

虚血性ペナンプラにおける分子病理

¹東京女子医科大学医学部神経内科学²東京女子医科大学病理学第一講座イノセ ユリ シバタ ノリユキ ウチヤマシンイチロウ
猪瀬 悠理^{1,2}・柴田 亮行²・内山真一郎¹

(受理 平成 25 年 11 月 11 日)

Molecular Pathology in Ischemic Penumbra

Yuri INOSE^{1,2}, Noriyuki SHIBATA² and Shinichiro UCHIYAMA¹¹Department of Neurology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine²Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University

Some hours after the onset of cerebral infarction, an irreversible coagulative necrotic core appears in the center of the lesion, surrounded by a reversible penumbra-corresponding zone (PCZ) characterized by neuronal survival despite reduced blood flow. Emerging evidence from experimental studies suggests that the crosstalk between neuronal and glial cells determines the survival or death of neurons within the PCZ. Immunohistochemical analysis of human PCZ using specific cell markers reveals a large number of enlarged, activated microglia and astrocytes. This glial activation may be driven mainly by the presence of hypoxic stress, oxidative stress, and danger signals generated from necrotic cells in the core. These stimuli induce glial inflammation, leading to lethal damage to adjacent neurons. In addition, impairment of the system regulating intra- and extracellular glutamate concentrations by neurons and glia causes increased extracellular glutamate levels, which are responsible for excitatory neurotoxicity. If lesional blood flow does not normalize spontaneously or appropriate treatment is not administered, the number of neurons remaining in the PCZ would begin to be reduced by programmed cell death. Modulation of glial activities in the PCZ is thus thought to prevent expansion of the infarct volume, which improves the functional prognosis of patients.

Key Words: cerebral ischemia, molecular pathology, penumbra

はじめに

脳卒中は日本人の三大死因のひとつである。中でも、脳梗塞患者数は社会の高齢化と食事内容の欧米化につれて増加の一途を辿っている¹⁾。組織プラスミノーゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator: t-PA) による治療が普及した今日において、脳梗塞発症後数時間以内に発見された幸運な患者の多くは、後遺症を残さずに完治するようになった²⁾。しかし、さらに時間が経過して t-PA の適応外となった患者は、病巣の残存により、何らかの後遺症に悩まされることになる。脳梗塞の後遺症は、症例により多岐に亘るが、しばしば日常生活動作 (activities of daily living: ADL) の低下を伴う。症候性脳梗塞

の場合、ADL 低下の程度は病巣の容積と正の相関を示す^{3,4)}。事実を考慮すれば梗塞巣の範囲を最小限にとどめることは、脳梗塞急性期治療における最大の課題である。

脳梗塞発症後数時間以上が経過すると、病巣中心部に不可逆的な段階である凝固壊死巣 (本稿ではコアと呼ぶ) が出現し、これを取り囲むように、血流が低下しているものの、ニューロンが生存し続けている辺縁帯 (本稿ではペナンプラ相当領域と呼ぶ) が形成される⁵⁾。ペナンプラ相当領域は、血行の自然回復が望めないか、適切な処置が施されない状況が続くと、ニューロンが消失し始めてコアの拡大を招いてしまうが、血行改善や早期治療の結果次第では

ニューロンをレスキューしうる余地を残していることから、可逆的な段階に留まっていると認識されている⁶⁾。本稿では、ペナンプラ相当領域で観察される形態学的変化およびその背景に横たわる各種機能分子の動向について概説するとともに、近年提唱されているニューロンの新規細胞死にも言及する。

