 実際は発作発症後に行われることになるので, 慢性的な脳組織の修復過程の修飾をターゲットにした方が実用的かもしれない。近年, 成熟動物脳にも神経幹細胞が存在し神経細胞新生が持続しておこっていることが明らかになってきており, 脳虚血ストレスののち海馬歯状回においてこの神経細胞新生が促進されることが筆者らの研究をはじめいくつかの研究室から報告されている^{27,28)}。さらに, 最近 Nakatomi らにより脳虚血により遅発性神経細胞死をおこした海馬 CA1 領域でも神経細胞新生がおり, 神経栄養因子投与によりその神経細胞新生が著しく促進されるという注目すべき報告がなされた²⁹⁾。虚血脳における神経

細胞新生が, 脳梗塞後の機能回復に関与しているとするならば, 神経細胞新生を促進する作用のある各種栄養因子を遺伝子導入することにより, 脱落した神経機能の回復が期待できるかもしれない。

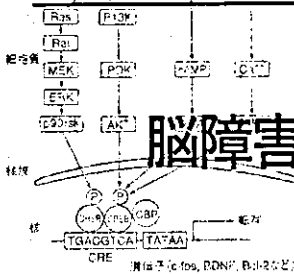
■ むすび

脳虚血あるいは脳梗塞モデルを用いた遺伝子治療の実験的研究の現況と今後の展開について筆者の見解を述べた。本稿で取り上げた遺伝子治療, 遺伝子制御手段の実用化には, 脳虚血病態の解明, 究明が不可欠であり, 安全性, 倫理面での配慮など乗り越えるべき課題も多い。しかし, 本治療法は分子レベルでの脳卒中診療を可能にする有望な治療手段であると筆者は考えている。

文 献

- Papadopoulos MC, Giffard RG, Bell BA. Principles of gene therapy: Potential applications in the treatment of cerebral ischemia. *Br J Neurosurg* 2000; 14: 407-14.
- Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, et al. Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci* 1996; 16: 486-96.
- Linnik MD, Zahas P, Geschwind MD, et al. Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke* 1995; 26: 1670-5.
- Lawrence MS, Sun GH, Kunis DM, et al. Overexpression of the glucose transporter gene with a herpes simplex vector protects striatal neurons against stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 181-5.
- Yenari MA, Fink SL, Sun GH, et al. Gene therapy with HSP 72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 1998; 44: 584-91.
- Yenari MA, Minami M, Sun GH, et al. Calbindin D28 K overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 2001; 32: 1028-35.
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, et al. Transforming growth factor- β 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* 2002; 22: 3898-909.
- Yang GY, Liu XH, Kadoya C, 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* 1998; 18: 840-7.
- Kitagawa H, Sasaki K, Sakai K, 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* 1999; 19: 1336-44.
- Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, et al. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 1997; 3: 997-1004.
- Yang GY, Pang L, Ge HL, et al. Attenuation of ischemia-induced mouse brain injury by SAG, a redox-inducible antioxidant protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 722-33.
- Abe K, Setoguchi Y, Hayashi T, et al. In vivo adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemic and reperfused rat brain. *Brain Res* 1997; 763: 191-201.
- Ooboshi H, Ibayashi S, Takada J, et al. Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain. Ischemic flow threshold for transgene expression. *Stroke* 2001; 32: 1043-7.
- Lawrence MS, McLaughlin JR, Sun GH, et al. Herpes simplex viral vectors expressing bcl-2 are neuroprotective when delivered after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 740-4.
- Shimazaki K, Urabe M, Monahan J, et al. Adeno-associated virus vector-mediated bcl-2 gene transfer into post-ischemic gerbil brain in vivo: Prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Gene Ther* 2000; 7: 1244-9.
- Tsai TH, Chen SL, Chiang YH, et al. Recombinant adeno-associated virus vector expressing glial cell line-derived neurotrophic factor reduces ischemia-induced damage. *Exp Neurol* 2000; 166: 266-75.
- Hayashi K, Morishita R, Nakagami H, et al. Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: In vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Gene Ther* 2001; 8: 1167-73.
- Hoehn B, Ringer TM, Xu L, et al. Overexpression of HSP 72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1303-9.
- Lin H, Lin TN, Cheung WM, et al. Cyclooxygenase-1 and bicitronic cyclooxygenase-1/prostacyclin synthase gene transfer protect against ischemic cerebral infarction. *Circulation* 2002; 105: 1962-9.
- Wahlestedt C, Golanov E, Yamamoto S, et al. Antisense oligonucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischemic infarctions. *Nature* 1993; 363: 260-3.
- Chen J, Simon RP, Nagayama T, et al. Suppression of endogenous bcl-2 expression by antisense treatment exacerbates ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1033-9.
- Shimizu S, Nagayama T, Jin KL, et al. bcl-2 antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 233-43.
- Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, et al. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 15-21.
- Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, 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* 2001; 21: 9204-13.
- Cao G, Pei W, Ge H, et al. In vivo delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2002; 22: 5423-31.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, et al. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 2001; 7: 1356-61.
- Liu J, Solway K, Messing RO, et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 1998; 18: 7768-78.
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 2001; 32: 1890-6.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002; 110: 429-41.

