

## 虚血性脳損傷に対する細胞適応現象 虚血耐性現象の脳卒中臨床への応用を目指して



医療と技術

北川 一夫\*

"Adaptive Response for Ischemic Brain Insult  
- Clinical Application of Ischemic Tolerance -"

Key Words : cerebral ischemia, stroke, ischemic tolerance, arteriogenesis

### 1 : はじめに

脳卒中の死亡率は1970年代をピークとして減少し、現在は悪性腫瘍、虚血性心疾患に次いで第3位であるが、ここ10数年は横ばい状態であり毎年約13万人が脳卒中で亡くなっている。脳卒中は大きく脳実質内で出血する脳出血、脳動脈瘤がクモ膜下腔で破綻するクモ膜下出血、脳血管が閉塞し虚血状態となる脳梗塞に分けられるが、本邦の脳卒中データバンクの調査によると脳卒中全体の約7割が脳梗塞である。本邦でも2005年10月に脳梗塞急性期の画期的治療薬として組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)が認可され、大阪大学医学部附属病院でも脳卒中急性期症例に対するチーム医療を実践する組織として脳卒中センターが開設され、すでに12例の症例にtPA療法を施行し良好な結果を得ている。しかし発症3時間以内に限定される本療法の恩恵を受けられる症例は全体の一部であり、大多数の症例では虚血侵襲を軽減するための何らかの治療手段の開発が望まれている。

脳梗塞の基礎病態は脳虚血であり、脳梗塞基礎研究の大きなテーマは、如何にして脳組織を虚血侵襲から守るか、虚血による損傷を被った組織を如何にして再生させ後遺症を軽減させるか という2点に集約されると考えられる。脳は全身臓器の中でも虚血侵襲に最も脆弱な組織、細胞であるが、筆者は、

脳組織、神経細胞自身が虚血侵襲に抗して生存し続けるべく何らかの適応現象を発揮しているはずであり、この適応現象を誘導、増強、補助するような治療手段を開発できれば脳梗塞治療の画期的進展につながる という信念のもと1980年代後半から基礎研究を進めてきた。本稿では、筆者のこれまでの研究成果を紹介しつつ、脳虚血に対する細胞適応現象として 虚血耐性現象、内因性神経細胞新生、脳側副血行路発達の3点について触れてみたい。

### 2 : 虚血耐性現象の発見とその分子機構

脳のなかでも海馬は特に虚血侵襲に対して脆弱な領域であり、5分間の虚血でも海馬CA1錐体細胞は4日以後に選択的に死滅し、遅発性神経細胞死と呼ばれている。しかし神経細胞は虚血侵襲に曝されるとストレス蛋白質をはじめ様々な遺伝子の発現を誘導し、ストレス応答を生じていることが1980年代半ば頃より明らかにされてきた。筆者はストレス応答は本来代謝ストレスから細胞が生存し続けるための生体応答である点に注目し、神経細胞にとってはストレスとなるが死滅しない程度の虚血侵襲を前もって加えておくことにより、その後の強い虚血侵襲に対する抵抗性が獲得される現象として、虚血耐性現象を発見、報告した。<sup>1)</sup>その後、異なる動物種、様々な虚血モデル、培養神経細胞での虚血モデルでも本現象が確認され(図1) さらにヒト脳梗塞症例でも前もって一過性脳虚血発作を前駆していると虚血耐性が誘導される事が複数の研究者により報告、示唆されている。<sup>2)</sup>現在、実験動物での脳虚血モデルにおいて最も確実な再現性のよい保護効果が確認される手段は、低体温療法と虚血耐性現象 である事は多くの研究者の一致した見解である。

つぎに筆者らのグループを含め世界中の多くの研究室で虚血耐性に関わる因子の発見、同定が試みら



\*Kazuo KITAGAWA

1958年12月生まれ  
大阪大学医学部卒業(1983年)  
現在、大阪大学大学院医学系研究科・  
神経内科学(脳卒中センター) 准教授、  
医学博士、専門分野：脳卒中  
TEL : 06-6879-3571/3634  
FAX : 06-6878-6574  
E-mail : kitagawa@medone.

med.osaka-u.ac.jp

れた。その過程で筆者らもHSP110ファミリーの一つで新規ストレス蛋白質であるirp94(ischemia responsive protein)をクローニングし<sup>3)</sup>、他の研究室からも虚血により誘導される新規蛋白質の報告が相次いでなされたが、虚血耐性に特異的に関与する遺伝子を同定することはできなかった。その理由として筆者は二つの要因を考えている。

