

虚血性脳障害と肝細胞増殖因子

竹尾 聡,* 高木 教夫, 高木 慶子

Ischemic Brain Injury and Hepatocyte Growth Factor

Satoshi TAKEO,* Norio TAKAGI, and Keiko TAKAGI

Department of Molecular and Cellular Pharmacology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji City 192-0392, Japan

(Received July 19, 2007)

Cerebral ischemia causes an irreversible and neurodegenerative disorder that may lead to progressive dementia and global cognitive deterioration. Since the overall process of ischemic brain injuries is extremely complex, treatment with endogenous multifunctional factors would be better choices for preventing complicated ischemic brain injuries. Hepatocyte growth factor, HGF, is a multifunctional cytokine originally identified and purified as a potent mitogen for hepatocyte. The activation of the c-Met/HGF receptor evokes diverse cellular responses, including mitogenic, morphogenic, angiogenic and anti-apoptotic activities in various types of cell. Previous studies showed that HGF and c-Met were expressed in various brain regions under normal conditions and that HGF enhanced the survival of hippocampal and cortical neurons during the aging of cells in culture. The protective effects of HGF on *in vivo* ischemic brain injuries and their mechanisms have not fully understood. To elucidate therapeutic potencies of HGF for ischemic brain injuries, we examined effects of HGF on ischemia-induced learning and memory dysfunction, neuronal cell death and endothelial cell damage by using the 4-vessel occlusion model and the microsphere embolism model in rats. Our findings suggested that treatment with HGF was capable of protecting hippocampal neurons against ischemia-induced cell death through the prevention of apoptosis-inducing factor translocation to the nucleus. Furthermore, we demonstrated that HGF had the ability to prevent tissue degeneration and improved learning and memory function after cerebral embolism, possibly through prevention of cerebral vessel injuries. As HGF has a potent cerebroprotective effect, it could be a prospective agent for the therapy against complicated ischemic brain diseases.

Key words—cerebral ischemia; hepatocyte growth factor; learning dysfunction; cell death; cerebral vessel injury

1. はじめに

脳血管障害は脳に生じた血管障害の総称で、脳梗塞、脳出血、脳動脈瘤、無症候性の脳血管病変なども含まれる。脳血管障害の中でも病型別頻度は脳梗塞が約70%と最も高い。脳梗塞には大血管のアテローム硬化が病因とされるアテローム血栓性脳梗塞、心疾患が主な病因とされる心原性脳塞栓症、穿通枝の動脈硬化や微小粥腫が病因とされるラクナ梗塞があるが、いずれも血栓や塞栓を介して脳動脈が閉塞することで発症する。

脳動脈が閉塞するとその血管支配領域への血液供

給が遮断されるため、脳実質は壊死し、障害部位に応じた症状を呈する。また血液脳関門の破綻により生じる脳浮腫や脳出血は、その後の梗塞巣拡大につながると考えられている。さらに、脳梗塞後遺症として脳血管性認知症の招来が懸念される。Hachinskiらは脳血管性認知症の本態は多発梗塞であることを指摘した。¹⁾そのため、この疾病は国際疾病分類では多発梗塞性認知症 (multi-infarct dementia) に所属する。多発梗塞性認知症は進行性であるため、記憶・学習能障害は悪化の一途を辿るとされている。このように、脳血管性障害の発症は医療的・社会的に重大であるにも係わらず、その治療薬は極めて少ないのが現状である。

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は肝再生因子として発見された増殖因子である。HGFは上皮系細胞の増殖促進、遊走促進、形態形

東京薬科大学薬学部分子細胞病態薬理学教室 (〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1)

*e-mail: takagino@ps.toyaku.ac.jp

本総説は、平成18年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

成誘導因子を活性化するため、²⁻⁵⁾ 肝臓を始め、腎臓や肺、消化管などの様々な臓器において組織修復を司り、その生理的機能を発揮する。例えば、肝炎や急性腎不全の障害に反応して HGF が誘導され、上皮細胞の増殖、形態形成、血管新生が起こり障害臓器の機能が回復する。一方、肝硬変や慢性腎不全では HGF の産生が抑制されて、組織繊維化、臓器不全症が進行してしまう。そのため HGF の体内での活性はその病態に大きく影響すると考えられる。このように生体組織が備え持つ自己修復能を HGF が高めることで自然治癒誘導・病態改善をもたらすことが実証されてきており、組織再生因子 HGF の投与は脳虚血や難治性神経変性疾患に対する画期的な治療戦略として期待されている。

本稿では、近年筆者が力を注いできた虚血脳障害に及ぼす肝細胞増殖因子の効果とその機序に関する研究結果を紹介したい。

2. 脳虚血モデル

脳梗塞は、日本では罹患率が高く、その後遺症発現は社会的問題にもなっている。脳梗塞疾病の病態解明や治療薬開発にはヒト病態類似の動物モデルの使用が適切と考えられる。筆者らはこれまで主にラットマイクロスフェア脳塞栓モデルを使用し脳虚血病態の把握と薬物評価を行ってきた。マイクロスフェア塞栓 (microsphere embolism; ME) により誘発される脳虚血病態は血管閉塞機序の点からも多発性梗塞などの慢性的脳虚血障害に類似したところが多いと考えられ、その有用性が期待されている。この ME モデルは重篤な組織学的、生化学的、機能的病態を中心とした不可逆的脳障害を発生する。例えば、持続的脳血流低下、⁶⁾ 脳エネルギー産生障害、⁷⁾ 脳組織興奮性及び抑制性アミノ酸濃度の低下、⁸⁾ 脳組織モノアミンの減少、⁹⁾ 細胞内情報伝達系の障害¹⁰⁻¹²⁾ などが観察される。組織学的には、広範な小梗塞が大脳皮質、海馬、線条体などに発生するため、ヒト多発性梗塞を模倣すると考えられている。^{13,14)} 以下にこの ME モデルを始め、種々の病態モデルを駆使し、高次中枢機能障害、神経細胞死、梗塞巣形成、脳血管形成及び血液脳関門破綻に対する HGF の効果とその機序について述べたい。

3. 脳塞栓誘発記憶・学習能障害に及ぼす肝細胞増殖因子 (HGF) の効果

現在、ラットやマウスなど小動物を用いた記憶・

学習能解析には様々な方法が考案されている。中でも Morris により創案された空間記憶・学習能試験の 1 つ水迷路試験は空間認知を測定する優れた試験法として多くの動物実験モデルで汎用されている。¹⁵⁾ この試験は動物が嫌悪刺激である水から逃避するためにプール周囲の空間的手掛かりを基に、自分の存在位置を認識して水面直下に存在するみえない避難場所 (プラットホーム) を探し出す、すなわち動物が認知地図を脳内に形成する記憶・学習能を評価する実験方法である。