モデル動物と脳血管障害因子



脳障害阻止応答としての CREB リン酸化

北川 一夫

はじめに

脳に虚血・低酸素・低グルコース・酸化ストレスをはじめとした代謝ストレスが加わった場合、脳神経細胞は熱ショック蛋白質の産生をはじめとした各種のストレス応答を示すことが広く知られている。一方、CREB (cAMP response element binding protein) は脳、とくに神経細胞に豊富に存在する転写因子であり、神経細胞の生存維持、シナプス可塑性への関与が明らかになってきている。CREB は 133 番目のセリン残基がリン酸化されることにより活性化され、各種遺伝子のプロモーター領域に存在する CRE 配列に結合し、CRE を介した遺伝子発現をおこすことによりその機能を発現する。本稿では、生理的な状態でもみられる CREB リン酸化や CRE を介した遺伝子発現の、脳虚血をはじめとした脳損傷時における動態とその意義について、虚血モデルでの研究結果を中心に概説する。

CREB と CRE を介した遺伝子発現

各種の遺伝子のプロモーター領域には、CRE 配列 (TGACGTCA) が存在し、CREB ファミリーに属する転写因子 (CREB, cAMP response modulatory protein: CREM, activating transcription factor 1: ATF 1) はリン酸化による活性化を受けると、CRE 配列に結合し共役因子 CREB-binding protein (CBP) の存在下に CRE を介した遺伝子発現を引きおこす。中枢神経系では、CREB ファミリーの中でも CREB が最も豊富に存在し、生理的に重要な因子であると考えられている¹⁾。

CRE を介した遺伝子発現には、CREB のリン酸化が重要なステップとなるが、CREB リン酸化には多くの経路が関わっている。その概要を図 1 に示したが、大きくわけると神経栄養因子 (NGF)・脳由来神経栄養因子 (BDNF) などの栄養因子の受容体から Ras/ERK を介して 90 kDa ribosomal S-6 kinase-2 (Rsk 2)、または PI 3 K を介して Akt が CREB をリン酸化する経路、アデニルシクラーゼに共役した神経伝達物質の受容体を介して上昇した cAMP

により活性化されたプロテインキナーゼ A が CREB をリン酸化する経路、脱分極刺激により開口する電位依存性カルシウムチャンネルや Ca イオンチャンネルを有するグルタミン酸受容体 (おもに NMDA 受容体) を介して流入するカルシウムイオンにより活性化されたカルシウムカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) が CREB を

