

脳塞栓症による血管内皮細胞障害と新規血管保護薬

韓 峰,* 福永浩司

Brain Embolism-induced Injury of Vascular Endothelial Cells and a Novel Vasoprotective Drug

Feng HAN and Kohji FUKUNAGA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

(Received January 5, 2007)

Microsphere embolism-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells of brain microvessels was found after brain ischemia. The eNOS induction preceded disruption of the blood-brain barrier following ischemia. In vascular endothelial cells, microsphere embolism-induced eNOS expression was associated with protein tyrosine nitration, which is a marker of generation of peroxynitrite. To determine whether eNOS expression and protein tyrosine nitration in vascular endothelial cells mediates the blood-brain barrier disruption in the microsphere embolism brain, we tested the effect of a novel calmodulin-dependent NOS inhibitor, DY-9760e, which inhibits eNOS activity and in turn protein tyrosine nitration. Concomitant with inhibition of protein tyrosine nitration in vascular endothelial cells, DY-9760e significantly inhibited BBB disruption as assessed by Evans blue excretion. DY-9760e also inhibited cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase as a marker of the apoptotic pathway in vascular endothelial cells. Taken together with previous evidence in which DY-9760e inhibited brain edema, microsphere embolism-induced eNOS expression in vascular endothelial cells likely mediates BBB disruption and in turn brain edema.

Key words—blood-brain barrier; microsphere embolism; endothelial cells; nitric oxide synthase; tyrosine nitration; calmodulin

1. はじめに

中枢神経系において一酸化窒素合成酵素 (NOS) により産生される一酸化窒素 (NO) は神経可塑性や脳血流量の調節など生理的に重要な働きをしている。一方、脳虚血や神経変性疾患においては細胞障害性に働くことが知られている。これまでの研究から脳虚血においては神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) と誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は神経細胞に対して障害性に、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) は保護的に働くことが知られている。¹⁾ たとえば、内皮細胞由来 NO は血圧調節、微小循環改善、血小板凝集抑制を介して脳保護的に働く。²⁻⁴⁾ 最近 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase の阻害剤であるスタチン類

が血管内皮細胞において eNOS を誘導して、血管内皮機能を改善することが示された。^{5,6)} このことはスタチン類が脳梗塞のリスクを減少させることを示している。しかし、脳虚血後に脳毛細血管内皮細胞において eNOS が誘導されるかどうか明らかではない。

血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) は脳毛細血管内皮細胞、グリア細胞、基底膜から構成され、特に、毛細血管内皮細胞は物質透過の物理的、電氣的及び代謝的障壁となる。本論文では多発性脳塞栓症に類似した病態を示すラットマイクロスフェア脳塞栓モデルを用いて、脳毛細血管内皮細胞における eNOS の誘導と内皮細胞障害の関連性、さらに内皮細胞における eNOS による障害を抑制する新規カルモデュリン阻害剤が脳虚血に伴う BBB の障害を抑制するメカニズムを明らかにする。

2. 脳虚血による一酸化窒素の誘導

われわれは砂ネズミに虚血耐性を誘導する短時間 (2 分間) 脳虚血を施した際に、脳毛細血管内皮細

東北大学大学院薬学研究科薬理学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

*e-mail: hanfeng@mail2.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム GS-1 で発表したものを中心に記述したものである。

胞で eNOS が誘導されることを見出した。⁷⁾ この eNOS の誘導は phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) /Akt の活性化反応を介しており、虚血耐性現象に関与していた。すなわち、PI3K の阻害剤である wortmannin をあらかじめ処置して、短時間脳虚血を負荷すると eNOS の誘導は完全に抑制された。同時に虚血耐性現象も消失した。⁷⁾ しかし、致死的な脳虚血 (5 分間虚血) を施した際にも、脳内で持続的な NO の上昇を観察した。⁷⁾ 特に、虚血後亜急性期 (24—48 時間後) にみられる脳内 NO 上昇は eNOS の誘導と一致していた。このように虚血後亜急性期に誘導される eNOS が神経細胞と血管内皮細胞に対して、障害的あるいは保護的に働くのか不明である。アルツハイマー病の死後脳においては神経細胞とグリア細胞で顕著な NOS の誘導がみられる。⁹⁾ 神経細胞では主に nNOS がグリア細胞では iNOS と eNOS の誘導が顕著である。脳虚血では過剰に産生された NO は活性酸素 (O_2^-) と反応してパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) を生じる。パーオキシナイトライトはタンパク質、脂質、核酸のラジカル障害を引き起こす以外に、タンパク質のチロシン残基をニトロ化してその機能を傷害する。例えば抗酸化作用を有するマンガン・スーパーオキシド・ジスムターゼ (Mn-SOD) はニトロチロシン化されて活性を失う。¹⁰⁾