1. 脳梗塞病巣の経時的変化

通常、脳組織を灌流する動脈が血栓子もしくは塞栓子によって閉塞すると、その直後から病巣中心部の神経機能低下が始まる^{7,8)}。いわゆるサイレントエリアでない限り、神経機能低下は神経症候として臨床的に顕在化する。この時点で、病巣中心部に巻き込まれたニューロンやグリアは、ミトコンドリア呼吸が停止してATP欠乏に陥り、 Na^+/K^+ -ATPaseによるイオンポンプが作動しない状況にあるため、 Na^+ と水分子(H_2O)が細胞外から細胞内へ流入し始め、細胞質と細胞内小器官の膨化により細胞内浮腫(cytotoxic edema)をきたす^{7,8)}。しかし、ライソソーム酵素の遊離による自己消化はまだ始まっておらず、病巣はMRI拡散強調画像によってのみ検出可能な可逆的な段階にあるといえる⁹⁾。この間、ATP供給は産生効率の低い嫌気性解糖に依存する結果、乳酸とビルビン酸の蓄積が細胞内アシドーシスをもたらし、DNAの凝集および粗面小胞体からのリボソームの遊離と崩壊が起こるため、核濃縮と細胞質の好酸性化を招来する。ATP欠乏はまた、 Ca^{2+} -ATPaseによるイオンポンプの破綻により細胞質の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、 Ca^{2+} 依存性の細胞質型ホスホリパーゼ A_2 (cytosolic phospholipase A_2 : cPLA $_2$)とカルパインを活性化する¹⁰⁾。このときを境に、病巣は不可逆的な段階に突入する。すなわち、両酵素はリン脂質と膜蛋白で構成される形質膜を消化するため、細胞内外の境界を不明瞭にさせるとともに、細胞内小器官崩壊の一環として、ライソソーム水解酵素群の細胞質への遊離を招く。こうして、病巣中心部の細胞はことごとく自己融解に陥り、凝固壊死を遂げてコアを形成する。血行途絶後数時間以上が経過すると、コアとペナンプラ相当領域の存在が明らかになる。ペナンプラ相当領域の形成過程については後に詳述するが、病巣から遊離拡散する炎症誘導物質とグルタミン酸が重要な役割を果たすと考えられている。

血行途絶後1日以上が経過したペナンプラ相当領域では、ストレス応答性シグナル伝達酵素p38マッピキナーゼ(mitogen-activated protein kinase: MAPK)の活性化が起こり、低酸素応答因子-1 α

(hypoxia-inducible factor-1 α : HIF-1 α)の安定化を介して血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)やその受容体の発現を誘導するため、毛細血管新生が起こる^{7,8,10)}。p38 MAPK経路はまた、血管内皮細胞に強力な炎症促進性サイトカインである腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF α)とインターロイキン-1 β (interleukin-1 β : IL-1 β)を誘導する^{11)~13)}。そして、これを皮切りに病巣周囲の炎症が本格化してゆく。新生血管の内皮細胞は、キニン・カリクレイン・ブラジキニン系の活性化を介する透過性亢進(血液脳関門の破綻)により細胞外浮腫(vasogenic edema)を惹き起こし、病巣周囲を腫脹させる。血管内皮細胞はまた、循環白血球を血管外にリクルートする。これは、血管内皮細胞が血管内にケモカインを放出すると同時に、細胞表面に細胞接着分子(cell adhesion molecule: CAM)を発現することに始まる。ケモカインは、血管内を偶然通りかかった白血球の表面に発現している受容体に作用し、内在するインテグリンを細胞表面に露呈させる。インテグリンはCAMの受容体に相当するため、この循環血液中白血球は血管内皮細胞との強力な結合を契機に血管外へ遊出し、病巣内浸潤白血球となる。好中球の浸潤は発症1日後以降、マクロファージの浸潤は発症3日後以降、それぞれ本格化する。浸潤好中球は、エラスターゼとマトリックスメタロプロテイナーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)の作用により血管壁や血管外組織を分解しながら病巣内を移動し、ミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase: MPO)の酵素反応産物である次亜塩素酸(HClO)を細胞外に放出して組織を荒廃させる。浸潤マクロファージは、MMPの作用により病巣内を移動し、荒廃した組織片を貪食する。このようにしてマクロファージが充満した病巣は硬度を失い、軟化(softening)もしくは液化(liquefaction)と呼ばれる状況を迎える^{7,8)}。発症後数週間以上が経過すると、マクロファージは次第に減少してゆくが、中枢神経系では線維芽細胞の増殖がほとんど起こらないので、病巣は線維性結合組織を形成することなく、空洞化(cavitation)へと向かう。