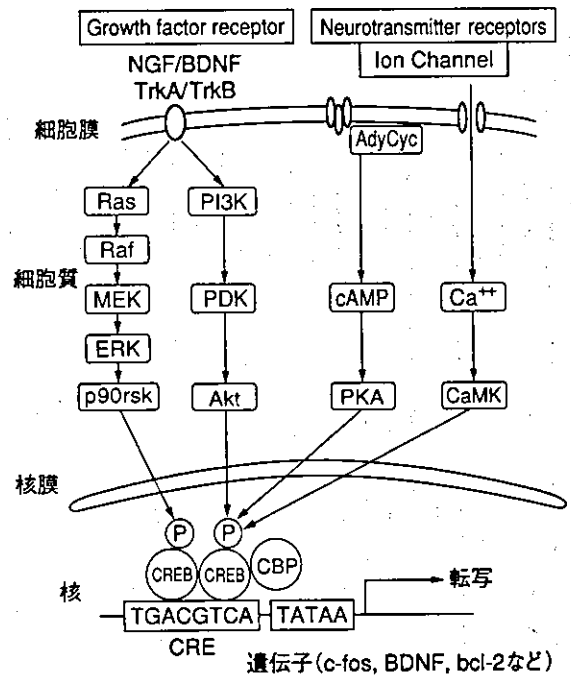


図 1 CREB リン酸化、CRE を介した遺伝子発現に関わる細胞内情報伝達経路

CRE を介した遺伝子発現には転写因子 CREB のリン酸化による活性化が必要だが、CREB リン酸化には、栄養因子受容体を介した MAP キナーゼ系・p 90 ribosomal S 6 キナーゼ (p 90 rsk)、PI 3 K/Akt 経路、神経伝達物質受容体を介したプロテインキナーゼ A、細胞内カルシウム流入に起因するカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) などが主な経路である。脳虚血、グルタミン酸負荷による CREB リン酸化は各種の阻害薬を用いた検討から、主として細胞内 Ca 流入に伴う CaMK が主要な役割を果たしていると考えられる。リン酸化された CREB は CRE 配列に結合し、共役因子 CREB-binding protein (CBP) の存在下に遺伝子発現を発動する。

