

## 虚血性脳障害の病態解析と治療戦略

高木 教夫

## Pathology and Strategies for the Treatment of Ischemic Brain Injury

Norio TAKAGI

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

(Received May 30, 2009)

Cerebral ischemia, a pathological condition in which brain tissue experiences a shortage or lack of glucose and oxygen, provokes an irreversible neurodegenerative disorder that may lead clinically to a progressive dementia and global cognitive deterioration. Accumulating evidence indicates many biochemical cascades that lead ultimately to ischemia-induced cell death. However, the cellular and molecular aspects of cerebral ischemia are not yet fully understood. Since the pattern of pathophysiological alterations is not the same for all cells in the ischemic brain, a good understanding of the cellular and molecular alterations induced by cerebral ischemia is needed to develop strategies for the treatment of stroke. This review summarizes recent advances concerning the pathophysiological alterations caused by cerebral ischemia, focusing on the modification of properties of glutamate receptors, which modification may be linked to the development of cerebral infarction. Furthermore, the effects of hepatocyte growth factor on learning dysfunction and cerebral vessel injury after cerebral ischemia are also summarized. Finally, this review describes a possible ameliorative effect of the injection of exogenous neural progenitor cells on cerebral ischemia-induced learning and memory dysfunction.

**Key words**—cerebral ischemia; *N*-methyl-D-aspartate receptor; hepatocyte growth factor; neural progenitor cell; learning and memory

## 1. はじめに

脳卒中はわが国における死亡原因第3位の疾患であるばかりでなく、いわゆる「寝たきり」などの日常生活の質の低下を招来する。そのため、脳卒中の罹患率及び死亡率のより一層の改善は社会的・医療的急務であると言えよう（健康日本21中間報告、厚生省・厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会）。脳卒中は脳梗塞、脳出血、くも膜下出血に大別され、なかでも脳血管が閉塞して起こる脳梗塞は脳卒中の大部分を占める病態である。脳梗塞によって脳細胞が不可逆的損傷を受けると、元来それらが緻密なネットワークを形成し発揮していた中枢高次機能は不全に陥る。脳梗塞病態は刻一刻と変化する空間的多層性を持つため、その詳細な病態把握は急

性期から慢性期に至る治療戦略をたてるために必要不可欠である。本稿では虚血性脳障害の病態解析とその治療戦略に関する研究成果を述べる。

## 2. 脳虚血後のNMDA受容体チロシリン酸化

グルタミン酸は中枢神経系の興奮伝達の大部分を担い、その受容体は神経系の発生及び分化、シナプスの機能維持、記憶・学習などの高次中枢機能を発揮する上で重要な役割を果たしている。一方、グルタミン酸受容体の過剰刺激は神経細胞障害を惹起し、種々の中枢神経疾患の病態にも深く関与している。このグルタミン酸受容体を介した神経毒性は脳梗塞急性期の病態としても広く認知されている。しかし、神経毒性を惹起する主要な受容体である*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の遮断薬は重篤な副作用を発現するため、脳虚血障害治療薬としての開発は困難の様相を呈している。この理由として、グルタミン酸受容体の病態生理学的変化の把握が不十分である可能性がある。したがって、脳虚血後の受容体機能の制御機構を詳細に把握することは

東京薬科大学薬学部分子細胞病態薬理学教室（〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1）

e-mail: takagino@toyaku.ac.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

新たな治療薬開発にとって必要であると考えられる。NMDA 受容体は NR1 サブユニットと NR2 (NR2A-NR2D) あるいは NR3A サブユニットから構成される。NR1 サブユニットは NMDA 受容体チャネル活性発現のために必須であり、NR2 サブユニットは NR1 との組合せにより受容体機能を修飾し、その機能的多様性を与えると考えられている。例えば、NMDA 受容体のイオンチャネル機能は NR2A 及び NR2B のチロシンリン酸化によって増強される。<sup>1,2)</sup> このように、イオンチャネルとしての特性を調節する要因として NMDA 受容体のチロシンリン酸化は研究されてきているが、脳虚血後の病態生理学的意義は解明されていない。本稿でははじめに脳虚血後の NMDA 受容体チロシンリン酸化について述べる。

