

第123回 奈良医学会 シンポジウム「脳虚血と神経の再生」

【開催】平成15年5月21日水曜日午後6時～7時30分

【場所】臨床第1講義室

【当番世話人】第2解剖学教室 和中明生教授

【プログラム】

会長挨拶 吉田 修会長

講演 座長 和中明生教授

1) 木村僚太, 新 靖史, 中瀬裕之, 榊 寿右

奈良県立医科大学脳神経外科学教室

「脳静脈梗塞急性期における血管原性脳浮腫と VEGF 発現」

2) 仮屋真吾, 平野牧人, 上野 聡

奈良県立医科大学神経内科学教室

「無血清培養により誘導されるヒトリンパ球および PC12 細胞の آپトトーシスとヒューマニンによる細胞死抑制」

3) 堀内俊孝, 川口昌彦, 坂本尚典, 栗田直子, 垣本めいこ, 井上聡己,
古家 仁

奈良県立医科大学麻酔科学教室

「Delta-opioid agonist (SNC 80) がラット脊髄虚血後の後肢運動機能および神経障害に及ぼす影響」

招待講演 座長 吉田 修会長

大阪大学ポストゲノム疾患解析学 遠山正彌教授

「脳虚血, 神経変性疾患における小胞体ストレスの意義」

<招待講演要旨>

神経細胞死の新しい概念—小胞体ストレス—

大阪大学ポストゲノム疾患解析学

遠山正彌教授

小胞体ストレスから細胞死を守る経路: 小胞体では多くの蛋白質が産生されるが, それと同時に蛋白質の品質管理を行っている。即ち, 小胞体内で正しく折り畳まれた蛋白質はゴルジ装置に輸送されるが, 折り畳みが不良の時には, 折り畳みを正常に行わせるシステムが稼働する (Unfolded Protein Response, UPR)。小胞体内に出現した折り畳み不良蛋白質は小胞体膜に存在する3種のセンサー, Ire1, ATF6, PERKにより感知される。Ire1が折り畳み不良蛋白質を感知すると転写因子 XBP1の前駆体 mRNA をスプライシングし翻訳抑制を解除し, XBP1蛋白質が産生される。産生された XBP1蛋白質は分子シャペロン GRP78 (Bip)蛋白質を発現させる。この GRP78は細胞質から小胞体内にはいり, 折り畳み不良蛋白質を正常化する。ATF6が折り畳み不良蛋白質を感知すると 90kd の ATF6 から 50kdATF6 が切り離される。50kdATF6は核内に移行し分子シャペロン GRP78蛋白質を産生, この GRP78は小胞体内にもどり折り畳み不良蛋白質を正常化する。一方 PPERK が折り畳

み不良蛋白を感知する自己リン酸化し eIF2 α を活性化(リン酸化)を活性化する。この活性化は蛋白翻訳を抑制し、これ以上折り畳み不良蛋白が小胞体内に蓄積するのを防ぐ。この一連の反応を UPR とよび、折り畳み不良蛋白が小胞体内に現れると小胞体は UPR の助けを得て折り畳み不良蛋白は正常化させる。正常化した蛋白質はゴルジ装置に運ばれる。しかしながらどうしてもうまく折り畳めない蛋白質は Sec61 等で構成されるチャネルから細胞質に運ばれ、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解される。この経路は Endoplasmic Reticulum- Associated Degradation (ERAD) と呼ぶ。この小胞体での蛋白修飾がかく乱され、折り畳み異常蛋白質が小胞体内に異常蓄積する状況を作り出す状態を小胞体ストレスと呼び低酸素刺激などがその代表である。

小胞体ストレスにより細胞死が生ずる経路：小胞体ストレスが生じた際の細胞の生死は UPR と ERAD による防御システムとアポトーシスシステムのバランスにより決定される。即ち細胞死を守るシグナルを出す Ire1 は細胞死をも引きおこす。すなわち Ire1 は TRAF2, ASK1 と複合体を作る。この複合体は JNK シグナル経路を活性化させ、死に導く。

小胞体の機能異常を起源とする細胞死：神経系の各種疾患で症状発現の基盤となる神経細胞死が「蛋白質の品質管理を司る小胞体の機能異常を起源とする」アポトーシスであることが近年急速に明らかとされつつある。アルツハイマー病、脳虚血或いはパーキンソン病における神経細胞死などである。