きたがわ かずお 大阪大学大学院医学系研究科講師/病態情報内科学
大阪大学医学部附属病院/神経内科・脳卒中科
0289-0585/03/¥500/論文/JCLS

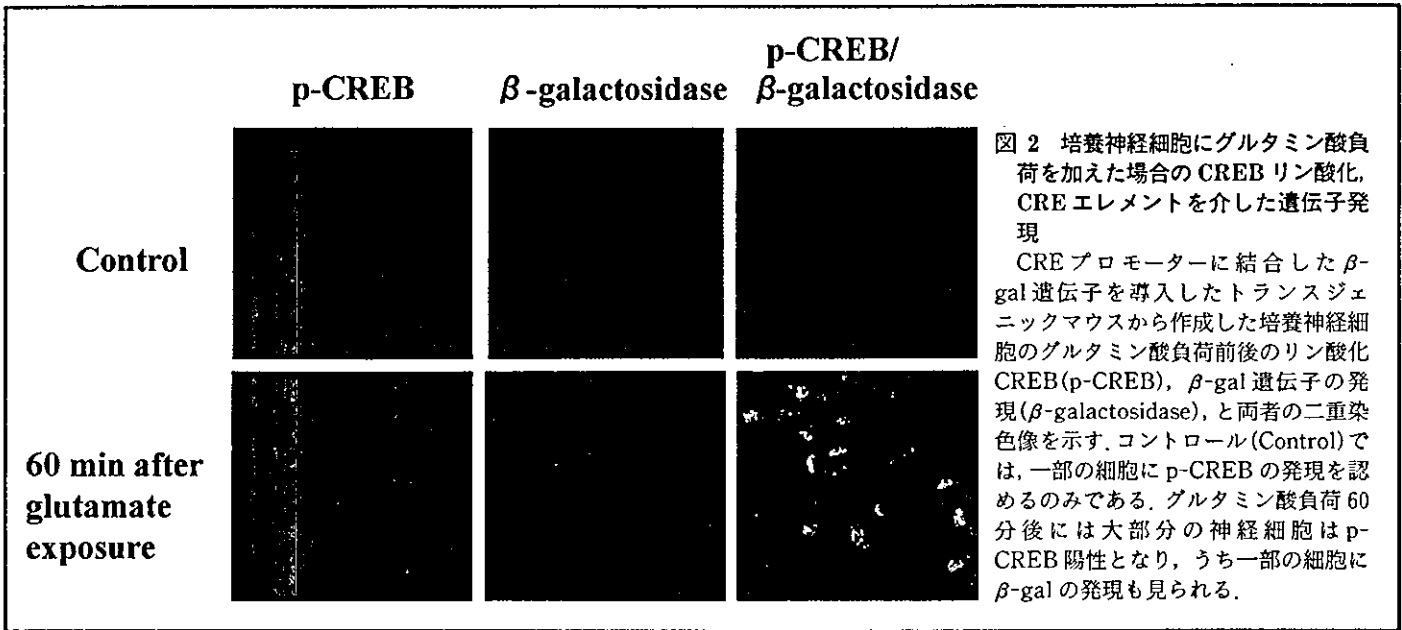


図2 培養神経細胞にグルタミン酸負荷を加えた場合のCREBリン酸化、CREエレメントを介した遺伝子発現

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から作成した培養神経細胞のグルタミン酸負荷前後のリン酸化CREB(p-CREB)、 β -gal遺伝子の発現(β -galactosidase)、と両者の二重染色像を示す。コントロール(Control)では、一部の細胞にp-CREBの発現を認めるのみである。グルタミン酸負荷60分後には大部分の神経細胞はp-CREB陽性となり、うち一部の細胞に β -galの発現も見られる。

リン酸化する経路があげられる²⁾。

リン酸化を受けたCREBが遺伝子のプロモーター領域のCRE配列に結合すると、共役因子であるCBPなどの存在下に、遺伝子発現を引き起こす。中枢神経系では、CREをプロモーター領域にもちCREを介して遺伝子発現をひき起こすことが知られているものとしては、プロトオンコジーンc-fos³⁾、アポトーシス抑制遺伝子bcl-2⁴⁾、BDNF⁵⁾、プレセニン1⁶⁾等が知られている。

神経細胞におけるCREBの関与

CREBの神経細胞生存維持への関与は培養神経細胞にアポトーシスを誘導する実験系で、神経栄養因子が神経細胞生存維持効果を発揮する上で、CREBリン酸化、CRE配列を介した遺伝子発現が重要であることから明らかにされてきた^{4,7)}。またCREBファミリーのCREBとCREMを発生初期に欠損させると、脳の広範な領域で神経細胞死が発生するが、Cre-loxPシステムを用いて生後にCREBを欠損させると海馬や線条体で神経細胞変性が進行することも報告され、CREを介した遺伝子発現が成熟動物脳の神経細胞の生存維持にも重要であることが示されている⁸⁾。一方、脳内で学習によって獲得される記憶のモデルとして、海馬でlong term potentiation(LTP)という事象があげられるが、同事象にCREBが関与していることや、最近ではコンディショナル変異技術を用いてCREBが短期記憶を長期記憶へと固定化するプロセスに関与していることが明らかになっている⁹⁾。このようにCREBは、脳神経細胞にとってその生存維持や神経可塑性に関与する重要な分子である。

脳損傷に際するCREBの動態とその意義

脳損傷とくに脳虚血に際するCREBの動態は、リン酸化CREBに対する抗体が普及した1996年ごろから精力的に検討されてきた。Waltonらは21日齢ラットの低酸素-片側総頸動脈閉塞モデルで、虚血に抵抗性を有する海馬歯状回神経細胞でCREBリン酸化の亢進が48時間後まで持続して見られるのに対し、虚血に脆弱な海馬CA1神経細胞では、CREBリン酸化のレベルは低下することを示した¹⁰⁾。そのちラットや砂ネズミの海馬で虚血再灌流後、神経細胞でCREBリン酸化が一過性に亢進すること¹¹⁾、ヒト脳梗塞に近い中大脳動脈閉塞モデルでは、虚血周辺部の神経細胞や脳梁に存在するオリゴデンドロサイトに持続してCREBリン酸化が観察されることが報告されている¹²⁾。また虚血脳でCREを介した遺伝子発現がおこっていることも、CREB欠損マウスで虚血周辺部でのc-fos遺伝子の発現が抑制されることから示されている¹³⁾。しかし脳虚血に際してみられるCREBリン酸化の亢進が、細胞の生存維持に関与しているという確証はない。我々は、砂ネズミ脳虚血モデルで虚血耐性を誘導する条件でCREBのリン酸化亢進がみられ、そのリン酸化をNMDA受容体拮抗薬投与で抑制すると虚血耐性現象が消失すること、神経細胞の虚血に対する脆弱性のモデルである培養神経細胞のグルタミン酸毒性の系において、CREBリン酸化亢進、CREを介した遺伝子発現(図2)、とくにbcl-2の発現をCREデコイオリゴヌクレオチドで抑制すると、グルタミン酸暴露後の神経細胞障害が増悪することを認めた(図3)¹⁴⁾。虚血やグル