脳梗塞が生じると高次中枢機能にも影響を与えることは言うまでもない。実際、脳血管性認知症を模倣するとされる ME モデルでは空間認知型の記憶障害が観察される。¹⁶⁾ そこで筆者らは ME で誘発される記憶障害に及ぼす HGF の効果を検討した。^{17,18)}

ME モデルは右外頸動脈及び右翼突口蓋動脈を一時的に閉塞後、右総頸動脈内に直径 48 μm のマイクロスフェア 700 個を注入して作製した。HGF は浸透圧ミニポンプを用いてマイクロスフェア注入後 10 分目から右脳室内に 7 日間持続投与した。空間記憶・学習の獲得試験 (acquisition test) は、1 日当たりの trial 数を 3 回とし、試験は 3 日間 (脳塞栓後 12-14 日目) 連続して延べ 9 回行った。さらに脳塞栓後 21 及び 28 日目に獲得試験での記憶が保持されているのかを調べる目的で保持試験 (retention test) を試行した。

記憶・学習能実験では検討項目に直接関与しない要因が結果になんらかの影響を及ぼすことが危惧される。水迷路試験では、運動能力 (遊泳能力) や視力がそれに当たり、この要因の検討は不可欠である。この点を鑑み、運動能力に影響を及ぼす神経欠損症状及び体重変化を測定した結果、術後 1 日目の神経欠損症状は ME 群及び HGF 投与群で同程度であった。その後、この神経欠損症状は徐々に消退し、術後 7 日目には両群ともほとんど症状が認められなかった。体重も術後 8 日目にはどの群も初期値まで回復していた。したがって、ME モデルにおける記憶・学習能の検討は術後 8 日目以降ならば可能であると判断した。事実、術後 28 日目までの獲得及び保持試験での偽手術 (Sham) 群、ME 群、HGF 投与群の遊泳速度に差はなかった。そのため各群間での運動能力に差はないと判断した。また、

visible platform test により除外された動物はいなかったため、視覚障害の影響も除外できたと判断した。

Sham 群の獲得試験では、試行を重ねるに従いプラットホームへの到達時間 (escape latency) が短縮した (Fig. 1)。遊泳軌跡を観察すると入水した場所からプラットホームまでほとんど無駄な動作がなく遊泳していた。ラットの場所・空間の情報処理には海馬 CA1 と CA3 に存在すると想定されている「場所細胞」が関与し、脳内に空間認知地図を作成すると考えられている。¹⁹⁾ このことから、動物は周囲の風景を目印に自分の位置を認識するようになり、試行を重ねるたびに次第にプラットホームの位置を記憶するようになる。すなわち Sham 群は確実に記憶を形成し学習していると言えよう。

これに対し ME 群では、試行を重ねる毎に徐々

に escape latency が短縮する傾向はあるが、Sham 群と比較するとそれは明らかに遅延していた (Fig. 1)。ME 群の脳では前述したように海馬及び大脳皮質に梗塞巣が出現する。⁶⁾ 梗塞巣では神経細胞の壊死や脱落が生じ、組織自体の脱落も観察される。したがって ME 群の記憶・学習能の低下は、大脳皮質及び海馬で生じた広範囲の脳虚血によって神経回路が損傷されたためと考えられる。なお、上述したように運動障害又は視覚障害のある動物は実験から除外しているため、ME 群の escape latency の遅延は運動や視覚障害に基づくものではなく記憶学習能の障害であると考えられる。

筆者らはこの ME ラットに対する HGF 投与が、escape latency の遅延を軽減することを明らかにした (Fig. 1)。Morris 水迷路の空間記憶・学習能試験は海馬依存性の学習を示すと言われている。したがって、HGF の効果には海馬の梗塞巣軽減が関与している可能性がある。

記憶には短期記憶と長期記憶があり、海馬及びその周辺領域は短期記憶から長期記憶への変換に密接に関与すると言われている。²⁰⁾ 最近の ¹⁴C-2-deoxyglucose 取り込みを指標とした脳イメージング実験においても、訓練後早期のテストでは記憶行動は海馬の活性化と関連しているが、記憶保持が進むにつれて海馬の活動は減弱し、代わりにその後の保持テストでは大脳皮質の代謝活性の増大が起こる。²¹⁾ したがって一時的な海馬-皮質間の interaction を経て大脳での長期記憶が形成されてゆくと考えられている。²²⁾ そこで筆者らは保持試験を行い長期記憶について検討した。Sham 群では escape latency が短縮され、以前の記憶を保持していたが (Fig. 1)、ME 群のそれは遅延されたままで、その後各試行毎の学習効果も観察されなかった (Fig. 1)。一方、HGF 投与群は ME 群と比較し初回の試行より escape latency が短縮され、以前の記憶を保持していた (Fig. 1)。このことより、海馬だけでなく大脳皮質も梗塞に陥る ME では長期記憶にも障害が生じ、HGF の効果は大脳皮質にも及び長期記憶障害の軽減につながったと推測された。

4. 脳塞栓後の梗塞巣に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

虚血性脳血管障害は脳組織への血流が遮断され生じることは周知の事実であるが、血流が極めて短時

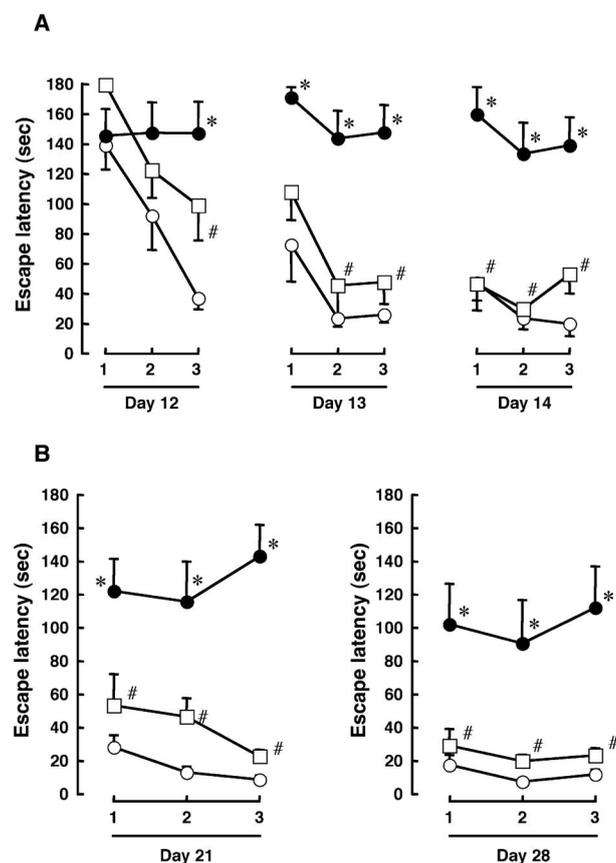


Fig. 1. Effect of HGF on Escape Latency of Acquisition (A) and Retention (B) Tests in the Water Maze Task of the Sham-operated (Open Circles), HGF-untreated Microsphere-embolized (Closed Circles), and HGF-treated Microsphere-embolized (Open Squares) Rats

Each value represents the mean \pm S.E. *Significant difference from sham-operated rats, $p < 0.05$. #Significant difference from HGF-untreated microsphere-embolized rats, $p < 0.05$.