われわれは致死的な脳虚血における脳毛細血管内皮細胞での eNOS の発現が内皮細胞に対して障害性に働くのかどうか、ラットマイクロスフェア脳塞栓モデルを用いて検討した。50 μ m のマイクロスフェアを 20% デキストランに懸濁して、左内頸動脈に約 1000 個注入して永久多発性脳閉塞モデルを作成した。虚血後 0.5—48 時間後に断頭して、マイクロスフェアを注入した同側の皮質・線条体をホモジナイズ後、免疫ブロットにて eNOS の発現量を測定した。¹¹⁾ Figure 1 に示すように eNOS は虚血後 2 時間で有意に上昇して、24—48 時間ではさらに、顕著に上昇した。nNOS と iNOS についても検討した。nNOS では 2—48 時間で 20—30% のわずかに上昇がみられたが、iNOS の発現量には変化がみられなかった。¹¹⁾ 以前、筆者らは虚血後 24 と 48 時間の線条体で一酸化窒素 (NO) の上昇を観察している。¹²⁾ 顕著な eNOS の発現上昇は NO 産生亢進と一致している。eNOS は一般的には血管平滑筋弛緩作

用により局所血流を増加して、脳保護的に働いている。しかし、脳虚血時のミトコンドリアで過剰に産生されるスーパーオキシドと NO はパーオキシナイトライト、ヒドロキシラジカルを発生して細胞に障害性に働く。さらに、重要なことは脳虚血では血管内皮細胞では NOS の補酵素であるテトラヒドロバイオプテリン (BH4) が不足して、NOS は NO ではなく毒性の強いスーパーオキシドを産生する。これがパーオキシナイトライトの過剰な産生につながる。NOS のスーパーオキシドの産生の状態をアンカップリング状態という。パーオキシナイトライトはタンパク質のチロシン残基をニトロ化してタンパク質機能を傷害する。

われわれは皮質・線条体の脳梗塞周囲 (ペナンプラ) で eNOS とニトロチロシン化タンパク質を認識する抗体を用いて免疫染色を行った。¹¹⁾ Figure 1 に示すように、eNOS は主に毛細血管内皮細胞に発現しており、ニトロチロシンの染色性はコントロール (sham) では低い。しかし、虚血後 24 時間では毛細血管内皮細胞での発現がさらに強くなり、同時にニトロチロシンの強い免疫染色性が内皮細胞でみられ、eNOS の発現部位と一致している。このことは虚血により誘導された eNOS が NO と同時にスーパーオキシドを産生して、パーオキシナイトライトが生じ、タンパク質のニトロチロシン化反応が起こることを示している。

3. タンパク質ニトロチロシン化反応と血液脳関門障害

タンパク質ニトロチロシン化は Mn-SOD のように活性を低下させ、細胞に備わった酸化ストレスに対する防御機能を低下させる。さらに、リポポリサッカライド (LPS) を投与し、炎症を惹起したラット肝臓ではミトコンドリアに局在する多くのタンパク質がニトロチロシン化され、ミトコンドリア障害を引き起こす。¹³⁾ さらに血管内皮細胞や神経においてはニトロチロシン化タンパク質より放出される遊



韓 峰

1971 年中国内モンゴル生まれ。中国・蘇州大学医学院卒業。蘇州大学医学院・薬理学分野修士課程修了。1993 年蘇州大学医学院薬理学講座助手、2000 年講師。2003 年蘇州大学と中国国家教育委員会から推薦され、日本文部科学省国費留学生に採用。東北大学大学院薬学研究所・博士後期課程 3 年に在籍 (薬理学分野)。神経変性疾患治療に関する研究