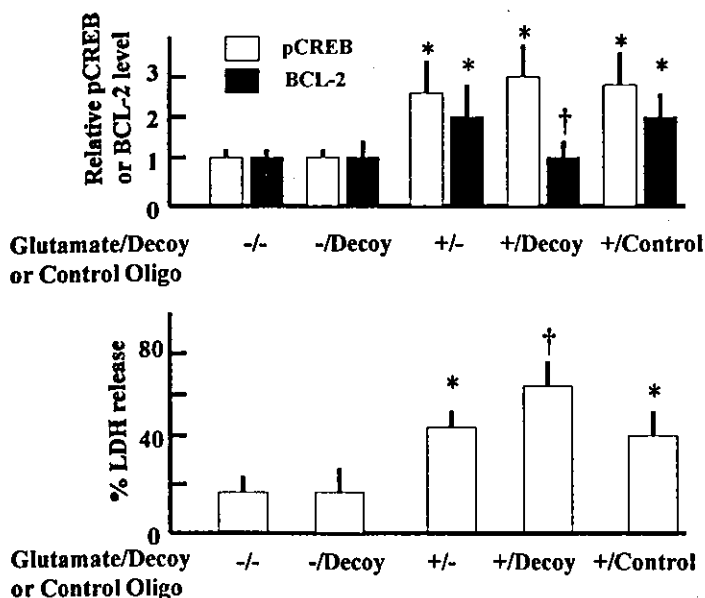


図3 培養神経細胞のグルタミン酸負荷に際する CREB リン酸化, BCL-2 産生, 細胞毒性に対する CRE デコイオリゴヌクレオチドの効果

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。

上段にはグルタミン酸負荷に際するリン酸化 CREB, アポトーシス抑制遺伝子 BCL-2 の発現量に対する CRE デコイオリゴヌクレオチド (Decoy) の効果を示す。グルタミン酸負荷に際する CREB リン酸化亢進は CRE Decoy で抑制されないが, BCL-2 の産生は CRE Decoy により有意に抑制される。

下段にはグルタミン酸負荷による神経細胞毒性に対する CRE Decoy の効果を示す。神経細胞の障害程度は LDH アッセイにより算出した。CRE Decoy の投与によりグルタミン酸毒性は有意に増強された。

コントロールオリゴヌクレオチド (Control) の導入は, グルタミン酸負荷による CREB リン酸化, BCL-2 産生, 神経細胞毒性に影響を与えなかった。

* $p < 0.05$ vs control, † $p < 0.05$ vs glutamate without oligonucleotide

タミン酸暴露など代謝ストレス下においてみられる CREB リン酸化亢進, CRE を介した遺伝子発現は, 神経細胞のストレスに対する防御反応の一環をみているものと考えられる。

■ むすび

神経細胞において CREB, CRE を介した遺伝子発現は一般的に細胞の生存維持に寄与していると考えられる。虚血に曝された神経細胞が不可逆的な損傷を受ける前に, CRE を介した遺伝子発現を亢進させ神経保護的な作用の

ある因子を内因性に産生することができれば, 虚血脳に対する保護効果を示す可能性がある。脳虚血の病態生理は複雑であり, 単独の保護因子, 薬剤でそのすべてを改善するのは困難であろう。脳が内在性に有する防御機構を最大限活用することは虚血耐性現象¹⁵⁾の存在で明らかのように, 従来の脳保護を目的とした薬剤治療を凌ぐ効果を有する。CRE を介した遺伝子発現は, 神経細胞に内在する防御機構の中核である可能性があり, 脳保護という観点からは, CRE を介した遺伝子発現を亢進することが将来の新規な治療法の開発につながる可能性が考えられる。