間の内に再開すれば脳組織の損傷なしに機能は回復する。しかし、脳血流が再開されず、周囲から側副血行路による十分な灌流がなければ脳組織損傷が起こり病理学的に梗塞が生じ脳機能障害に陥る。術後28日目の脳の形態学的観察を行うと、ME群はマイクロスフェア注入側である右大脳半球の形態が著変し、重篤な軟化（液化）及び空洞化が観察される（Fig. 2）。¹⁸⁾ さらにME群の大脳皮質、海馬でしばしば細胞脱落が観察された。¹⁸⁾ これらは特に大脳皮質の頭頂皮質及び側頭皮質領域、海馬の上昇層、放線状層、錐体細胞層領域で顕著に観察された。一方、HGF投与群は右大脳半球障害部位を中心に上述した病変が観察されたが、ME群と比較してそれは顕著に抑えられていた（Fig. 2）。¹⁸⁾ 組織への重篤な血液供給不足が生じたため、ME群の局所的な組織空洞化が惹起されたと推測される。事実、ME後の局所脳血流量は右大脳半球の大脳皮質、線条体、海馬で著しく減少し、この減少は持続するという知見を得ている。⁶⁾ 以上のことを踏まえるとHGFによる形態維持の理由の1つとして血流改善効果が期待された。

5. 脳塞栓後の脳血管走行性に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

HGFは内皮細胞特異的増殖因子でもあり、強力な血管新生作用を有する。そこで虚血性脳血管障害に対するHGFの作用をさらに詳しく検討する目的で蛍光標識アルブミン（FITC-albumin）注入法²³⁾を用いて灌流血管（脳血管の走行性）の観察を行った。^{17,18)}

ME群の灌流血管領域すなわちFITC-albuminの

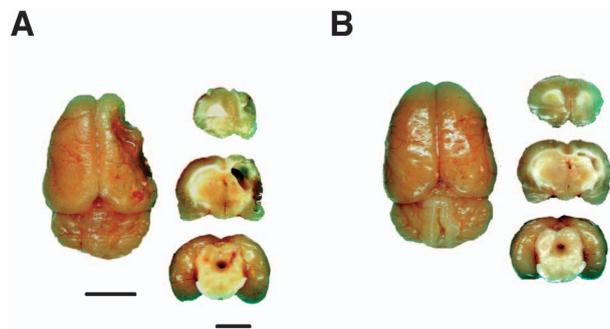


Fig. 2. Gross Appearance and Coronal Sections of HGF-untreated (A) and HGF-treated Microsphere-embolized Rats on Day 28 after the Operation
Bar=5 mm.

存在部位は、大脳皮質の側頭皮質領域、海馬で減少していた。生体は虚血に反応して血管新生を促進し、虚血部位を救出しようとするが、血管新生因子の不足により血管構築にまで至らないこともある。²⁴⁾ 一般に血管の形成は内皮細胞の増殖・遊走から始まり、内皮細胞により形成された未熟血管をペリサイトや壁細胞が覆うことで成熟血管となりその過程を終了する。そのため内皮細胞増殖因子は血管構築過程において重要な律速因子の1つである。事実、内皮細胞増殖因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF)の低下は血管構築が乱れる一因として考えられている。²⁵⁾ ME脳では側頭皮質において不規則に蛇行しているFITC-albumin像が観察された。これは病的血管新生が生じている可能性が考えられる。虚血、癌、創傷治癒などの刺激に対し内皮のみが増殖し壁細胞の結合ができない場合は内皮細胞によって形成された管腔は規則性を失い蛇行状の血管形態になる。²⁶⁾ この蛇行血管は壁細胞で覆われていないので出血などを招来し易く、特に虚血巣周辺部では出血を惹起する。²⁷⁾ したがってMEで誘発された局所灌流血管の減少は病的血管新生を誘導し、その後の病態悪化へつながることを示唆している。一方、HGF投与群では大脳皮質の側頭皮質領域及び海馬で灌流血管の減少が抑えられていた。¹⁸⁾ さらにME群で確認された蛇行血管は観察されず、規則正しく整列した血管が走行していた。成熟した血管形成には内皮と壁細胞の接着が必須であるため、血管形成には壁細胞も重要な因子であることが分かる。内因性HGFの壁細胞に対する作用は成熟した血管壁の構築を促すことが知られている。²⁸⁾ 興味深いことに内因性HGFの発現は重篤な虚血によって低下し、その低下が血管形成の障害を加速するものと考えられている。²⁹⁾ 筆者らもME後の内因性HGFとその受容体であるc-Metの発現を観察したところ、c-Metの発現量は変化しなかったものの、内因性HGFはME後早期から減少し始め7日目までその減少は持続していた。¹⁸⁾ この減少はHGF投与により抑制された。したがって、外来性HGFの補充は内因性HGF量を維持させ血管新生因子の不足を補い、正常な成熟血管が形成される可能性を推測させた。

次に筆者らは血管面積の数値化を行った。MEモデルの病理学的所見に基づき、大脳皮質で4部位、

海馬で2部位の計6部位に着目し、灌流血管面積を測定した。その結果、ME群はSham群と比較して側頭皮質、海馬で血管面積が有意に減少し、HGF投与群は特に頭頂皮質、側頭皮質、及び海馬の3部位の減少を軽減する傾向を示した。¹⁸⁾ 一般的に血管新生によって形成された血管は $5\mu\text{m}$ 以下の小血管や $12\mu\text{m}$ 以下の中程度血管が多く、³⁰⁾ 既存の血管よりも細いとされる。そこで総血管数及び血管径を測定した。¹⁸⁾ 測定部位は血管面積でHGFが効果を発揮した3部位(頭頂皮質、側頭皮質、海馬)で行った。ME群の総血管数は、側頭皮質及び海馬で有意に減少していた(Fig. 3)。HGF投与群はこれら部位での血管数減少を有意に抑えた(Fig. 3)。また、HGF投与群はすべての部位で $10\mu\text{m}$ 未満の血管数を維持していた(Fig. 3)。上述したBanerjeeらの報告³⁰⁾を考え合わせると、この結果はHGFにより

血管新生が惹起され、血管数が増加することにより灌流血管が維持された可能性が考えられた。

そこで、新生細胞のマーカーである5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)と内皮細胞マーカーであるvon Willebrand factor (vWF)の二重染色を行い新生内皮細胞について検討した。その結果、HGF投与群のBrdU陽性内皮細胞数は非投与群と比較してむしろ減少していた。¹⁸⁾ ME後の内皮細胞の増殖は低酸素により起こると考えられるので、このBrdU陽性内皮細胞数の減少傾向はHGFの虚血障害抑制に起因していたのではないかと推測された。