ラット一過性全脳虚血モデルを用い、虚血に対して脆弱性が高い海馬の NMDA 受容体チロシンリン酸化を検討したところ、NR2A 及び NR2B サブユニットのチロシンリン酸化が著しく増大していた。<sup>3,4)</sup> 前述したイオンチャネル機能の制御機構を考え合わせると、ここで観察された NR2 サブユニットのチロシンリン酸化増大は、そのイオンチャネル活性の上昇につながると考えられる。その結果、カルシウムイオンの過剰流入が惹起され、その後の脳虚血病態の推移に密接に関係することが推察される。興味深いことに NR1-NR2A の組合せで受容体を発現させた HEK293 細胞は NR2B との組合せよりも NMDA 受容体依存性の神経細胞死亡率が高いと報告されている。<sup>5)</sup> すなわち NR2 サブユニットのチ

ロシンリン酸化はそれぞれ異なる病態生理学的意義を持つ可能性が示唆される。例えば、脳虚血後のチロシンリン酸化 NR2B サブユニットは、その細胞内の pYXXM 配列を介して、SH2 含有タンパク質と結合し、細胞内情報伝達の一部を担っている可能性が報告されている。<sup>4,6)</sup>

次に、グルタミン酸受容体の 1 つである代謝調節型グルタミン酸受容体に着目し、NR2 サブユニットのチロシンリン酸化経路を検討した。はじめに、一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いた検討の結果、group I 代謝調節型グルタミン酸受容体の 1 つ mGluR1 のアンタゴニスト LY367385 の投与によって梗塞巣の拡大が軽減された。<sup>7)</sup> この梗塞巣拡大の軽減に先だって NR2A のチロシンリン酸化が LY367385 によって抑制されることを明らかにした [Fig. 1 (A)].<sup>7)</sup> 興味深いことに、LY367385 は一過性中大脳動脈閉塞後の NR2B チロシンリン酸化増大にはなんら影響を及ぼさなかった [Fig. 1 (B)].<sup>7)</sup> さらに LY367385 はシナプス後肥厚部への PKC の移行 [Fig. 1 (C)] や非受容体型チロシンキナーゼ src の活性化も抑制する [Fig. 1 (D)] ことを明らかにした。<sup>7)</sup> すなわち、NR2A サブユニットのチロシンリン酸化には mGluR1 を介した PKC の膜移行や src の活性化が寄与すると考えられた。そこで、src family tyrosine kinase inhibitor (PP2) を投与すると、NR2A のチロシンリン酸化のみが抑制され、梗塞巣は縮小した。<sup>7)</sup> これらの結果は一過性中大脳動脈閉塞後の mGluR1 の刺激は PKC/src カスケードを介して NR2A チロシンリン酸化の増大を引き起こ

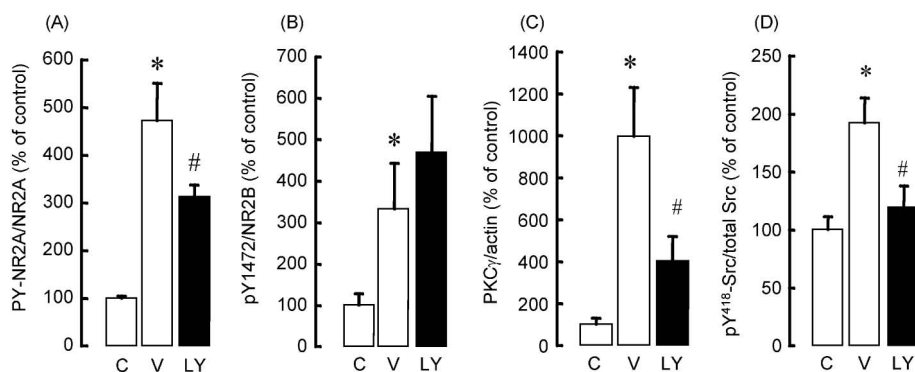


Fig. 1. Effect of mGluR1 Antagonist on Phosphorylation and Localization of Proteins after Transient Focal Ischemia

Effect of mGluR1 antagonist LY367385 on tyrosine phosphorylation of NR2A (A) and NR2B (B) subunits, the amount of PKC $\gamma$  (C), and src activation (D) in the post-synaptic density fraction at 4 h of reperfusion. C: naïve control, V: vehicle-treated ischemic rats, LY: LY367385-treated ischemic rats. \*Significant difference from naïve control rats,  $p < 0.05$ . #Significant difference from vehicle-treated ischemic rats,  $p < 0.05$ .