なお、ミクログリアは組織在住マクロファージ(tissue residential macrophage)に位置づけられており、浸潤マクロファージと同様、骨髓に由来することが明らかにされている¹⁴⁾。両者は共通の細胞マーカー、すなわちionized calcium-binding adapter

molecule 1 (Iba1), major histocompatibility class II antigen (MHC-IIAg), CD68, glucose transporter-5 (GLUT-5)などで同定される¹⁵⁾。したがって、血管透過性の亢進を背景として、ミクログリアと浸潤マクロファージが共存しうる場合、両者を識別することは困難である。ただし、Iba1とMHC-IIAgは恒常的に発現しているのに対し、CD68の発現は食食能が増強した泡沫状で円形の浸潤マクロファージで増強し、GLUT-5の発現は突起を有する組織在住のミクログリアで顕著な傾向がある。

2. ペナンブラ相当領域の病理形態

中枢神経系を構成する固有の細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドログリアおよびミクログリアである。これらのうち、ミクログリアは中胚葉成分であるのに対し、その他の細胞は神経外胚葉成分である。頭蓋内や脊柱管内にはさらに、血管構成細胞（内皮細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、外膜線維芽細胞など）、血管内循環血球（赤血球、好中球、単球、リンパ球など）、柔膜線維芽細胞、クモ膜下腔浮遊単核系細胞、クモ膜上皮細胞、クモ膜線維芽細胞、硬膜線維芽細胞といった中胚葉成分が、それぞれの区画に分布している¹⁶⁾。脳梗塞急性期の病態に深く関わるのは、ミクログリアとアストロサイトである。

アストロサイトの代表的マーカーは、glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthase (GS), glutamate transporter-1 (GLT-1), aquaporin 4 (AQP4)などである¹⁷⁾。GFAPはアストロサイトに特有の中間径フィラメントであるが、その発現レベルは健常脳であっても部位により一定ではない¹⁸⁾。生理的環境において、柔膜直下、白質および脳室・脊髄中心管の上衣下に分布する原線維性アストロサイト (fibrillary astrocyte) は、GFAPを多く含んでおり、核を中心として放射状に広がる分岐に乏しい星形の細胞突起を有する。これに対して、灰白質全体に分布する原形質性アストロサイト (protoplasmic astrocyte) は、GFAPをほとんど含んでいないため、裸核状に見える。下垂体後葉の pituicyte および小脳皮質の Bergmann glia もアストロサイトに含まれる。ところが、組織の環境が病的になると、病巣局所のアストロサイトは部位を問わずGFAPを強発現しながら大型化して、分裂と遊走を繰り返す。そして、細胞体から放射状に延びる突起を互いに接触させ合うことで支持機構の強化を図り、組織修復を遂行する。このような細胞を反応性アストロ

サイト (reactive astrocyte) と総称し、これが増加する現象を反応性アストロサイトーシス（いわゆるグリオシス）と呼ぶ。反応性アストロサイトは、脳梗塞の病期によって形態を変化させる¹⁸⁾。急性期には膨れ上がった細胞体と偏在する核をもつ肥大性アストロサイト (hypertrophic astrocyte) が出現し、亜急性期には細胞体がやや小さくなるとともに太い突起をネットワーク状に張り巡らす線維性アストロサイト (fibrous astrocyte) が出現する。グルタミン酸にアミノ基を付加してグルタミンを産生することにより中枢神経系のアミノ基転移反応やアンモニア代謝に与るGSは、アストロサイトに恒常的に発現する¹⁹⁾。細胞外グルタミン酸を細胞内に取り込むGLT-1の発現レベルは、アストロサイトが酸化ストレスに曝されると低下する²⁰⁾。水チャンネルの一種AQP4は、これを標的とした自己免疫疾患である視神経脊髄炎の病巣においてアストロサイトの細胞体ごと消滅する²¹⁾。