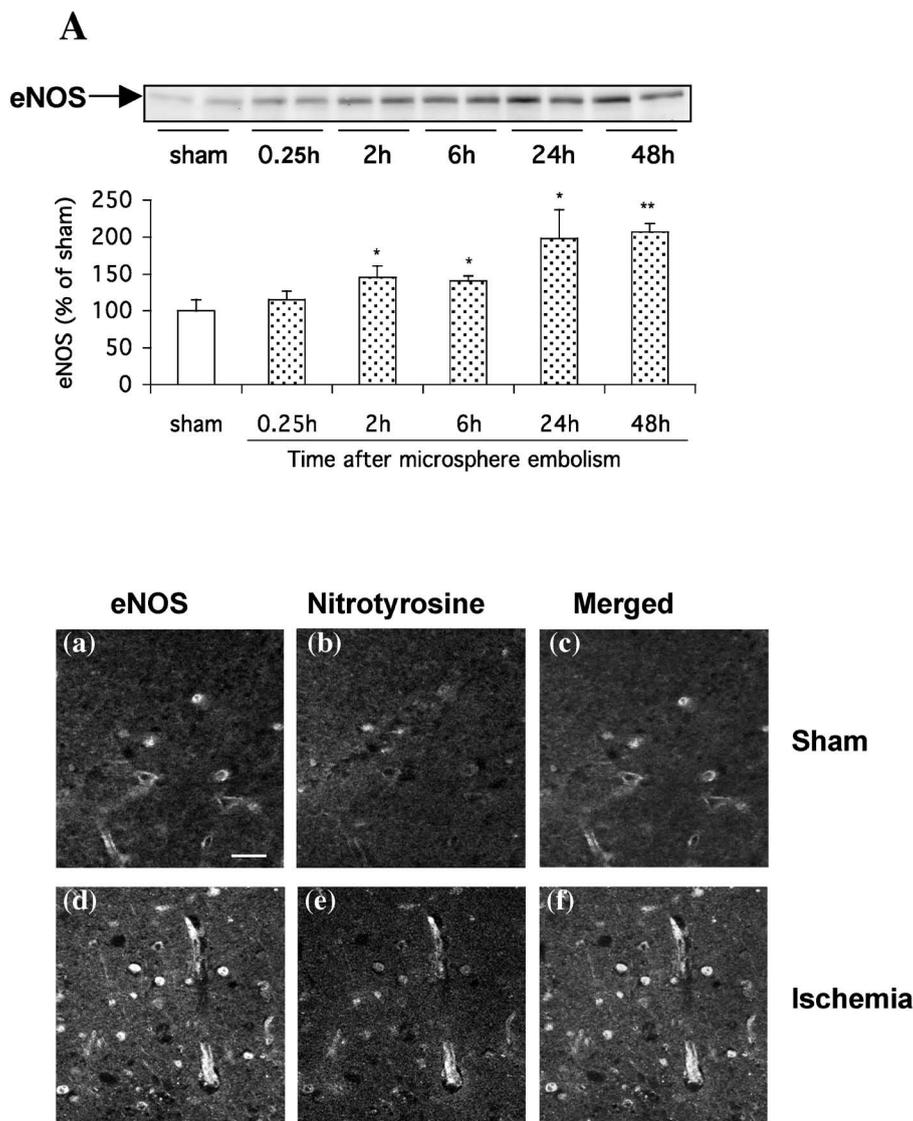


Fig. 1. A: ME Ischemia-induced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Expression in Rat Brain, B: Fluorescent Immunohistochemical Staining with Anti-eNOS and Anti-nitrotyrosine Antibodies in the Cortical Microvessels of ME Rats

The strong anti-eNOS and anti-nitrotyrosine immunoreactivities were seen 24 hours after ME compared to those in sham-operated animals (modified from Ref. 11).

離ニトロチロシンが DNA 障害を引き起こす。¹⁴⁾したがって、虚血でみられる毛細血管内皮細胞でのタンパク質ニトロチロシン化は内皮細胞障害に関与すると考えられる。そこで、BBB を通過しない高分子タンパク質を末梢から投与して、脳内毛細血管からの漏出を測定すると、抗ニトロチロシン抗体で強く染色される血管内皮細胞において高分子タンパク質の漏出が観察された。さらに、細胞障害（アポトーシス）のマーカーである poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の分解産物を認識する抗体で免疫染色するとニトロチロシンで傷害された内皮細胞特異的に PARP の分解産物が認められた。¹¹⁾