一般的に虚血になると内皮細胞は一過性に増殖し、その後速やかに死に至る。虚血性疾患などで血管内皮細胞機能に障害を来したとき、その損傷部位でHGF濃度は低下すると報告されている。²⁹⁾ 事実、マイクロスフェア注入側の脳半球ではHGF

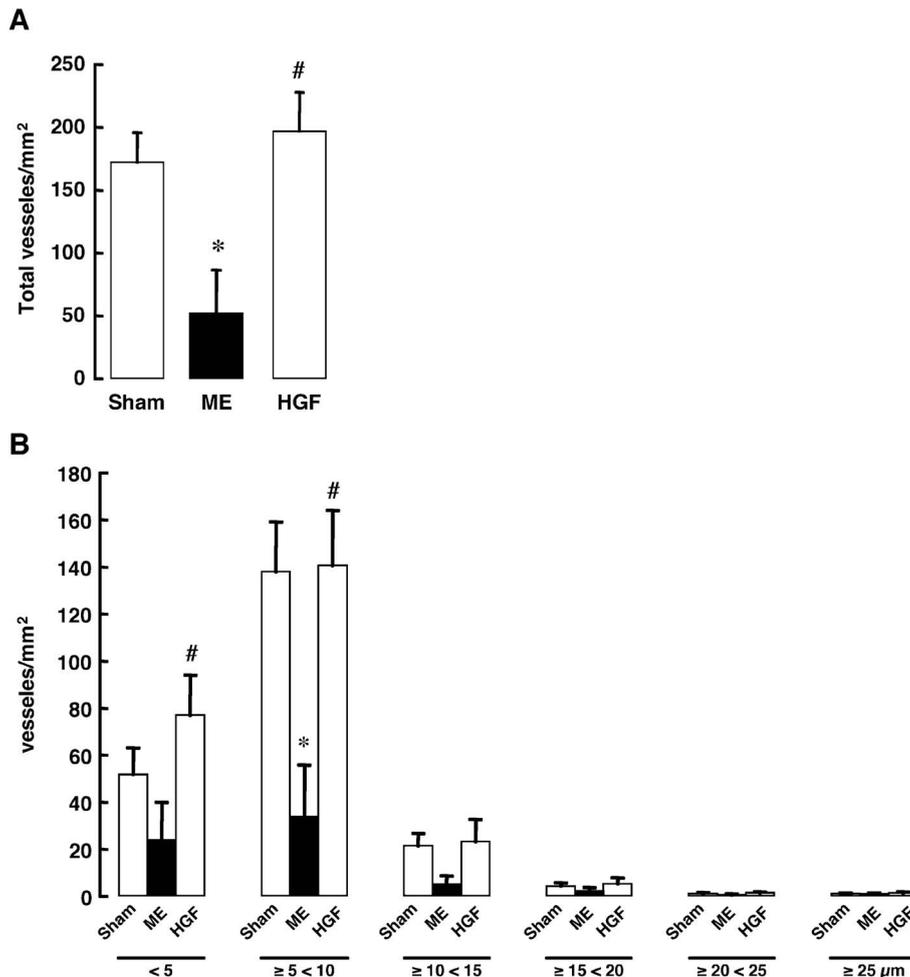


Fig. 3. Effect of HGF on the Number of Total Cerebral Vessels (A) and That of Vessels with Different Diameters (B) in the Ipsilateral Cortex of Sham-operated, HGF-untreated Microsphere-embolized, and HGF-treated Microsphere-embolized Rats

*Significant difference from sham-operated rats, $p < 0.05$. #Significant difference from HGF-untreated microsphere-embolized rats, $p < 0.05$.

タンパク質量の減少が観察されている。¹⁸⁾ すなわち虚血で誘発される内因性 HGF の産生低下が内皮細胞障害を促進している可能性がある。そこで ME 後の内皮細胞障害を TdT-mediated dUTP-biotin nick and labeling (TUNEL) 染色で解析した。HGF 投与は ME 後の TUNEL 陽性内皮細胞数の増加を有意に減少させた (Fig. 4)。¹⁸⁾ このことより ME 後内皮細胞はアポトーシスに陥り細胞死を起こし、HGF はこれを抑制したと考えられた。

6. 脳塞栓後の血液脳関門破綻に及ぼす HGF の効果

脳は血液脳関門という特有のバリアー機構によって物質の血管透過性を制御している。この血液脳関門が破綻すると、正常な物質移行が障害され、脳内微小環境は多大な影響を受ける。原病変とともに治療上大きな問題となるのが血液脳関門障害の結果生じる脳浮腫である。さらに血液脳関門の破綻によって生じる脳内出血は出血性梗塞を導く。これら血液脳関門障害に起因する脳梗塞急性期病態は後発の梗塞巣拡大へとつながる。そこで筆者らは ME で誘発される血液脳関門の破綻とそれに及ぼす HGF の効果を検討した。¹⁷⁾

まず始めに ME 後の血液脳関門の経時的変化を観察した結果、1 日目で既に広範囲な FITC-albu-

min の漏出を認め、3 日目でピークを迎えた。7 日目に若干減少するものの明らかな血液脳関門の破綻を観察した。ラット永久中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用い、¹³¹I でラベルしたアルブミンの漏出を指標として血液脳関門の破綻を評価した報告によると、MCAO 後 2 日目までは脳血管からのアルブミン漏出は観察されず、3 日目で血管外への漏出が惹起される。³¹⁾ これらの結果と比較すると、ME モデルは他の脳虚血モデルと比較して、血液脳関門障害は高度でその発現時期も早いことが分かる。そしてこの ME 後の血液脳関門障害は後発する梗塞巣拡大や記憶・学習能の障害につながると考えられる。^{6,11,16)}

次に HGF の効果を検討したところ、HGF 投与は FITC-albumin の漏出を有意に抑えた (Fig. 5)。¹⁷⁾ 血液脳関門の構造的、機能的本体は、脳毛細管内皮細胞とそれらを接合している tight junction にある。すなわち血液脳関門の破綻は内皮細胞の損傷を反映すると考えられ、HGF はその内皮細胞障害を抑制し FITC-albumin の漏出を抑えた可能性があ