一つは虚血ストレスが単一なストレスではなく複数の要因が組合わさっている点が挙げられる(図2)。虚血ストレスは脳では大きく低酸素ストレス、酸化ストレス、興奮性アミノ酸ストレスから構成されており、各々により活性化される転写因子、その下流に存在する遺伝子も多数存在する。培養神経細胞での虚血耐性モデルでは、これらすべての転写因子が個別に検討され、虚血耐性現象への関与が示唆されている。筆者らは神経細胞に豊富に存在し記憶、細胞生存、シナプス可塑性、突起進展など重要な機能に関与する転写因子CREBの活性化に注目し、脳虚血に際する分子動態を検討している。CREBを介した遺伝子発現は虚血ストレス、低酸素ストレスで明らかに亢進しており、その遺伝子発現をCREデコイオリゴヌクレオチドで抑制すると神経細胞障害が増強されることから、細胞生存のための重要なシグナル分子であると考えている(図3)<sup>5)</sup>

他の要因は、虚血耐性を誘導した条件下でのcDNAマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを検討した研究結果より、虚血耐性獲得下で重度の虚血侵襲が加わった場合には発現が増加する遺伝子より低下する遺伝子の数の方が圧倒的に多いことが示されたからである。<sup>6)</sup> 発現が低下する遺伝子としてはエネルギー代謝に関わる多くの遺伝子が同定された。すなわちエネルギー代謝の抑制が虚血耐性に関わっているのではないかと考えられるようになってきた。このことは、エネルギー代謝低下を誘導し、虚血に対して耐性を誘導する低体温、冬眠と虚血耐性現象が共通項を有している可能性を示している。2007年度の米国脳卒中学会のシンポジウムで“Metabolic Downregulation”がテーマとして取り上げられ、その中で筆者は虚血耐性の臨床応用について発表した。今後は虚血耐性の分子機構として誘導される因子のみならず発現が抑制される因子についても注目していく必要がある。実際、薬理学的な応用を考えた場合、虚血耐性に際して発現が抑制

される遺伝子の方が、阻害薬の開発など臨床応用に適していると考えられる。

### 3：内因性神経細胞新生

成熟動物脳において、側脳室下層、海馬歯状回に神経幹(前駆)細胞が存在し、嗅球、海馬で持続的な神経細胞新生が生じていることは20年以上前から指摘されていた。この内因性神経細胞新生能を虚血侵襲後の脳に応用して、脳梗塞により死滅した神経細胞の一部を補填し神経後遺症の軽減を目指しているのが本研究の主旨である。脳虚血モデルで海馬神経細胞新生を最初に報告したのはLiuらであったが<sup>7)</sup>、筆者等は神経幹細胞の選択的マーカーMusashi-1に対する抗体を用いてラット海馬歯状回顆粒細胞において虚血侵襲後に神経幹細胞の分裂、増殖が亢進し、神経細胞新生が促進されることを報告した。<sup>8)</sup> しかし、内因性神経細胞新生が脚光を浴びたのは、本来神経細胞新生が生じないとされていた海馬CA1領域、線条体において虚血侵襲により神経細胞が脱落、死滅したあとに神経細胞が新生される事が2002年に報告されてからである。<sup>9)</sup> さらにこの虚血侵襲後の神経細胞新生は神経栄養因子の脳室内持続投与により促進されることも明らかになり、俄然治療の応用の可能性が脚光を浴びるようになった。こういった状況下で筆者等のグループは、虚血後の神経細胞新生を亢進する手段として遺伝子治療が適用できないかどうか検討してきた。その根拠は、(1)神経細胞新生は、虚血発症後言い換えれば脳梗塞完成後の治療介入が可能であり臨床応用に適していること、(2)脳内へ神経栄養因子を投与するには脳室内への持続的な投与が必要であり侵襲性が高いのに対して、遺伝子治療を応用すれば単回の投与で持続的な蛋白産生が期待できること が考えられた。ラット中大脳動脈閉塞2日以後には脳梗塞サイズはほぼ完成しているが、3日目に脳室内へヘパリン結合性上皮由来成長因子様栄養因子(HB-EGF)遺伝子を含むアデノウイルスベクターを単回投与すると、側脳室下帯での神経幹細胞の分裂、増殖が亢進し、1ヶ月後には脳梗塞周辺の線条体で新生された神経細胞が観察され、それに伴いロタロッドテストで観察した運動機能の改善効果も観察された(図4)<sup>10)</sup>。またリボソーム含有のプラスミッド遺伝子は単核球、マクロファージにより貪食される。脳梗塞では正常