PARP の限定分解は内皮細胞においてカスパーゼ-3 が活性化されたことを示しており、脳毛細血管内皮細胞においてアポトーシスが誘導されることを意味している。脳毛細血管内皮細胞の不可逆的な障害は BBB の破綻と脳浮腫の発現につながる。ヒト脳梗塞の病態においても脳浮腫の管理は脳梗塞の予後を左右すると考えられている。マイクロスフェア脳塞栓での BBB の破綻の時間経過をエバンスブルー (EB) 漏出法で測定した。EB の漏出は虚血後 6 時間目から顕著になり、24 時間でピークを示して、以後変化は示されなかった。これらの時間経過は eNOS の誘導、ニトロチロシン化反応、カス

パーゼ-3の活性化反応とよく一致している。¹¹⁾

4. カルモデュリン阻害薬の脳血管保護作用

以前にわれわれはカルモデュリン依存性 NOS に対して強い阻害効果を示すカルモデュリン阻害剤 DY-9760e¹⁵⁾ が砂ネズミ一過性脳虚血モデルマウスで虚血後の NO 産生抑制と脳保護作用を示すことを報告した。⁸⁾ 白崎らは DY-9760e がラット永久脳梗塞モデルで抗脳浮腫作用を示すことを見出した。しかし、DY-9760e の抗脳浮腫作用のメカニズムは不明である。われわれは DY-9760e が eNOS の活性とニトロチロシン化を抑制して血管内皮細胞を保護すると予想した。DY-9760e (50 mg/kg, 腹腔内投与) は虚血による eNOS の発現は抑制しないにもかかわらず、24—48 時間後の NO 産生とニトロチロシン化反応を完全に抑制した。¹²⁾ 同時に、内皮細胞でみられるカスパーゼ-3 による PARP の限定分解も部分的に抑制した。さらに、Fig. 2 に示すように、EB 漏出で評価した BBB 破綻も約 50% 抑制した。これらの結果は毛細血管内皮細胞における eNOS の誘導とニトロチロシン化反応は BBB 障害に部分的に関与することを示唆している。砂ネズミ一過性脳梗塞モデルとマイクロスフェア脳塞栓モデル(永久閉塞)ではニトロチロシン化反応に違いがみられる。前者は損傷部位が海馬に限定されており、脳浮腫はみられない。海馬におけるニトロチロ

シン化反応はニューロンに局限しており一過性である。これに対して永久閉塞であるマイクロスフェア脳塞栓症では eNOS とニトロチロシンの発現は持続的であり、特に、血管内皮細胞において 24 時間以降顕著である。この内皮細胞でのニトロチロシン化反応は脳浮腫の引き金なると考えられる。DY-9760e の抗脳浮腫作用を最初に報告した佐藤らは単層培養したヒト脳毛細血管内皮細胞の [³H]-イヌリン透過性を指標にして DY-9760e が TNF α による血管透過性亢進を抑制することを報告している。¹⁶⁾ カルモデュリン阻害剤であるトリフルオパラジンにも同様の血管透過性亢進抑制がみられることから、これらの作用の細胞内メカニズムは不明であるがカルモデュリン阻害作用に起因している。面白いことに DY-9760e はカルモデュリン結合タンパク質で細胞骨格タンパク質であるフォドリン(スペクトリン)のカルパインによる分解を抑制する。¹⁷⁾ 毛細血管内皮細胞のタイトジャンクションを構成する ZO-1, connexin-43 はフォドリンと結合している。DY-9760e によるフォドリン分解抑制によるタイトジャンクションの保護も BBB の保護にかかわっていると考えられる (Fig. 3)。

一般に脳梗塞での神経保護薬による治療は治療有効時間域 (therapeutic time window) が狭く虚血後なるべく早期に投与することが望まれる。しかし、