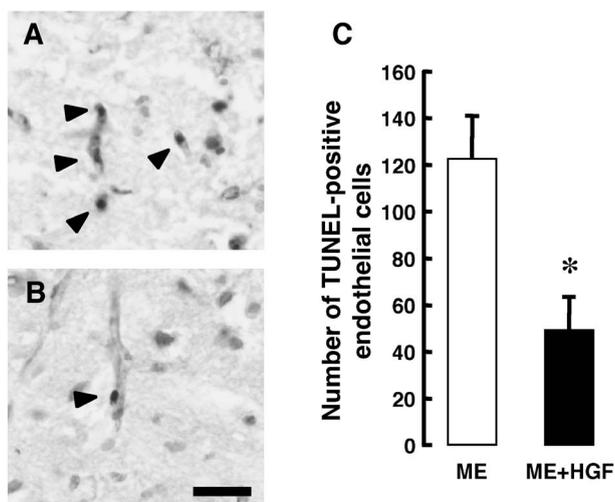


Fig. 4. Effect of HGF on the Number of TUNEL-positive Vascular Endothelial Cells after the Microsphere Embolism

Photomicrographs of double staining for TUNEL-positive cells (black arrowhead) and von Willebrand factor-positive endothelial cells in the ipsilateral cortex of HGF-untreated microsphere-embolized (A) and HGF-treated microsphere-embolized (B) rats. Bar=50 μ m. The number of TUNEL-positive endothelial cells was counted (C). *Significant difference from HGF-untreated microsphere-embolized rats, $p < 0.05$.

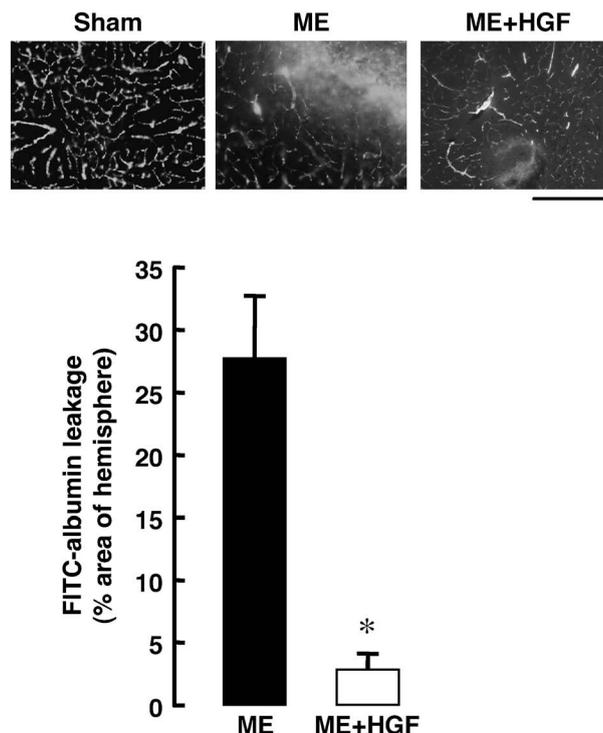


Fig. 5. Effect of HGF on the FITC-albumin Leakage of HGF-untreated (ME) and HGF-treated Microsphere-embolized (ME+HGF) Rats on Day 7 after the Operation

Bar=50 μ m. *Significant difference from HGF-untreated microsphere-embolized rats, $p < 0.05$.

る。このことは、前述した HGF が持つ内皮細胞アポトーシス抑制効果と合致する。

そこで TUNEL 陽性細胞数が最大となった ME 後 3 日目に焦点を当てアポトーシス因子 Bax, 抗アポトーシス因子 Bcl-xL, Bcl-2 のタンパク質量変化を検討した。Bax は HGF 投与でもなんら影響を受けなかった。¹⁷⁾ 一方, Bcl-xL 及び Bcl-2 は ME 後減少し, HGF は Bcl-2 の減少のみを抑制した。¹⁷⁾ すなわち HGF は Bcl-2 減少抑制作用によって内皮細胞のアポトーシスを回避し, 血液脳関門の破綻を一部軽減したのかもしれない。もちろん HGF が他の作用機序を介して血液脳関門の破綻を抑制した可能性も考えられる。

7. 脳塞栓後の Tight junction タンパク質の発現変化と HGF の効果

次に筆者らは ME 後の tight junction 構成タンパク質 (occludin, claudin-5, ZO-1) の局在を内皮細胞マーカーである rat endothelial cell antigen (RECA) との二重染色で検討した。³²⁾ 内皮細胞に存在する occludin は ME 後 6 時間目から減少し始め, その減少は 24 時間目をピークとして 72 時間目まで持続していた。ZO-1 の発現変化も同様であった。³²⁾ 一方, claudin-5 の発現は ME 後変化しなかった。³²⁾ これら tight junction 構成タンパク質の局在変化に対する HGF の影響を検討した結果, HGF は血管内皮細胞上の occludin 及び ZO-1 の減少を抑制した。

Angiopoietin (Ang)-1 は脳の恒常維持に重要な因子と言われ,³³⁾ 培養系の血液脳関門モデルにおいては Ang-1/Tie-2 経路が occludin の発現を誘導する。³⁴⁾ 一方, Ang-2 は ZO-1 の発現を抑制することが知られている。³⁵⁾ 筆者らは ME 後早期に Ang-1 mRNA が減少し, その一方で Ang-2 mRNA が増加することを確認している。これらの結果は Ang-1 及び -2 のバランスの崩壊が tight junction 構成タンパク質の量的変化を引き起こした可能性を示している。そして HGF 投与は Ang-1 と -2 のバランスを修正し内皮細胞上の occludin 及び ZO-1 量を維持したのかもしれない。

次に内皮細胞上の tight junction 構成タンパク質の維持が FITC-albumin の漏出と関連するか否かを FITC-albumin を注入した脳組織サンプルを用い tight junction 構成タンパク質で免疫染色した。その結果, tight junction 構成タンパク質が著しく減

少している部位では, FITC-albumin の漏出が顕著であった。³²⁾ HGF 投与は障害部位においても tight junction 構成タンパク質を内皮細胞上に維持し, かつ FITC-albumin の漏出を抑制していた。すなわち, 血管内皮細胞に存在する tight junction 構成タンパク質の減少が血液脳関門の破綻を助長し, その後の梗塞巣の拡大につながると考えられる。そして, HGF は血管内皮細胞内の occludin 及び ZO-1 量の減少を抑制することで血液脳関門機能を維持していることが考えられた。

筆者らはさらにラット脳から単離した脳毛細血管を用い occludin 及び ZO-1 量の経時変化を検討した結果, 両タンパク質ともに ME 後早期から減少していた。³⁶⁾ この結果は ME 後の血液脳関門の破綻に tight junction 構成タンパク質の発現低下が深く関与していることを示唆している。

脱チロシンリン酸化酵素阻害薬の投与は tight junction の構造を不規則にし, 細胞透過性を亢進させる。³⁷⁾ すなわち tight junction の破綻とチロシンリン酸化との関連が推測される。実際, occludin がチロシンリン酸化されると, occludin と ZO-1 との接着が抑制されることが明らかとなり,³⁸⁾ tight junction の破綻と occludin のチロシンリン酸化の密接な関連が示唆されている。筆者らは ME 後早期から occludin のチロシンリン酸化が増大し, 48 時間目までその増加が持続することを明らかにした。³⁶⁾ この結果は, ME 後早期から occludin と ZO-1 との接着が抑制されていることを示唆しており, HGF の血液脳関門破綻抑制効果の一部にこのような occludin のチロシンリン酸化の変化も関与していることが推察できる。