アルツハイマー病における神経細胞死；アルツハイマー病は遺伝性で若年に発現する家族性アルツハイマー病と原因が不明でやや老年で発現する孤発性アルツハイマー病に区別されている。しかし前者はアルツハイマー病の 5% を後者は 95% を占める。この両者の病理像は同一であることから(老人斑の出現； $A\beta$ 蛋白の沈着と神経原線維変化：タウ蛋白の沈着)，両者の神経細胞死の分子機序は共通であることが想像されるが、その本態は不明であった。片山、今泉らは両者における神経細胞死が先に述べた小胞体の三種のセンサーの機能異常であることを明らかとした。即ち、彼らは家族性アルツハイマー病で最も変異が多いプレセニリン 1 (PS1) の遺伝子変異より産生される変異蛋白が細胞死を引きおこすか引きおこすとすればどのような機序で引きおこすのかを検討した。その結果 PS1 変異体は先に述べた 3 種のストレストランスデュサー、Ire1, ATF6, PERK の活性化を障害することを明らかとした。それゆえ神経細胞に低酸素などの小胞体ストレスが加えられると小胞体は小胞体ストレスにより産生され、小胞体に蓄積する折り畳み不良蛋白の処理が不可能となり、小胞体内に折り畳み不良蛋白が過剰蓄積神経細胞は死に至る。一方孤発性アルツハイマー病では細胞死を引きおこす原因物質の推測すらなかったが、彼らは原因物質と細胞死の分子機序を解明した。即ち低酸素負荷により神経細胞に特異的に発現上昇する HMGAla がプレセニリン 2 (PS2) 前駆体 mRNA エクソン 5 の 3 '端の特異構造と結合、さらにスプライシング因子の活性を制御、その結果エクソン 5 もイントロンと読み間違えられ、エクソン 5 を欠損する PS2 成熟 mRNA が神経細胞特異的に産生される。このスプライシング異常により産生された PS2 スプライシング変種 (PS2V) は小胞体ストレスセンサーの活性化を阻害する。それ故 PS2V が産生された神経細胞に小胞体負荷が加えられると神経細胞は死に至る。即ち、家族性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病両者の神経細胞死は小胞体のストレスセンサーの活性化障害による、小胞体の機能異常を起源とする神経細胞死であることが明らかとされた。さらに PS1 変異体あるいは PS2V の細胞内導入は $A\beta$ の分泌上昇をもたらすことも証明した。

それでは折り畳み不良蛋白が長年に渡りじわじわと過剰蓄積した神経細胞はどのような機序でアポトーシスへの引き金を引くのであろうか？詳細な機序は解明されていないが小胞体からカスパー 4 が (マウス、ラットなどではカスパー 12) 細胞質に流出し、カスパー 3 を活性化し死に至ると考えられている。即ち、ミトコンドリアの関与は細胞死の直前までは殆どないと思われる (虚

血による神経細胞死の分子機序との違い)。

虚血における神経細胞死の分子機序；小川らは虚血における神経細胞死の分子機序を解明するために神経細胞は虚血により容易に死に至るがアストロサイトは虚血負荷に耐性を示す事実に着目した。即ちアストロサイトには虚血負荷を加えられた際に、虚血負荷下を生き抜くツールを発現すると想定し、虚血負荷にのみ特異的にアストロサイトで発現上昇する因子の探索に着手し、150kd Oxygen Regulated Protein (ORP150)の単離とその機能解析に成功した。ORP150は熱ショック類縁蛋白に属する新規ストレス蛋白(シャペロン)であり小胞体局在シグナルを有し、小胞体で働く。アストロサイトでのORP150の発現を抑制するとアストロサイトは虚血耐性を失い、虚血負荷により容易に細胞死に至る。これらの細胞では小胞体からゴルジ装置への物質輸送が停止している。即ちORP150はATPが枯渇する様なシビアな虚血負荷のような環境で小胞体からゴルジ装置への物資輸送を担う究極のシャペロンであり、アストロサイトが虚血負荷下を生き抜く必須のツールであることがわかる。一方ORP150を神経細胞に強制発現させると神経細胞は虚血耐性となる。さらに神経細胞に特異的にORP150を強制発現させたトランスジェニックマウスに中大脳動脈を結紮して脳梗塞を引き起こすと、正常マウスに比し、梗塞巣が著しく小さくなる(神経細胞死をブロックできた)。言い換えると、神経細胞にせよアストロサイトにせよORP150が担う小胞体機能を守ることにより神経細胞やアストロサイトは虚血負荷下を生き抜くことができる。虚血による神経細胞死は小胞体でORP150が十分に機能できないことによる細胞死、小胞体の機能異常を起源とする神経細胞死である。しかし、虚血による神経細胞死は同じ小胞体の機能異常を起源とする神経細胞死であるが小胞体以降の経路はこの両者で大きく異なる。すなわち激しい小胞体ストレスが加えられると小胞体ストレスはミトコンドリアに伝達される。ミトコンドリア内膜に存在する cytochrome c oxidase (COX)は8種のサブユニットから成る。酵素活性中心はCOXI, IIに存在し、この両者が会合するにはCOXIVを必須とする。激しい小胞体ストレスはCOXIV, Vの発現を抑制し、COXIIの分解を促進する。さらにCOXI, IIの会合をも阻止する。即ち、激しい小胞体ストレスによりミトコンドリアの機能障害が引き起こされる。ミトコンドリアではこの機能障害を防ぐシステムも稼働される。即ち小胞体ストレスによりミトコンドリアのAAAファミリーに属するLonの発現を高める。Lonの過剰発現は小胞体負荷によるCOXI, IIの会合阻止に抑制を欠け、会合に向かわせ、ミトコンドリアの機能保護に努める。これらの機能破綻と機能防御のバランスがくずれるとミトコンドリアは機能障害に至り、COXの流出、COXとApaf1との結合、カスパー3の活性化へと連なり、細胞死が惹起される。虚血のような激しい小胞体負荷による細胞死は小胞体の機能異常⇒ミトコンドリアの障害から惹起されるのかもしれない。