し、その後の梗塞巣形成及び拡大に寄与する可能性を示した。<sup>7)</sup> タンパク質リン酸化にはホスファターゼ活性の変化も関与することが十分に考えられる。本研究は脳虚血後に惹起される NR2A チロシンリン酸化の機序と治療ターゲットとしての可能性を示したが、今後各 NR2 サブユニットチロシンリン酸化のさらなる機序解明と脳梗塞急性期における病態生理学的意義の検討が必要であると言える。

### 3. 虚血性脳障害に及ぼす肝細胞増殖因子の効果

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は肝細胞の強力な増殖因子としてだけでなく、様々な臓器で血管新生、組織再生、恒常性維持等、多彩な機能を発揮することが明らかになっている。HGF とその受容体 c-Met は脳組織にも発現していることがわかり、虚血性脳障害への応用が期待されてきている。そこで、急性期以降の継続的な治療戦略として、虚血性脳組織障害とその後に起こる高次中枢機能障害に及ぼす HGF の効果を検討した。

血液脳関門の機能が破綻すると、緻密に制御されていた物質移行が障害され、脳内の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この血液脳関門破綻によって生じる脳浮腫である。このような血液脳関門の機能破綻に起因する脳梗塞の急性期病態は後発する梗塞巣拡大へとつながると考えられている。そこで、ヒト多発梗塞を模倣する脳塞栓モデルを用い、血液脳関門破綻に及ぼす HGF の効果を検討した。はじめに血液脳関門に存在するタイトジャンクション構成タンパク質 occludin, claudin-5 及び ZO-1 の局在を内皮細胞マーカー rat endothelial cell antigen (RECA) との二重染色で検討した。内皮細胞に存在する occludin は脳塞栓後 6 時間目から減少し始め、その減少は 72 時間目まで持続していた。<sup>8)</sup> ZO-1 の発現も occludin と同様の推移を示したが、claudin-5 の発現は脳塞栓後変化しなかった。<sup>8)</sup> これらタイトジャンクション構成タンパク質の局在変化に対して HGF は血管内皮細胞に存在する occludin 及び ZO-1 の減少を抑制した。<sup>8)</sup> 次に蛍光標識アルブミン (FITC-albumin) で脳内を灌流すると血管外への FITC-albumin の漏出が脳塞栓後 3 日目をピークに 7 日まで持続していた。HGF はこの FITC-albumin の漏出も抑制し、急性期における血液脳関門破綻を抑制していることが示唆された。<sup>8)</sup>

さらに、FITC-albumin の灌流により脳塞栓後の脳血管の走行性を観察すると、大脳皮質の側頭皮質領域及び海馬で灌流血管領域が減少し、HGF はそれら灌流血管数の減少を抑制した。<sup>9)</sup> また、HGF 投与群では、未熟な血管新生により出血を招来しやすいと考えられている蛇行血管は極めて少なく、規則正しく整列した血管走行が主に観察された。<sup>9)</sup> この HGF の効果は血管新生の促進よりむしろ血管内皮細胞障害の抑制に起因することも本研究は明らかにした。<sup>9)</sup>

培養海馬神経細胞を用いた検討では、NMDA 誘発神経細胞障害が HGF 処置により濃度依存的に減少した。<sup>7)</sup> また、HGF は caspase 活性を抑制するばかりでなく、非 caspase 経路に属する apoptosis-inducing factor (AIF) の核内移行も抑制した。<sup>10)</sup> さらにラット一過性全脳虚血モデルを用い、HGF が海馬 CA1 領域の神経細胞死を濃度依存的に抑制することを明らかにした。<sup>11)</sup> この細胞死抑制機序を検討した結果、HGF は酸化的 DNA 障害、タンパク質のポリ ADP- リボシル化及び AIF の核内移行をそれぞれ顕著に抑制していた。<sup>11)</sup> 次に、ヒト多発梗塞を模倣する脳塞栓モデルを用い高次中枢機能を空間記憶・学習能試験の 1 つである水迷路試験で検討した結果、HGF は重篤な脳虚血病態で惹起される空間記憶学習能の低下を改善し、かつ組織脱落を一部抑制した。<sup>9)</sup>