以上をまとめると, ME で誘発される虚血性脳血管障害に対し HGF は内皮細胞死の抑制, 血液脳関門の維持を介して梗塞巣の拡大を抑制し, 脳梗塞後の空間・記憶学習能障害を改善したと考えられる。

8. 虚血後神経細胞死に及ぼす HGF の効果とその機序

近年, アポトーシスの過程で caspase inhibitor により影響を受けない caspase 非依存経路の存在が確認されている。³⁹⁻⁴¹⁾ この経路で中心的役割を担っているタンパク質 apoptosis-inducing factor (AIF) は, 正常な細胞ではミトコンドリアに存在し酸化還元酵素として機能するが,^{40,41)} 細胞が酸化ストレス

を受けるとミトコンドリアから放出され核内で DNA 断片化を引き起こす。⁴²⁾

HGF は過酸化水素や低酸素/再酸素化による酸化ストレスから心筋細胞及び肝細胞を保護することが報告されている。⁴³⁻⁴⁵⁾ そこで筆者らは、脳虚血後の AIF と酸化的 DNA 障害の関連に着目し、HGF の抗アポトーシス作用とその機序解明を試みた。

9. AIF 核内移行に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

グルタミン酸受容体サブタイプの 1 つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介した過剰量の Ca^{2+} 流入は neuronal nitric oxide synthase (nNOS) の活性化と nitric oxide (NO) の産生を引き起こす。⁴²⁾ 産生された NO は superoxide との結合により peroxynitrite (ONOO⁻) を生成し、DNA 障害を引き起こすと考えられている。⁴²⁾ この酸化的 DNA 障害は poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 の活性化を誘起し、核内タンパク質を過剰に poly (ADP-ribosyl) 化する。その結果、細胞内エネルギーが減少することで AIF の核内への移行が進行すると考えられている。⁴²⁾ 筆者らは培養海馬神経細胞を用い、NMDA 刺激後の神経細胞死と AIF 核内移行を明らかにした。⁴⁶⁾ さらにこの NMDA 刺激による神経細胞死は AIF の核内移行と poly (ADP-ribose) formation とともに HGF 処置で抑制された。⁴⁶⁾ この結果を踏まえラット一過性全脳虚血モデルで AIF の細胞内局在を解析した結果、HGF は AIF の総タンパク質量に影響を与えることなく、虚血再灌流後に増加する核内 AIF の発現を抑制し、かつ神経細胞死を抑制した (Fig. 6)。⁴⁷⁾ これら *in vitro* 及

び *in vivo* の解析結果から、HGF のアポトーシス抑制機序の 1 つとして、AIF 核内移行阻害作用を提示することができた。

10. Hsp70 と AIF 結合に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

Heat shock protein (Hsp) family (Hsp10, 27, 60, 70 及び 90) の中で Hsp70 は唯一 AIF と直接結合して AIF の核内移行を抑制する内因性 inhibitor である。⁴⁸⁾ 筆者らは HGF 投与後の AIF 核内移行抑制の機序を明らかにするため、Hsp70 の発現変化及び Hsp70 と AIF の結合量変化を検討した。

一過性全脳虚血再灌流後の Hsp70 発現量及び Hsp70-AIF の結合量は増加したものの、これら変化は HGF 投与によりなら影響を受けないことが明らかになった。⁴⁷⁾ したがって、Hsp70 タンパク質量及び Hsp70-AIF の結合量は HGF の神経細胞死保護作用に寄与している可能性は少ないと考えられる。

11. NMDA 受容体活性化に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

NO 産生による DNA 障害は、AIF 放出の初発要因であり、この AIF 放出が二次的な DNA 障害 (DNA 断片化) を誘発すると考えられている。⁴²⁾ NMDA 受容体を介した Ca^{2+} 流入は、nNOS を活性化して NO 産生を誘起するため、⁴⁹⁾ NMDA 受容体の活性は DNA 障害を左右する重要な要素であるといえる。そこで NMDA 受容体の活性を、NMDA 受容体 NR2 サブユニットのチロシンリン酸化を指標として評価した。その結果、虚血再灌流後早期に

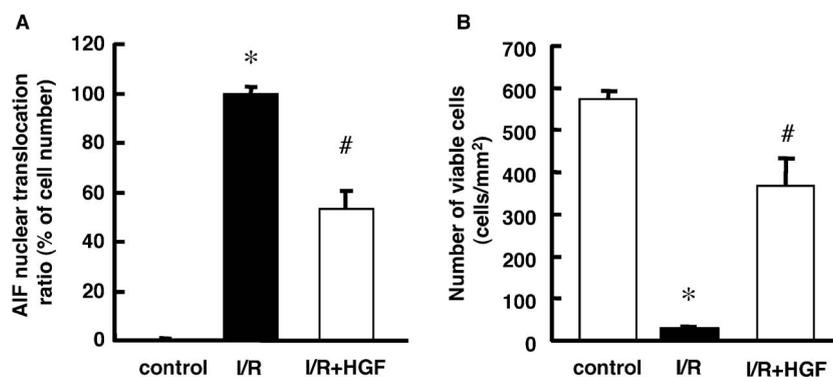


Fig. 6. Effect of HGF on the Number of AIF-positive Nuclei in the Hippocampal CA1 Region of 4-Vessel-occluded Rats (I/R) at 36 h of Reperfusion (A) and on the Number of Viable Cells in the Hippocampal CA1 Region of 4-Vessel-occluded Rats (I/R) at 72 h of Reperfusion (B) without (I/R) or with (I/R+HGF) HGF Treatment

*Significant difference from non-operated naïve rats, $p < 0.05$. #Significant difference from HGF-untreated ischemic rats, $p < 0.05$.