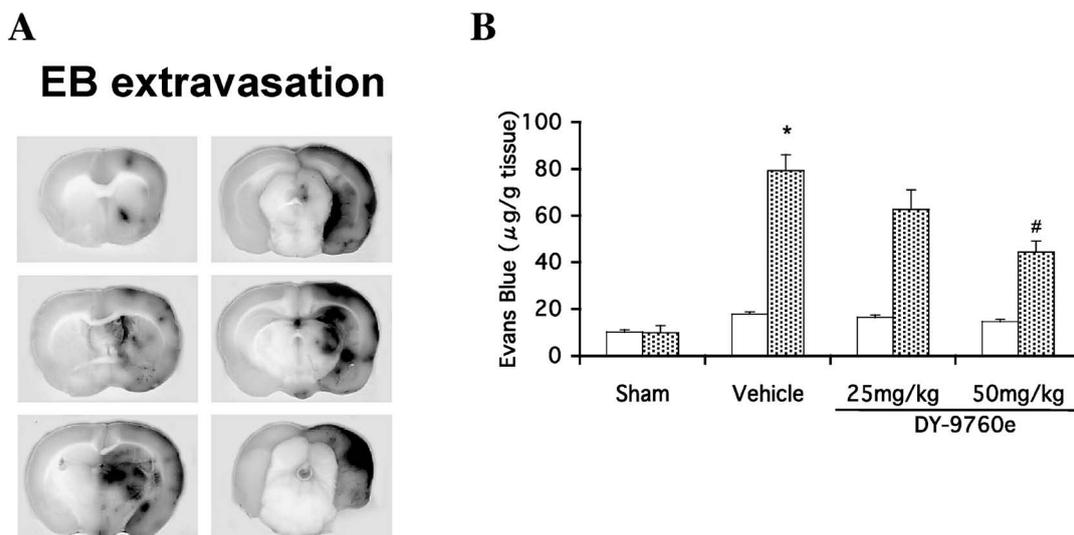


Fig. 2. BBB Disruption in the Ipsilateral Hemisphere after ME Ischemia

A: Extensive Evans blue (EB) dye extravasation (dark areas) is prominent in the ipsilateral hemisphere of rat brain after ME, B: The effect of DY-9760e treatment on BBB permeability 24 hours after ME. Extravasation of EB was determined as μg of EB/g of brain tissue. The data in B are shown as means \pm S.D. ($n=4$ in each group). * $p<0.05$ compared with the right hemisphere of the same brain. # $p<0.05$ compared with vehicle-treated group (modified from Ref. 11).

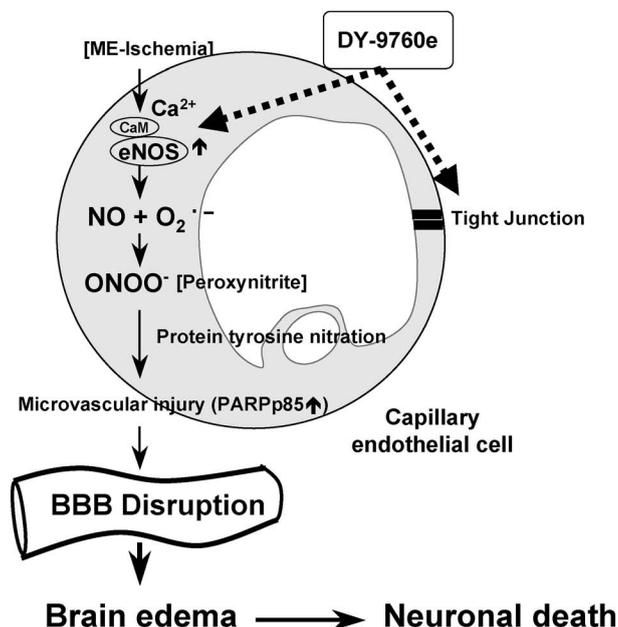


Fig. 3. A Schematic Illustration of the Mechanism Underlying Brain Edema Following Brain Ischemia and Possible Sites of Vasoprotective Action of DY-9760e

The induction of eNOS following ME-induced permanent ischemia produces a marked increase in protein tyrosine nitration, predominantly in vascular endothelial cells. The eNOS-induced protein tyrosine nitration likely accounts for ME-induced BBB disruption, thereby causing brain edema. A novel vasoprotective agent, DY-9760e, is an attractive therapeutic drug exhibiting a potent protective action of capillary endothelial cells through inhibition of eNOS and protection of tight junction.

再灌流直後のラジカスルスカベンジャー投与と同時の脳血管保護薬の投与は脳梗塞急性期の治療にもう1つの選択肢を増やすことになる。特に、今回みられたeNOSの誘導はラットでは24時間以降であり、DY-9760eの治療有効時間域が広いことを示唆している。また、フリーラジカスルスカベンジャーと同様に、脳梗塞との診断がつけば血栓溶解療法の前に投与することも可能である。

実際に、アルツハイマー型認知症のヒト脳では顕著なNOSの誘導とニトロチロシン化反応の上昇がみられる。⁹⁾ nNOSの発現は、主に神経細胞においてみられ、eNOSとiNOSの誘導はアストログリア細胞にみられる。同時にこれらの神経細胞、アストログリア細胞ではニトロチロシンの免疫反応がみられる。アルツハイマー型認知症の原因であるアミロイドβタンパク質の蓄積がアルツハイマー病初期は脳毛細血管にみられることも多く、血管内皮細胞でのDY-9760eのeNOS活性とニトロチロシン化反応の抑制作用は徐々に進行する脳変性疾患の血管保護薬としても有用であると考えられる。一般的に