文献

- Walton MR, Dragunow M. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci* 2000; 23: 48-53.
- Finkbeiner S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 2000; 25: 11-4.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 1990; 4: 571-82.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, et al. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 1999; 43: 286: 2358-61.
- Shieh PB. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 1998; 20: 727-40.
- Matsuzaki N, Ohkubo N, Tamatani M, et al. Activated cAMP-response element-binding protein regulates neuronal expression of presenilin-1. *J Biol Chem* 2001; 276: 9688-98.
- Bonni A, Brunet A, West AE, et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 1999; 286: 1358-62.
- Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, et al. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature Genet* 2002; 31: 47-54.
- Kida S, Josselyn SA, de Ortiz SP, et al. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nature Neurosci* 2002; 5: 348-55.
- Walton M, Sirimanne E, Williams C, et al. The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. *Mol Brain Res* 1996; 43: 21-9.
- Hu BR, Fux CM, Martone ME, et al. Persistent phosphorylation of cyclic AMP responsive element-binding protein and activating transcription factor-2 translocation factors following transient cerebral ischemia in rat brain. *Neuroscience* 1999; 89: 437-52.
- Tanaka K, Nogawa S, Ito D, et al. Phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in oligodendrocytes in the corpus callosum after focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1177-88.
- Hiata R, Gass P, Mies G, et al. Attenuated c-fos mRNA induction after middle cerebral artery occlusion in CREB knockout mice does not modulate focal ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1325-35.
- Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, 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* 2001; 21: 9204-13.
- 北川一夫, 松本昌泰, 堀 正二. 脳虚血耐性発現のメカニズム. *Clin Neurosci* 1999; 17: 520-4.

10. 脳梗塞

F. 慢性期の治療

a. 再発予防(二次予防)

1) 危険因子の発見と管理*

● 寶學英隆** / 北川一夫**** / 松本昌泰****

Key Words : risk factor, stroke, recurrence

脳梗塞再発予防の重要性

脳卒中は、ひとたび発症すると非可逆的な身体障害を高率に引き起こす疾患であり、その一次予防がきわめて重要である。しかし、近年では、発症病態の軽症化や急性期医療の進歩により初回発作における急性期死亡率が減少してきており、脳卒中機能障害を有する再発予備軍に対する治療戦略の確立が重要になってきている。脳卒中後6カ月以上の生存例においては約半数の例で片麻痺を呈しており、約2割の例が歩行不能で、日常生活動作が自立している例は5割以下にすぎない。また、12~18%が失語を呈し、32%が臨床的にうつ状態に陥る¹⁾。卒中後1年以内の死亡率は25%に達する²⁾。さらに、他の疾病と比較した際の脳梗塞の再発率は高く、再発の度に上記のような一定の割合で機能障害が進行し、活動性や運動能力を次第に減退させ、ひいては直接死亡率を上昇させる。一方、再発における梗塞数や容積の拡大は血管性痴呆の発現と密接に関与し、同時に、老年痴呆へ進む引き金になりえることも報告されている。慢性期脳血管障害の内科的治療において再発予防対策はもっ

とも重要なテーマの一つであり、患者の不安を軽減させ、順調なりハビリテーションを進め、社会復帰を図る上でも欠かせない。

脳梗塞病型と再発率

長期的な卒中再発率は年4~14%とされている。梗塞再発は概して初回梗塞と同じ病型であり、その多くは前回発作の30日以内に多い。再発全体の30%がこの時期に起こるとも報告されている³⁾。また、脳梗塞病型によって、再発の危険率が異なることにも留意が必要である⁴⁾。脳梗塞の病型は、ラクナ、アテローム血栓性、心原性脳塞栓に分類されるが、ラクナ梗塞はもっとも再発率が低く、対してアテローム血栓性脳梗塞の再発率はもっとも高い。心原性脳塞栓はその中間の再発率とされている⁴⁾。近年、本邦ではアテローム血栓性脳梗塞の頻度が高まっている。Framingham研究でのアテローム血栓性脳梗塞における5年間の累積再発率は、男性で42%、女性では24%であり、男性優位であった⁵⁾。米国ロチェスターの研究では男女差なく29%であり⁶⁾、北部マンハッタン卒中研究においても25%と同程度である⁴⁾。

* Management of risk factors against stroke recurrence.

** Hidetaka HOUGAKU, M.D. & *** Kazuo KITAGAWA, M.D.: 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科, *** 神経機能医学(☎565-0871 吹田市山田丘2-2); Department of Internal Medicine and Therapeutics and *** Department of Clinical Neuroscience, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, JAPAN.

**** Masayasu MATSUMOTO, M.D.: 広島大学大学院病態探究医科学脳神経内科(第三内科); Department of Clinical Neuroscience and Therapeutics, Hiroshima University, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima, JAPAN.