NR2B サブユニットチロシンリン酸化は顕著に増加したが、この増加は HGF 投与によりなら影響を受けなかった。⁴⁷⁾ すなわち、HGF は脳虚血後の NMDA 受容体活性化自体には影響を与えないのかもしれない。

12. 脳虚血後の酸化的 DNA 障害に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

NMDA 受容体を介する Ca^{2+} 流入は、NO だけでなく、ミトコンドリアにおける活性酸素種の産生を誘導し、peroxynitrite (ONOO-) とそれに引き続く hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) の形成を促進し、酸化的 DNA 障害を引き起こすと考えられている。⁴²⁾ 次に 8-hydroxydeoxyguanosine (OHdG) の発現を指標にし、酸化的 DNA 障害に及ぼす HGF の効果を検討した。8-OHdG 発現の増大は虚血再灌流後早期から観察され、この増大は HGF 投与により抑制された。⁴⁷⁾ これらの結果は、HGF が虚血再灌流後初期の酸化的 DNA 障害を阻害することにより AIF の核内移行を抑制した可能性を示している。

酸化的 DNA 障害は、PARP や p53 の活性化を誘導することが知られている。さらに DNA 障害による p53 の活性化は、ROS 産生とそれに引き続くミトコンドリア膜障害を誘発し、アポトーシスを引き起こす。また、p53 を介する神経細胞障害にも AIF の核内移行が関与すると示唆されている。⁵⁰⁾ 筆者らは *in vivo* 虚血再灌流後の顕著な poly(ADP-ribose) formation 及び p53 タンパク質発現増加を免疫組織染色法で確認し、この増加は HGF 投与により抑制されることを明らかにできた。⁴⁷⁾ すなわち HGF は *in vivo* 虚血再灌流病態でも PARP の活性を抑制することで AIF の核内移行を減弱させると考えられた。

13. 活性酸素種産生に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

どのように HGF が酸化的 DNA 障害を抑制したのかという疑問はまだ残る。HGF は Bcl-xL の発現を増加させることで、⁴⁴⁾ また、MEK-MAPK 経路を活性化させることで心筋細胞での H_2O_2 誘発アポトーシスを抑制している。⁴³⁾ 最近、HGF が small G タンパク質 Rac1 を不活性化し、肝細胞での低酸素/再酸素化誘導酸化ストレス及びアポトーシスを抑制すると報告されている。⁴⁵⁾ HGF はそれ自体、酸化還元状態に直接作用しないと考えられているが、⁴⁵⁾

カタラーゼ発現を促進することでセラミド誘導性のアポトーシスも抑制する。⁵¹⁾ そこで筆者らは DNA 酸化に関与する分子に着目し、HGF の効果とその機序を検討した。

Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE/Ref-1) は DNA 塩基修復経路に属する多機能性タンパク質であり、正常細胞では細胞質に存在するが、活性酸素により刺激されると核内へ移行し、酸化的 DNA 障害を修復する。過度の酸化ストレスは APE/Ref-1 発現量を減少させ、この減少は一過性全脳虚血再灌流後の神経細胞死と関連するとも考えられている。^{52,53)} この点に着目し、筆者らは APE/Ref-1 の染色性及び陽性細胞数が一過性全脳虚血後の海馬 CA1 領域神経細胞で減少し、HGF 投与はこれらの減少を抑制することを明らかにした。⁵⁴⁾

次に、superoxide 産生に重要な役割を果たしている酵素、NADPH oxidase の活性を解析した。NADPH oxidase 活性の抑制が虚血性脳障害を減弱することや、^{55,56)} グルコース除去後の早期に培養アストロサイトで急速な活性酸素の集積が観察されること⁵⁷⁾ を考え合わせると、神経細胞のみならずグリア細胞での NADPH oxidase 活性も脳虚血再灌流病態の重要な要素であることが分かる。筆者らは NADPH oxidase 活性が虚血再灌流後に CA1 領域のグリア様細胞で増加し、この増加が HGF 投与により抑制されることを明らかにした。⁵⁴⁾ 海馬歯状回領域では NADPH oxidase 活性は虚血後でも変化せず、HGF 投与によって影響を受けなかった。これらの結果から、HGF の神経保護作用が、NADPH oxidase 活性化による活性酸素産生の抑制と、APE/Ref-1 発現量減少抑制に関連していることが示唆された。

NADPH oxidase は superoxide を産生し、これは superoxide dismutase によって過酸化水素に変換されることはよく知られている。過酸化水素は膜透過性の活性酸素であるため、虚血後にグリア細胞で産生された過酸化水素が神経細胞で酸化障害を引き起こす可能性は十分に考えられる。一方、培養海馬神経細胞を用いた実験では、NMDA によって引き起こされる AIF の核内移行を HGF が阻害していた⁴⁶⁾ ことから、神経細胞内で産生される活性酸素とそれによって引き起こされる DNA 酸化障害も HGF

のターゲットである可能性も否定できない。

以上、筆者らは虚血性脳血管障害に及ぼす HGF の新たな効果を提示するとともにその作用機序の一端を解明することができた。

14. おわりに

HGF は現在、慢性末梢動脈疾患治療薬として臨床試験中であるが、虚血性脳疾患治療への検討の具体的企画はいまだない。今後の発展を期待したい。

謝辞 本研究は多くの東京薬科大学薬学部分子細胞病態薬理学教室スタッフ、大学院生、卒業論文研究生の努力でなし遂げられたものである。彼らの暖かい、かつ精力的な支援に深く感謝する。また、HGF を提供いただいた大阪大学大学院医学研究科教授 中村敏一先生に感謝申し上げます。本研究の一部は私学振興財団の基金に支援された。