生理的（静止）状態のミクログリアは樹枝状ミクログリア (ramified microglia) と呼ばれ、長楕円形の核と細胞質に乏しい細胞体を有し、長軸方向に二分岐性の細い突起を伸ばし、神経突起やアストロサイトの突起がタイトに錯綜するニューロピルの中をかいくぐるように散在する¹⁴⁾。病的状態でのミクログリアは活性化ミクログリア (activated microglia) と呼ばれ、細胞体と突起を腫大させてアメーバ様の形状を呈し、活動性を獲得して分裂と遊走を繰り返す¹⁴⁾。

剖検脳を用いて、脳梗塞発症後数時間以上が経過した病巣を顕微鏡で観察すると、凝固壊死を呈するコアと健常な周囲組織との間に、細胞密度が上昇した帯状の領域（ペナンブラ相当領域）がみえてくる^{7,8)}。この領域では、大型化したIba1陽性細胞とGFAP陽性細胞が密集しており（Fig. 1）、これらの間に生存ニューロンが分布する。この時点では、血管透過性がまだ亢進しておらず、Iba1陽性細胞は太い突起を有することから、主に組織在住の活性化ミクログリアであると考えられる。一方、GFAP陽性細胞の大多数は、肥大性アストロサイトの特徴を備えている。これらの活動化したグリアは、様々な傷害レベルにある残存ニューロンとのクロストークを通じて、ニューロンの生死を分ける判断を下している。

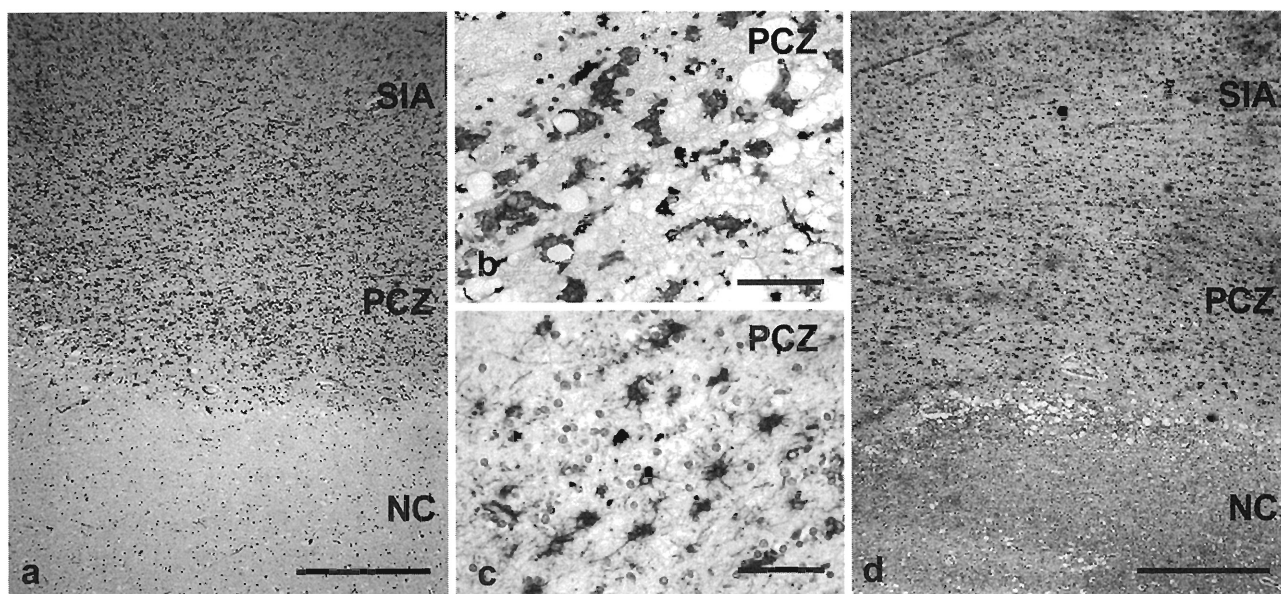


Fig. 1 Immunohistochemical observations of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), a microglial marker (a, b) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), an astrocytic marker (c, d) in the necrotic core (NC), penumbra-corresponding zone (PCZ), and surrounding intact area (SIA) of a fresh cerebral infarct obtained at autopsy from a patient who suffered acute-stage cerebral infarction. Polymer-immunocomplex method using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen and hematoxylin as the counterstain. Scale bar = 1.0 mm (a, d) and 100 μ m (b, c).