以上のように、HGF は脳梗塞急性期において血管内皮細胞死を抑制し、かつタイトジャンクションタンパク質の減少を抑制することが明らかとなった。この抑制効果によって血液脳関門の機能が維持され、後発する梗塞巣の拡大が抑制されたと示唆される。さらに、HGF は caspase 経路を抑制するばかりでなく非 caspase 経路の AIF 核内移行も阻害し、虚血性神経細胞死を抑制することが明らかとなり、これら多彩な作用に基づき HGF は記憶・学習能障害を改善したと考えられた。

### 4. 虚血性脳障害に及ぼす神経前駆細胞の効果

本稿ではさらに、長期的な治療戦略として虚血性脳障害に及ぼす神経幹/前駆細胞の効果について述べる。中枢神経系の実質は主に neuron, astrocyte 及び oligodendrocyte から構成されている。神経幹/前駆細胞はこれらすべての細胞に分化する多分化能と、同じ多分化能を持つ細胞を分裂によって複製

することができる自己複製能を持つ細胞と定義される。このような性質を持つ神経幹/前駆細胞を中枢神経系疾患に応用する試みは既に行われておりいくつかの成果が報告されている。例えば、脊髄損傷モデルラットに神経前駆細胞を注入することで注入された細胞は neuron へと分化し、上肢機能が改善すること<sup>12)</sup>や、多発性硬化症モデルマウスに神経前駆細胞を注入することによって運動機能が回復すること<sup>13)</sup>などが報告されている。そのほかにもパーキンソン病、<sup>14)</sup> 脳外傷、<sup>15)</sup> ハンチントン病<sup>16)</sup>などの中枢神経系疾患の病態モデルで改善効果が得られている。脳血管障害に対しても神経幹/前駆細胞の応用が期待されているが、脳梗塞病態に対する神経幹/前駆細胞注入の効果はその運動機能障害の改善あるいは組織学的所見に焦点を当て報告されてきてはいるものの、記憶・学習能障害に対する効果の研究は極めて少ない。認知障害の改善も脳梗塞後の治療において重要な克服課題である。そこで、上述した多発性脳塞栓を模倣する脳塞栓モデルを用い、虚血性脳障害に及ぼす神経前駆細胞脳内注入の効果を検討した。

Green fluorescent protein (GFP)-transgenic ラットの胎生 14 日胚の脳から神経前駆細胞に富む細胞画分を単離し、neurosphere 単離法で神経前駆細胞の選択的培養を行った。<sup>17)</sup> ここで得られた GFP 陽性神経前駆細胞を脳塞栓ラット脳に注入した。組織学的検討により、注入された神経前駆細胞は障害領域へと遊走し未分化な状態、あるいは astrocyte 及び neuron へと分化していた。<sup>17)</sup> この神経前駆細胞の注入は組織の脱落を一部改善し、さらに空間記憶学習能障害も改善した (Fig. 2).<sup>17)</sup>

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は中枢神経系に豊富に存在し、空間記憶学習能を發揮する上で重要な役割を担っていると考えられている。<sup>18)</sup> また、BDNF は一過性局所脳虚血後の梗塞巣拡大を軽減することも報告されている。<sup>19)</sup> 次に、BDNF 量の変化を検討した結果、脳塞栓後の脳組織 BDNF 量は顕著に減少し、神経前駆細胞の注入によりこの減少は抑制された。<sup>17)</sup> BDNF の局在を組織学的に観察すると、BDNF タンパク質は GFP 陽性細胞内あるいはその近傍で検出された。これらの結果は、神経前駆細胞の障害改善機序の一端として BDNF 等の神経栄養因子の合成・放出が寄与していることを示唆させる。一方、神経前駆細胞の注入

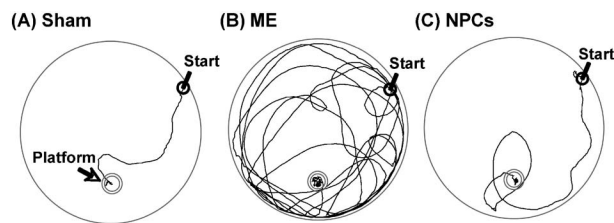


Fig. 2. Effect of Injection of NPCs on Learning and Memory Function

Typical swimming locus of sham-operated rats (A), vehicle-injected microsphere-embolized rats (B), and neural progenitor cells (NPCs)-injected microsphere-embolized rats (C) in the retention test on day 28 after the embolism.