REFERENCES

- Hachinski V. C., Lassen N. A., Marshall J., *Lancet*, **2**, 207–210 (1974).
- Matsumoto K., Nakamura T., *J. Biochem. (Tokyo)*, **119**, 591–600 (1996).
- Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sugimura A., Tashiro K., Shimizu S., *Nature*, **342**, 440–443 (1989).
- Thompson J., Dolcet X., Hilton M., Tolcos M., Davies A. M., *Mol. Cell. Neurosci.*, **27**, 441–452 (2004).
- Zarnegar R., Michalopoulos G. K., *J. Cell Biol.*, **129**, 1177–1180 (1995).
- Miyake K., Takeo S., Kaijiharara H., *Stroke*, **24**, 415–420 (1993).
- Takeo S., Taguchi T., Tanonaka K., Miyake K., Horiguchi T., Takagi N., Fujimori K., *Stroke*, **23**, 62–68 (1992).
- Taguchi T., Miyake K., Tanonaka K., Okada M., Takagi N., Fujimori K., Takeo S., *Jpn. J. Pharmacol.*, **62**, 269–278 (1993).
- Takagi N., Tsuru H., Yamamura M., Takeo S., *Stroke*, **26**, 1101–1106 (1995).
- Nagakura A., Miyake-Takagi K., Takagi N., Fukui M., Takeo S., *J. Neurosci. Res.*, **68**, 363–372 (2002).
- Nagakura A., Takagi N., Takeo S., *Neuroscience*, **113**, 519–528 (2002).
- Takagi N., Miyake-Takagi K., Takagi K., Tamura H., Takeo S., *J. Biol. Chem.*, **277**, 6382–6390 (2002).
- Lyden P. D., Zivin J. A., Chabolla D. R., Jacobs M. A., Gage F. H., *Exp. Neurol.*, **116**, 122–132 (1992).
- Naritomi H., *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **5**, 103–111 (1991).
- Morris R. G., Anderson E., Lynch G. S., Baudry M., *Nature*, **319**, 774–776 (1986).
- Takagi N., Miyake K., Taguchi T., Tamada H., Takagi K., Sugita N., Takeo S., *Exp. Brain Res.*, **114**, 279–287 (1997).
- Date I., Takagi N., Takagi K., Kago T., Matsumoto K., Nakamura T., Takeo S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 1152–1158 (2004).
- Date I., Takagi N., Takagi K., Kago T., Matsumoto K., Nakamura T., Takeo S., *J. Neurosci. Res.*, **78**, 442–453 (2004).
- O’Keefe J., Dostrovsky J., *Brain Res.*, **34**, 171–175 (1971).
- Milner B., Squire L. R., Kandel E. R., *Neuron*, **20**, 445–468 (1998).
- Bontempi B., Laurent-Demir C., Destrade C., Jaffard R., *Nature*, **400**, 671–675 (1999).
- Squire L. R., Alvarez P., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 169–177 (1995).
- Cavaglia M., Dombrowski S. M., Drazba J., Vasanji A., Bokesch P. M., Janigro D., *Brain Res.*, **910**, 81–93 (2001).
- Richardson T. P., Peters M. C., Ennett A. B., Mooney D. J., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1029–1034 (2001).
- Zhang Z. G., Zhang L., Tsang W., Soltanian-Zadeh H., Morris D., Zhang R., Goussev A., Powers C., Yeich T., Chopp M., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 379–392 (2002).
- Hellstrom M., Gerhardt H., Kalen M., Li X., Eriksson U., Wolburg H., Betsholtz C., *J. Cell Biol.*, **153**, 543–553 (2001).
- Zhang Z. G., Zhang L., Jiang Q., Zhang R., Davies K., Powers C., Bruggen N., Chopp M., *J. Clin. Inv.*, **106**, 829–838 (2000).
- Nakano N., Morishita R., Moriguchi A., Nakamura Y., Hayashi S. I., Aoki M., Kida I., Matsumoto K., Nakamura T., Higaki J., Ogihara T., *Hypertension*, **32**, 444–451 (1998).
- Hayashi S., Morishita R., Nakamura S.,

- Yamamoto K., Moriguchi A., Nagano T., Taiji M., Noguchi H., Matsumoto K., Nakamura T., Higaki J., Ogihara T., *Circulation*, **100**, II301–308 (1999).
- 30) Banerjee S. K., Sarkar D. K., Weston A. P., De A., Campbell D. R., *Carcinogenesis*, **18**, 1155–1161 (1997).
- 31) Gotoh O., Asano T., Koide T., Takakura K., *Stroke*, **16**, 101–109 (1985).
- 32) Date I., Takagi N., Takagi K., Tanonaka K., Funakoshi H., Matsumoto K., Nakamura T., Takeo S., *Neurosci. Lett.*, **407**, 141–145 (2006).
- 33) Nourhaghighi N., Teichert-Kuliszewska K., Davis J., Stewart D. J., Nag S., *Lab. Invest.*, **83**, 1211–1222 (2003).
- 34) Hori S., Ohtsuki S., Hosoya K., Nakashima E., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **89**, 503–513 (2004).
- 35) Zhu Y., Lee C., Shen F., Du R., Young W. L., Yang G. Y., *Stroke*, **36**, 1533–1537 (2005).
- 36) Kago T., Takagi N., Date I., Takenaga Y., Takagi K., Takeo S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**, 1197–1203 (2006).
- 37) Collares-Buzato C. B., Jepson M. A., Simmons N. L., Hirst B. H., *Eur. J. Cell Biol.*, **76**, 85–92 (1998).
- 38) Kale G., Naren A. P., Sheth P., Rao R. K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 324–329 (2003).
- 39) Cande C., Cecconi F., Dessen P., Kroemer G., *J. Cell Sci.*, **115**, 4727–4734 (2002).
- 40) Daugas E., Susin S. A., Zamzami N., Ferri K. F., Irinopoulou T., Larochette N., Prevost M. C., Leber B., Andrews D., Penninger J., Kroemer G., *FASEB J.*, **14**, 729–739 (2000).
- 41) Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M., Kroemer G., *Nature*, **397**, 441–446 (1999).
- 42) Yu S. W., Wang H., Dawson T. M., Dawson V. L., *Neurobiol. Dis.*, **14**, 303–317 (2003).
- 43) Kitta K., Day R. M., Ikeda T., Suzuki Y. J., *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 902–910 (2001).
- 44) Nakamura T., Mizuno S., Matsumoto K., Sawa Y., Matsuda H., Nakamura T., *J. Clin. Inv.*, **106**, 1511–1519 (2000).
- 45) Ozaki M., Haga S., Zhang H. Q., Irani K., Suzuki S., *Cell Death Differ.*, **10**, 508–515 (2003).
- 46) Ishihara N., Takagi N., Niimura M., Takagi K., Nakano M., Tanonaka K., Funakoshi H., Matsumoto K., Nakamura T., Takeo S., *J. Neurochem.*, **95**, 1277–1286 (2005).
- 47) Niimura M., Takagi N., Takagi K., Mizutani R., Ishihara N., Matsumoto K., Funakoshi H., Nakamura T., Takeo S., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **26**, 1354–1365 (2006).
- 48) Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S. A., Maise C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J. M., Garrido C., Kroemer G., *Nat. Cell. Biol.*, **3**, 839–843 (2001).
- 49) Dawson V. L., Dawson T. M., London E. D., Bredt D. S., Snyder S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 6368–6371 (1991).
- 50) Cregan S. P., Fortin A., MacLaurin J. G., Callaghan S. M., Cecconi F., Yu S. W., Dawson T. M., Dawson V. L., Park D. S., Kroemer G., Slack R. S., *J. Cell Biol.*, **158**, 507–517 (2002).
- 51) Kannan R., Jin M., Gamulescu M. A., Hinton D. R., *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 166–175 (2004).
- 52) Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Narasimhan P., Copin J. C., Kawase M., Chan P. H., *Stroke*, **30**, 2408–2415 (1999).
- 53) Kawase M., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Chan P. H., *Stroke*, **30**, 441–448; discussion 449 (1999).
- 54) Niimura M., Takagi N., Takagi K., Mizutani R., Tanonaka K., Funakoshi H., Matsumoto K., Nakamura T., Takeo S., *Neurosci. Lett.*, **407**, 136–140 (2006).
- 55) Kapinya K. J., Harms U., Harms C., Blei K., Katchanov J., Dirnagl U., Hortnagl H., *J. Neurochem.*, **84**, 1028–1039 (2003).
- 56) Walder C. E., Green S. P., Darbonne W. C., Mathias J., Rae J., Dinauer M. C., Curnutte J. T., Thomas, G. R., *Stroke*, **28**, 2252–2258 (1997).
- 57) Ouyang Y. B., Carriedo S. G., Giffard R. G., *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 544–551 (2002).