はeNOSにより産生されたNOは血管拡張作用、抗血栓作用、抗炎症作用により毛細血管に対して保護的に働くと考えられている。しかし、血流低下や酸化ストレスでBH4が低下したアルツハイマー病脳ではeNOSがアンカップリング状態でスーパーオキシドを産生する可能性は高い。このことがさらに炎症を悪化させる要因になる。BH4もこの点から血管保護薬としての可能性も指摘されている。DY-9760eはカルモデュリン阻害剤であり、平滑筋の収縮を抑制するとの懸念があるが、平滑筋のミオシン軽鎖キナーゼはほとんど抑制しないことから、循環系への影響は低い。¹⁵⁾

5. おわりに

本研究ではマイクロスフェア脳塞栓モデルラットを用いて脳毛細血管内皮細胞でのeNOSの誘導と脳虚血後の血管病変との係わりについて示した。eNOS誘導がニトロチロシン化反応を引き起こし、血管内皮細胞においてカルパーゼ-3によるPARPの分解、アポトーシスを引き起こす可能性を示唆している。しかし、内皮細胞でニトロチロシン化されるタンパク質の同定と血管障害との因果関係は不明であり、今後の課題である。DY-9760eによるeNOSの活性化とニトロチロシン化反応の抑制は毛細血管内皮細胞を保護して、脳浮腫を抑制することを明らかにした (Fig. 3)。これまでわれわれはDY-9760eの脳保護作用を報告してきたが、本薬物の持つ脳毛細血管内皮細胞保護作用もまた重要な薬理作用を担っていると考えられる。スタチン系薬物、BH4に加えて新規カルモデュリン阻害剤もまた、血管保護薬として動脈硬化による脳梗塞の治療薬として有効であることが示された。

REFERENCES

- 1) Iadecola C., *Trends Neurosci.*, **20**, 132-139 (1997).
- 2) Radomski M. W., Palmer R. M., Moncada S., *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 325-328 (1990).
- 3) Morikawa E., Moskowitz M. A., Huang Z., Yoshida T., Irikura K., Dalkara T., *Stroke*, **25**, 429-435 (1994).
- 4) Huang M., Manning Jr. R. D., LeBlanc M. H., Hester R. L., *Am. J. Hypertens.*, **8**, 358-364 (1995).
- 5) Endres M., Laufs U., Huang Z., Nakamura

- T., Huang P., Moskowitz M. A., Liao J. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 8880–8885 (1998).
- 6) Laufs U., Gertz K., Dirnagl U., Bohm M., Nickenig G., Endres M., *Brain. Res.*, **942**, 23–30 (2002).
- 7) Hashiguchi A., Yano S., Morioka M., Hamada J., Ushio Y., Takeuchi Y., Fukunaga K., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **24**, 271–279 (2004).
- 8) Hashiguchi A., Kawano T., Yano S., Morioka M., Hamada J., Sato T., Shirasaki Y., Ushio Y., Fukunaga K., *Neuroscience*, **121**, 379–386 (2003).
- 9) Luth H. J., Munch G., Arendt T., *Brain. Res.*, **953**, 135–143 (2002).
- 10) Cruthirds D. L., Novak L., Akhi K. M., Sanders P. W., Thompson J. A., MacMillan-Crow L. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **412**, 27–33 (2003).
- 11) Han F., Shirasaki Y., Fukunaga K., *J. Neurochem.*, **99**, 97–106 (2006).
- 12) Shirakura T., Han F., Shiota N., Moriguchi S., Kasahara J., Sato T., Shirasaki Y., Fukunaga K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1658–1661 (2005).
- 13) Aulak K. S., Miyagi M., Yan L., West K. A., Massillon D., Crabb J. W., Stuehr D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 12056–12061 (2001).
- 14) Mihm M. J., Jing L., Bauer J. A., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, 182–187 (2000).
- 15) Fukunaga K., Ohmitsu M., Miyamoto E., Sato T., Sugimura M., Uchida T., Shirasaki Y., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 693–699 (2000).
- 16) Sato T., Morishima Y., Shirasaki Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 1042–1047 (2003).
- 17) Han F., Shirasaki Y., Fukunaga K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 529–536 (2006).