関連する主な文献

- 1) Sato, N. et al., A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue. *J. Neurochem.*, 72: 2498-2505 (1999).
- 2) Katayama, T. et al.: Presenilin-1 mutations downregulate the signaling pathway of unfolded protein response. *Nat, Cell Biol.*, 1: 479-485 (1999).
- 3) Katayama, T et al.: Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 mutations. *J. Biol. Chem.*, 276: 43446-43454 (2001).
- 4) Sato, N. et al.: Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2. *J. Biol. Chem.*, 276: 2108-2114 (2001).

- 5) Manabe, T. et al., the cytosolic inclusion bodies that consist of splice variants that lack exon 5 of the presenilin-2 gene differ obviously from Hirano bodies observed in the brain from sporadic cases of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.*, 323: 198-200 (2002)
- 6) Manabe, T., et al., induced HMGAla expression causes aberrant splicing of presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.*, 10:698-708 (2003).
- 7) Kuwabara, K. et al.: Purification and characterization of a novel stress protein, the 150kDa oxygen regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes, and its expression in ischemic mouse brain. *J. Biol. Chem.*, 279: 5025-5032 (1996).
- 8) Tamatani, M. et al.: ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat. Med.*, 7: 317-323 (2001).
- 9) Hori, O. et al.: Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: expression of Lon protease. *J. Cell Biol.*, 157: 1151-1160 (2002).
- 10) Kitao, Y. et al.: Expression of 150kDa oxygen regulated protein (ORP150), a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum, rescues hippocampal neurons from glutamate toxicity. *J. Clin. Invest.*, 108: 1439-1450 (2001).

<依頼講演要旨>

脳静脈梗塞急性期における血管原性脳浮腫と VEGF 発現

木村僚太 中瀬裕之 川口正一郎 榊寿右
奈良県立医科大学脳神経外科学教室

(目的) 静脈梗塞に伴う血管原性脳浮腫 (以下脳浮腫) と血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現の関係を検討した。

(方法) 雄ウイスター系ラットを用いた (n = 15: 体重 230-300g)。全身麻酔下に左頭頂開頭を行い、光感受性色素を用いて隣接する 2 本の脳皮質静脈を閉塞した。24 時間後に、MRI (VARIAN UNITY INOVA, 4.7T) を用いて、T2 強調画像と拡散強調画像を撮像した。T2 強調画像と拡散強調画像のデータより、apparent diffusion coefficient of water map (ADCw map) を作成した。脳浮腫は ADCw map における高信号域として同定した。MRI 画像と組織標本 (HE 染色と VEGF に対する免疫染色) を比較検討した。

(結果) T2 強調画像では、左頭頂葉に広範囲の高信号域と著しい脳腫脹を認めた。HE 染色では、脳表に梗塞巣を認めた。同領域は拡散強調画像の高信号域と一致していた。免疫染色では、梗塞巣周囲の脳浮腫を示す ADCw map の高信号域に VEGF の発現を認めた。HE 染色では、同領域に明らかな病理学的変化を認めなかった。

(考察) 脳静脈梗塞では、脳動脈梗塞と比較して著しい脳浮腫を伴うことが知られている。近年、VEGF が動脈梗塞急性期に脳浮腫を増悪させ、梗塞巣を拡大させることや (1)、VEGF の中和抗体を投与することで、脳浮腫と梗塞巣を縮小させることができること (2) が報告され、脳浮腫の形成に VEGF が関与していることが明らかになってきた。

今回、ラット脳皮質静脈閉塞モデルのMRI画像と組織所見を比較することで、脳浮腫の領域にVEGFの発現を確認した。従って、脳静脈梗塞急性期においても、VEGFが脳浮腫の形成に関与している可能性が示唆された。

(文献)

- 1) Zheng G. Zhang et. : J Clin. Invest. 106 : 829-838, 2000.
- 2) Napoleone Ferrara et. : J Clin. Invest. 104 : 1613-1620, 1999.