な脳組織では観察されない大量のマクロファージが流血中の単核球から流入、集積し病態を修飾している。このマクロファージを病変局所への遺伝子の担体として利用できないかとの考えから脳梗塞発症2日目に大腿静脈よりリポフェクチンと混和したFGF-2遺伝子プラスミドベクターを投与すると脳梗塞病巣に集積する一部のマクロファージに外来性遺伝子の発現が見られ側脳室下帯での神経幹細胞の分裂、増殖が亢進した。<sup>11)</sup>

これまで虚血侵襲後の神経細胞新生促進を図る上で、神経幹細胞の分裂、増殖を亢進させることが注目されてきたが、虚血脳では分裂、増殖した新生細胞の半数以上が成熟神経細胞になることなく死滅している。申請者らは新生神経細胞の死滅過程にアポトーシスが関与していること、抗アポトーシス作用のあるBcl-2を過剰発現すると新生細胞の生存が促進されること、新生細胞の生存過程にCREBリン酸化を介した遺伝子発現が関与していることを報告してきている。<sup>12)</sup>

内因性神経細胞新生は脳卒中臨床への再生医療の応用に際して最も倫理的な支障はないが、今後は如何に非侵襲的に神経幹細胞の分裂、増殖を促進し、病変局所への遊走、神経細胞への分化、新生細胞の生存維持、神経回路の再構築を計るかが重要な課題と考えられ、遺伝子治療がこの領域に応用される可能性があると考えられる。

#### 4：脳側副血行路発達を介した

##### 適応現象-Arteriogenesis-

最後に我々が脳組織の虚血に対する内因性適応現象で、脳梗塞病態に深く関わると考えている脳側副血行路発達-Arteriogenesis-について紹介したい。脳卒中急性期の臨床現場に携わる医師は、同じ主幹動脈(内頸動脈や中大脳動脈など)閉塞の症例でも、生命を失うほど重篤な虚血を呈するものから、全く症状がないか、あっても一過性脳虚血発作程度の軽度の症状しか呈さないものまで様々であるのによく驚かされる(図5)。これは脳ウイリス動脈輪および脳軟膜動脈吻合を介した側副血行路発達の程度の違いに起因している。一般的には、側副血行路の発達は血管が閉塞に至るまでのスピードに依存していると考えられ、塞栓症ではいきなり血管が閉塞するので該当血管灌流領域全域が梗塞に陥りやすいのに対し

て、血栓症では時間をかけて血管が閉塞するので側副血行路が発達し重度の虚血を免れる場合が多い。このように脳側副血行路発達は臨床的に重要であるにも関わらず、これまで脳血管でのArteriogenesisの分子メカニズムはほとんど検討されていない。我々は脳血管とくに脳軟膜動脈レベルでの側副血行路発達を内因性に誘導し虚血侵襲を軽減するモデルを開発した(図6)<sup>3)</sup>。あらかじめ一侧の総頸動脈を閉塞し慢性低灌流状態にした上で、同側中大脳動脈を閉塞すると無処置群に比し血管閉塞に際し残存血流が有意に保たれ脳梗塞サイズも激減することを観察した。この際に脳軟膜動脈レベルでの吻合血管口径が拡大するが、この拡大は顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)の投与により促進されることを認めた。<sup>14)</sup> 現在、他動物種(ラット)での同様なArteriogenesisの観察、低灌流脳で誘導されるArteriogenesisの分子メカニズムの解明に取り組み臨床応用を目指している。

#### 5：おわりに

これまで筆者らのグループが、脳組織の虚血侵襲に対する内在性適応現象に関して行ってきた研究成果を中心に紹介した。今日、脳卒中急性期診療の進歩はめざましいものがあり、一旦発症すれば救急車を呼んでできるだけ速やかに脳卒中診療の充実した施設でtPA療法(発症3時間以内)を含めた適切な治療を受けることが機能予後改善に肝要である。脳卒中の特徴的な症状としては、突然発症した片側上下肢の運動麻痺、しびれ、言葉がでない、上手く喋れないといった言語障害、今まで経験したことのない激しい頭痛などがわかりやすく、こういった症状があればできるだけ早くに病院を受診すべきである。しかし、脳卒中撲滅には何と言っても予防が最も効果的な手段であり、高血圧をはじめとした生活習慣病の予防、管理、心房細動などの不整脈の早期発見、治療が重要である。また脳卒中と並んで頻度が多く社会的問題になっている認知症の原因にも血管性危険因子が関与していることが明らかになってきているので<sup>15)</sup>、脳卒中を予防するための脳血管保護は認知症予防にも効果的であると考えられる。