表1 脳梗塞病型と機序, 症状, 原因疾患, 危険因子

	ラクナ	アテローム血栓性	心原性脳塞栓
機序	多くは血栓性	血栓性・塞栓性・血行力学性	塞栓性
発症様式	段階的	段階的・突発的	突発的
症状	ラクナ症候群	皮質症状を含むことが多い	皮質症状を含むことが多い
原因疾患, 危険因子や引き金	加齢, 高血圧, 糖尿病, 脱水, 左室肥大, 眼底変化, 肥満	加齢, アテローム硬化性病変, 高脂血症, 糖尿病, 高血圧, 喫煙, 脱水	加齢, 心房細動, 心筋梗塞や他の心疾患, 脱水
特に参考になる検査	MRI, 24時間携帯型血圧計	頸動脈エコー, MRアンギオ, 経食道心エコー	心エコー, 経食道心エコー, ホルター心電図
慢性期治療の中心	危険因子の管理, 場合によって抗血小板療法	抗血小板療法, 危険因子の管理, (血栓内膜剥離術)	抗凝固療法, 危険因子の管理

初回発作の発症原因の検索の重要性

初回脳梗塞発症の背景には, 発症準備状態の形成と, 発症の引き金が存在する. 初回発作の発症原因や引き金を検索し, それを除去することが再発予防にもっとも効果的である. さらに, 脳梗塞は多因子疾患であり, 多くの危険因子の合併は脳梗塞発現において相乗効果を有することから, 考えられる危険因子全体についての洗い直しも必要とされる. 高血圧や糖尿病などの一般的な脳卒中危険因子については検診でも指摘され, 関心を持っている人も多いが, 重症頸動脈病変の合併, 発作性心房細動, 高ホモシステイン血症など, 検診レベルでは検出されない脳梗塞危険因子も多く, 脳梗塞患者の再発予防においては, その検索は必須である.

脳梗塞危険因子は脳梗塞病型と密接に関係していることから, 初回発作の病態を精査し, 病型を決定することが, 合併した危険因子を推測するにも有用である(表1). とりわけ, 実地診療においては, 初回発作前後の詳細な病歴聴取がきわめて重要である. 脳梗塞の既往を有する患者の多くは全身に系統的な動脈硬化を呈していることが多く, 複数の病型の可能性が重複し, 決定に難渋することも多いが, 発症様式や機序の正確な把握は病型決定のヒントになることが多い. たとえば, 梗塞発症前から一過性に, 血圧下降時(入浴中や食後など)に神経症候が繰り返し出現していれば, 血行動態性の機序が強く示唆される. すなわち, 頭蓋内・外の頸動脈や頭蓋内主要動脈の高度狭窄病変の存在が強く疑われ, アテローム血栓性脳梗塞疑いとして, 頸

動脈エコーはもちろんのこと, MRアンギオや脳血流検査の適応となる. 初回発作が皮質症状を含む脳塞栓症であれば, アテローム血栓性と心原性脳塞栓の可能性が考えられ, ホルター心電図や経食道心エコーなどを含めた心原性脳塞栓症の鑑別検査を速やかに実施する必要がある. 心原性脳塞栓症の場合には, 発症2週間以内での再発が多いことから早期の病型確定と治療開始が必要とされるからである.

一次予防と二次予防

アメリカ心臓協会(AHA)は近年, 種々のscientific statementを発表している¹⁾. 特に, 1999年のstatementでは脳梗塞の再発予防について言及しており, その中の「一般危険因子の管理」(表2²⁾)では, 危険因子を原則的には一次予防と同程度の正常域に是正することを推奨している. 実際には個々の危険因子に関して, そのような管理方法が再発を抑制すると大規模比較試験で証明されているわけではない. 本来は, 一次予防と二次予防には, 適応, 至適管理レベルなどにおいて異なってくる可能性がある. たとえば, 一次予防法としては, 確立していない理由から未管理ないしは管理不十分であった因子に対しても, それ以外に明らかな発症リスクが認められない場合には, 二次予防では管理を始める場合がある. また逆に, 一次予防の有用性が確立した危険因子では, 近年その管理目標値は次第に厳格になっていく傾向にあるが, 危険因子によっては二次予防としてはむしろ過剰にならないかという問題も生じる. さらに, 前述のように, 脳梗塞の危険因子として確立している因子