3. ペナンプラ相当領域における各種機能分子の動向

ペナンプラの病態において、様々な機能分子の関与が指摘されている。中でも、グルタミン酸の果たす役割はよく調べられてきた²²⁾。中枢神経系では、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスが随所に存在する。このシナプスが正常に機能するためには、細胞外グルタミン酸濃度を低く維持する必要がある。そこで、ニューロンやアストロサイトは細胞膜上にグルタミン酸トランスポーターを配置させ、細胞内外の Na^+ 濃度勾配に従って、 Na^+ とともに細胞外グルタミン酸を細胞内へ取り込む²³⁾システムを進化の過程で獲得したと考えられる。ところが、虚血状態では、 Na^+/K^+ -ATPaseによるイオンポンプの破綻により細胞内 Na^+ 濃度が上昇しているため、細胞内のグルタミン酸が Na^+ とともにトランスポーターを通して逆行性に細胞外へ放出されてしまう²³⁾。細胞外に増加したグルタミン酸は、多くのニューロン表面に局在する脱分極型グルタミン酸受容体の一種であるN-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)と結合することにより、共役する Ca^{2+} チャンネルを持続的に開放させるため、大量の Ca^{2+} が細胞外から細胞内へ流入することになる²⁴⁾。これと前述のATP欠乏

に端を発する細胞内への Ca^{2+} 流入とが相乗的に作用し、ミトコンドリアや小胞体の内部に貯蔵されている Ca^{2+} が雪崩を打って細胞質へ遊離してくる²⁵⁾。こうして、細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇に歯止めがかからなくなり、局所における酸化ストレスが亢進してゆく²⁶⁾。

高度の細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇は、 Ca^{2+} 依存性酵素であるキサンチン酸化酵素 (xanthine oxidase: XO), NADPH酸化酵素 (NADPH oxidase: NOX) およびニューロン型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase: nNOS) の分子構造を変化させ、活性化を促す^{27/28)}。XOとNOXはスーパーオキシドラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) を産生し、nNOSは一酸化窒素 (NO) を産生する。 $\cdot\text{O}_2^-$ とNOの間には強力な親和性があり、両者が遭遇すると直ちに非酵素的結合反応が起こってペルオキシニトリト (ONOO^-) を発生する²⁶⁾。 $\cdot\text{O}_2^-$ は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の最上流に位置する分子であり、その下流には酵素反応によって安全に処理される過程と非酵素的反応によって危険な分子種を発生させる過程が存在する。防御機構が十分に作動している生理的状況においては、 $\cdot\text{O}_2^-$ は水素イオン (H^+) の存在下でスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide

Table 1 Major substances of DAMPs

Nuclear components
• High mobility group box 1 (HMGB1)
• Fragments of DNA (including CpG)
Cytosolic components
• Heat shock protein 60 (HSP60)
• Heat shock protein 70 (HSP70)
• Peroxiredoxin
Extracellular components
• Fibrinogen
• Fibronectin
• Hyaluronan
• Heparan sulfate
• Oxidized low density lipoprotein (OxLDL)
DAMPs, damage-associated molecular patterns; CpG, cytosine-phosphodiester-guanine.

dismutase : SOD) の触媒作用で過酸化水素 (H_2O_2) と分子状酸素 (O_2) に不均化分解された後, カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) により H_2O まで処理される. 一方, 脳虚血を含む病的状況では, $\cdot\text{O}_2^-$ は遷移金属 (Fe/Cu) イオンの触媒作用により一電子還元反応を繰り返し, 中間段階で生じた H_2O_2 から速やかにヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) を発生させる²⁶⁾. $\cdot\text{OH}$ は ONOO^- と H^+ の非酵素的反応によっても生じる. $\cdot\text{OH}$ は ROS の中で最も強い酸化力をもつフリーラジカルであり, 細胞の主たる構成分子である核酸, 蛋白, 脂質, 糖質などに酸化的損傷を与え, 細胞活動に支障をきたす^{11)~13)}. ONOO^- は代表的な活性窒素種 (reactive nitrogen species : RNS) であり, 蛋白チロシン残基に結合してニトロチロシン構造体を形成することにより, チロシンキナーゼの作用を阻害して正常な細胞内シグナル伝達を妨げる他, ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達系に支障をきたして ATP 産生を抑制する²⁶⁾.