図の説明

図1：脳虚血耐性現象

A, Bは砂ネズミ両側総頸動脈5分間閉塞再灌流7日目における抗微小管結合蛋白質2抗体を用いた海馬での免疫染色像を示す。Bはあらかじめ2日前に2分間の非致命的虚血負荷を加えておいた動物を示す。無処置動物では、海馬CA1領域に一致した神経細胞の脱落を認めるが、あらかじめ2分間の虚血負荷を加えておくと、同領域の神経細胞はその後に加わる5分間の虚血に対して抵抗性を獲得するようになる(虚血耐性現象)。C, Dはマウス中大脳動脈60分間閉塞再灌流7日目におけるTTC染色像を示す。Dはあらかじめ3日前に15分間の中大脳動脈閉塞を行った動物を示す。Dの前処置群では脳梗塞サイズが縮小している。

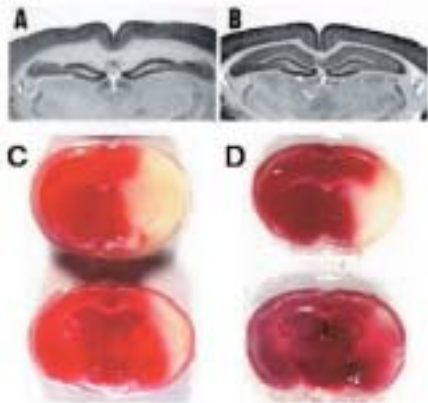


図2：虚血ストレスと遺伝子発現の関係<sup>4)</sup>

虚血ストレスを遺伝子発現の引き金と考えた場合、大きく低酸素ストレス、酸化ストレス、興奮性アミノ酸ストレスに大別されると考えられる。各ストレスに対して主として活性化される転写因子、その転写因子によって発現が亢進する遺伝子を矢印で示した。HIF: Hypoxia-inducible factor, NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B, HSF: Heat shock factor, CREB: cyclic AMP-responsive element binding protein, VEGF: Vascular endothelial growth factor, EPO: Erythropoietin, IGF: Insulin-like growth factor, TNF $\alpha$ : tumor necrotizing factor  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ : Interleukin 1 $\beta$ , HSP: Heat shock protein, BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

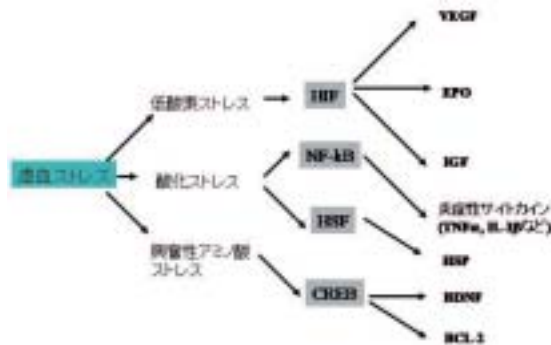


図3：グルタミン酸負荷時の神経細胞生存維持機構としてのCREB活性化<sup>5)</sup>

培養神経細胞はグルタミン酸刺激に際してCREBリン酸化、CREを介した遺伝子発現を示す。グルタミン酸負荷時のCREを介した遺伝子発現をCREデコイオリゴヌクレオチド(CREデコイオリゴ)の投与により抑制しておくと、グルタミン酸負荷後の生存神経細胞数が減少する。図は左から対照、グルタミン酸負荷後、CREデコイオリゴ投与下のグルタミン酸負荷後の生存神経細胞を抗微小管結合蛋白質2抗体を用いた免疫細胞染色像を示す。

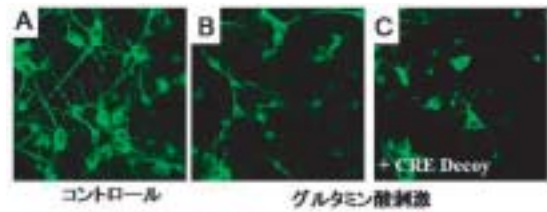


図4：脳梗塞発症3日後のHBEGF遺伝子導入による神経細胞新生亢進<sup>10)</sup>

Aは脳梗塞発症後側脳室への遺伝子導入を示す。ボックスは梗塞境界部を示す。Bはコントロールアデノベクター( $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子)を側脳室に投与し1日後のX-gal染色像を示す。側脳室壁における外来性遺伝子発現が確認される(矢印)。CはBrdU標識1日後における側脳室周囲でのBrdUと神経幹細胞マーカーであるネスチンの二重陽性細胞(矢印で示す)を示す。DはHB-EGF遺伝子投与したマウスでのBrdU投与28日目におけるBrdUと神経細胞マーカーであるNeuNの二重陽性細胞を示す。コントロールアデノベクターでは、BrdU, NeuN二重陽性細胞はほとんどみられないが、HB-EGF遺伝子導入すると有意に神経細胞新生が亢進された。