は脳塞栓後の組織障害を完全に修復・再生することができなかった。現在、注入経路や注入時期などを考慮し、より効果的な方法を検討すると同時に慢性期虚血性脳障害に対する改善効果の機序解明を試みている。

## 5. おわりに

脳梗塞急性期から慢性期に至る多種多様な病態を把握し、それに即した包括的な治療戦略は脳梗塞治療に重要であると考えられる。そのために、これまで得られた結果をさらに詳細に検討すると同時に、これら知見を種々の中枢神経疾患の病態解明及び治療に応用することも今後の課題である。

謝辞 以上の研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご助言を賜りました東京薬科大学名誉教授竹尾聰先生に慎んで感謝の意を表します。また、多くの有益なご助言を頂きました同大学教授田野中浩一先生に感謝の意を表します。本研究成果は東京薬科大学分子細胞病態薬理学教室の多くの大学院生と学部生の協力のもとに得られたものです。皆様から感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Wang Y. T., Yu X. M., Salter M. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1721–1725 (1996).
- 2) Wang Y. T., Salter M. W., *Nature*, **369**, 233–235 (1994).
- 3) Takagi N., Shinno K., Teves L., Bissoon N., Wallace M. C., Gurd J. W., *J. Neurochem.*, **69**, 1060–1065 (1997).
- 4) Takagi N., Sasakawa K., Besshoh S., Miyake-Takagi K., Takeo S., *J. Neurochem.*, **84**, 67–76 (2003).

- 5) Anegawa N. J., Lynch D. R., Verdoorn T. A., Pritchett D. B., *J. Neurochem.*, **64**, 2004–2012 (1995).
- 6) Hisatsune C., Umemori H., Mishina M., Yamamoto T., *Genes Cells*, **4**, 657–666 (1999)
- 7) Murotomi K., Takagi N., Takayanagi G., Ono M., Takeo S., Tanonaka K., *J. Neurochem.*, **105**, 1625–1634 (2008).
- 8) Date I., Takagi N., Takagi K., Tanonaka K., Funakoshi H., Matsumoto K., Nakamura T., Takeo S., *Neurosci. Lett.*, **407**, 141–145 (2006).
- 9) Date I., Takagi N., Takagi K., Kago T., Matsumoto K., Nakamura T., Takeo S., *J. Neurosci. Res.*, **78**, 442–453 (2004).
- 10) 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).
- 11) Niimura M., Takagi N., Takagi K., Mizutani R., Ishihara N., Mastumoto K., Funakoshi H., Nakamura T., Takeo S., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **26**, 1354–1365 (2006).
- 12) Ogawa Y., Sawamoto K., Miyata T., Miyao S., Watanabe M., Nakamura M., Bregman B. S., Koike M., Uchiyama Y., Toyama Y., Okano H., *J. Neurosci. Res.*, **69**, 925–933 (2002).
- 13) Pluchino S., Quattrini A., Brambilla E., Gritti A., Salani G., Dina G., Galli R., Del Carro U., Amadio S., Bergami A., Furlan R., Comi G., Vescovi A. L., Martino G., *Nature*, **422**, 688–694 (2003).
- 14) Takagi Y., Takahashi J., Saiki H., Morizane A., Hayashi T., Kishi Y., Fukuda H., Okamoto Y., Koyanagi M., Ideguchi M., Hayashi H., Imazato T., Kawasaki H., Suemori H., Omachi S., Iida H., Itoh N., Nakatsuji N., Sasai Y., Hashimoto N., *J. Clin. Invest.*, **115**, 102–109 (2005).
- 15) Riess P., Zhang C., Saatman K. E., Laurer H. L., Longhi L. G., Raghupathi R., Lenzlinger P. M., Lifshitz J., Boockvar J., Neugebauer E., Snyder E. Y., McIntosh T. K., *Neurosurgery*, **51**, 1043–1052 (2002).
- 16) Lee S. T., Chu K., Park J. E., Lee K., Kang L., Kim S. U., Kim M., *Neurosci. Res.*, **52**, 243–249 (2005).
- 17) Mochizuki N., Takagi N., Kurokawa K., Onozato C., Moriyama Y., Tanonaka K., Takeo S., *Exp. Neurol.*, **211**, 194–202 (2008).
- 18) Black I. B., *J. Neurobiol.*, **41**, 108–118 (1999).
- 19) Schäbitz W. R., Schwab S., Spranger M., Hacke W., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **17**, 500–506 (1997).