Delta-opioid agonist (SNC 80) がラット脊髄虚血後の後肢運動機能 および神経障害に及ぼす影響

*堀内俊孝,*川口昌彦,*坂本尚典,*栗田直子,*垣本めいこ,*井上聡己,*古家 仁
#小西 登,#中村光利
奈良県立医科大学 *麻酔科学教室 #病理病態学教室

【目的】delta-opioid receptor は、冬眠の導入や臓器虚血耐性の獲得への関与が示唆され、一過性脳虚血モデルにおいてもその神経保護効果が報告されている。本研究では、delta-opioid agonist である SNC 80 が、ラット脊髄虚血後の後肢運動機能および神経障害に及ぼす影響について検討した。

【方法】雄性SDラットを用い、くも膜下腔カテーテルを環椎後頭骨間から腰髄膨大部まで挿入した。一週間後、イソフルレン麻酔下に SNC-80 (400nmol) または 20% DMSO (vehicle) をくも膜下投与し、15分後に9分間または11分間の脊髄虚血を施行した。群は、i) SNC 80 投与後9分間虚血 (SNC-9; n=12) ii) vehicle 投与後9分間虚血 (V-9; n=12) iii) SNC 80 投与後11分間虚血 (SNC-11; n=10) iv) vehicle 投与後11分間虚血 (V-11; n=12) v) sham (n=12) の5群とした。再灌流48時間後に、後肢運動機能をBassoらの方法で評価し、組織学的検討はL4脊髄レベルの正常神経細胞数にて評価した。

【結果】後肢運動機能はSNC-9群でV-9群に比し有意に良好であったが ($P<0.05$)、SNC-11群とV-11群の間では有意差はみとめられなかった。正常細胞数は、SNC-9群およびSNC-11群で、それぞれV-9群およびV-11群に比し有意に多かった ($P<0.05$)。

【結論】くも膜下に投与されたdelta-opioid agonist (SNC 80) が、ラット脊髄虚血後の運動機能障害および神経細胞障害を減弱させる可能性が示唆された。

無血清培養により誘導されるアポトーシスと、 Humanin による細胞死抑制

仮屋真吾 平野牧人 上野聡
奈良県立医科大学神経内科学教室

(目的)Humanin (HN)は、アルツハイマー病関連因子によって誘発される神経細胞死に対してのみ、特異的な抑制効果を発揮するペプチドとして報告された。本研究では、HNによる細胞死抑制効果が、より広いスペクトラムにおよぶ可能性について検討した。

(方法)無血清下で未分化PC12細胞またはヒト末梢血リンパ球を培養し、細胞当りのATP量・Caspase-3活性・核DNA断片化・生細胞数・細胞当りのミトコンドリアDNAコピー (mtDNA)数の変化に対する、HNの効果を解析した。

(結果) (1)無血清培養3日目における細胞当りのATP量は、実験開始時(コントロール)と比べ低下した。HN存在下でのATP量は、コントロールレベルを超えて著増した。(2)Caspase-3活性は、血清除去9時間後に最高値を示した。同活性の上昇は、HNによって抑制された。(3)無血清培養3日目にみられた核DNAの断片化は、HN添加群で抑制された。(4)無血清培養による生存率の低下は、HNによって阻止された。(5)血清除去後一過性に増加した細胞当りのmtDNA数は、3日目をピークに以降減少した。3日目におけるmtDNA数は、HNによってむしろ減少した。

(考察)血清除去による細胞死を抑制したことから、HNによる細胞死抑制効果がおよぶスペクトラムは、神経細胞あるいはアルツハイマー病関連因子のみに留まらず、より広い可能性が示唆された。HN治療群でmtDNA数が減少したのは、HNの一次効果によって細胞当りのATP量が著増したことに対する、細胞の二次的反応によるものと考えられた。ATP産生能を上昇し、細胞死を抑制するというHNの作用は、ATP産生障害が病態に関与するミトコンドリア病や脳虚血などへ応用することが出来るかもしれない。

(結語)HNによる細胞死抑制効果がおよぶスペクトラムは、広い可能性が示唆された。また、HNは細胞のATP産生能を増加することが示された。