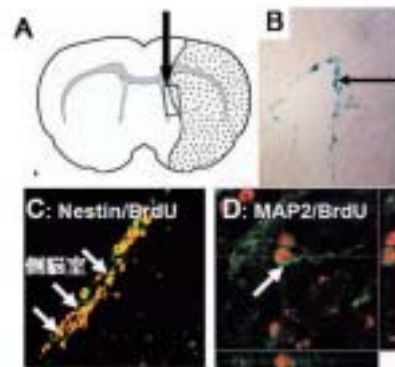


図5：脳軟膜動脈吻合を介した側副血行路発達の相違 塞栓性と血栓性

図左は塞栓性に、図右はアテローム血栓性に中大脳動脈閉塞したヒト症例の血管造影像(上段)、脳血流画像(下段)を示す。同じ中大脳動脈閉塞にもかかわらず、左の塞栓性では中大脳動脈灌流領域が重度の虚血に曝されているのに対して、右の血栓性では残存血流が良く保たれている。

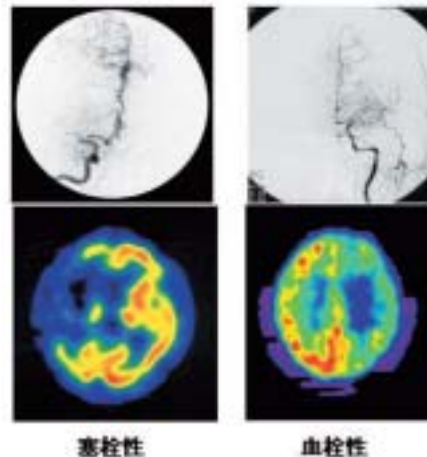


図6：慢性低灌流負荷によるArteriogenesisの促進<sup>14)</sup>

図左は対照群マウス、図右は左総頸動脈を閉塞し2週間後のマウスの脳軟膜動脈吻合程度を示す。対照群に比し総頸動脈閉塞群では、中大脳動脈と前大脳動脈の境界領域の脳軟膜動脈吻合血管径が拡大している( )。



文献

- 1 . Kitagawa K, et al., (1990) Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528: 21-24.
- 2 . Gidday JM (2006) cerebral preconditioning and ischemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 7:437-448.
- 3 . Yagita Y, et al., (1999) 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* 72: 1544-1551.
- 4 . Kitagawa K. (2007) CREB and CRE-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS Journal*, 274: 3210-3217, 2007
- 5 . Mabuchi T, et al., (2001) Phosphorylation of CREB in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate and ischemia in vivo. *J Neurosci* 21:9204-9213.
- 6 . Stenzel-Poore MP et al., (2003) Effect of ischemic preconditioning on genomic response to cerebral ischemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* 362: 1028-1037.
- 7 . Liu J et al., (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18: 7768-7778.
- 8 . Yagita Y, et al., (2001) Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 32: 1890-1896.
- 9 . Nakatomi H et al., regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110: 429-441, 2002
- 10 . Sugiura S, et al., (2005) Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) enhances neurogenesis and angiogenesis following focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 36:859-864.
- 11 . Tanaka S, et al., (2004) Infiltrating macrophages as in vivo targets for intravenous gene delivery in cerebral infarction. *Stroke* 35: 1968-1973.
- 12 . Sasaki T, et al., (2007) The phosphodiesterase inhibitor rolipram promotes survival of newborn hippocampal neurons after ischemia. *Stroke*, 38:1597-1605.
- 13 . Kitagawa K, et al., (2005) Chronic mild reduction of cerebral perfusion pressure induces ischemic tolerance in focal cerebral ischemia. *Stroke*, 36: 2270-2274.
- 14 . Todo K, et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances leptomeningeal collateral growth induced by common carotid artery occlusion. *Stroke*, in press.
- 15 . 北川一夫。(2006) 脳血管性認知症とアルツハイマー型認知症 脳血管病の観点から。 *血管医学* 7:141-147。