ペナンブラでは, 上述のメカニズムで発生する酸化ストレスの他, 致死的でない低酸素ストレスあるいは danger signal が, ニューロンとグリアに炎症反応を惹き起こす^{11)~13)}. Danger signal とは, 病原体に由来する pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) あるいは壊死細胞から遊離拡散してくる damage-associated molecular patterns (DAMPs) が, 自然免疫受容体 Toll-like receptors (TLRs) との結合を介して炎症反応を誘導する引き金となる現象を表す用語である²⁹⁾³⁰⁾. PAMPs の関与が濃厚な感染症とは異なり, 脳梗塞ではコア内の壊死細胞を供給源とする DAMPs によって danger signal が発生する^{11)~13)}. TLR ファミリーに属する蛋白として, 現在

Table 2 Proinflammatory gene products

Cytokines:
TNF α , IL-1 β , IL-6, FasL, IL-4
Growth factors:
VEGF, PDGF, EGF, GDNF, Osteopontin
Chemokines:
IL-8, MCP-1, MIP-1 α , Fractalkine, RANKL
Cell adhesion molecules (CAMs):
I-CAM-1, V-CAM-1, N-CAM-1
Inflammatory mediator-producing enzymes:
PLA ₂ , COX-2, 5-LOX, iNOS, PGES, XO, NOX, MPO
Extracellular matrix-digesting enzymes:
Matrix metalloproteinases, Elastase
Membrane-bound receptors:
VEGFR, PDGFR, EGFR, GDNFR, CD44, IGAV, Tissue factor

TNF α , tumor necrosis factor-alpha; IL, interleukin; VEGF, vascular endothelial growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; EGF, epidermal growth factor; GDNF, gliaderived growth factor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1-alpha; RANKL, receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand; I-, intercellular; V-, vascular; N-, neuronal; PLA₂, phospholipase A₂; COX-2, cyclooxygenase-2; 5-LOX, 5-lipoxygenase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; PGES, prostaglandin E synthase; XO, xanthine oxidase; NOX, NADPH oxidase; MPO, myeloperoxidase; VEGFR, VEGF receptor; PDGFR, PDGF receptor; EGFR, EGF receptor; GDNFR, GDNF receptor; IGAV, integrin subunit α V.

までに 10 種類以上のアイソフォームが同定されており³¹⁾, 脳梗塞では TLR2, TLR4 および TLR9 が病態に深く関わる^{11)~13)}. 代表的な DAMPs は, 核内成分としての high mobility group box 1 (HMGB1) や核酸断片 (CpG を含む), 細胞質成分としての heat shock protein 60 (HSP60), HSP70 および peroxiredoxin, 細胞外成分としての酸化低比重リポ蛋白 (oxidized low density lipoprotein : OxLDL), フィブリノーゲン, フィブロンectin およびムコ多糖, などである²⁹⁾³⁰⁾ (Table 1). 中枢神経系では, ニューロン, グリア, 血管内皮細胞などをはじめ, ほぼ全ての細胞が何らかの TLRs を発現している. 結局のところ, 低酸素ストレス, 酸化ストレスおよび danger signal は, nuclear factor-kappaB (NF- κ B) 経路, ストレス応答性 MAPK 経路, phosphoinositol 3-kinase (PI3K), Rho kinase (RhoK) 経路などの下流シグナルを強力に駆動して, 種々の炎症促進性遺伝子産物の発現を誘導することになる³¹⁾³²⁾.

ペナンブラでは虚血後早期では血液脳関門はまだ完全には破綻していないので, 炎症促進性遺伝子産物を発現する主な担い手は, ミクログリアとアスト

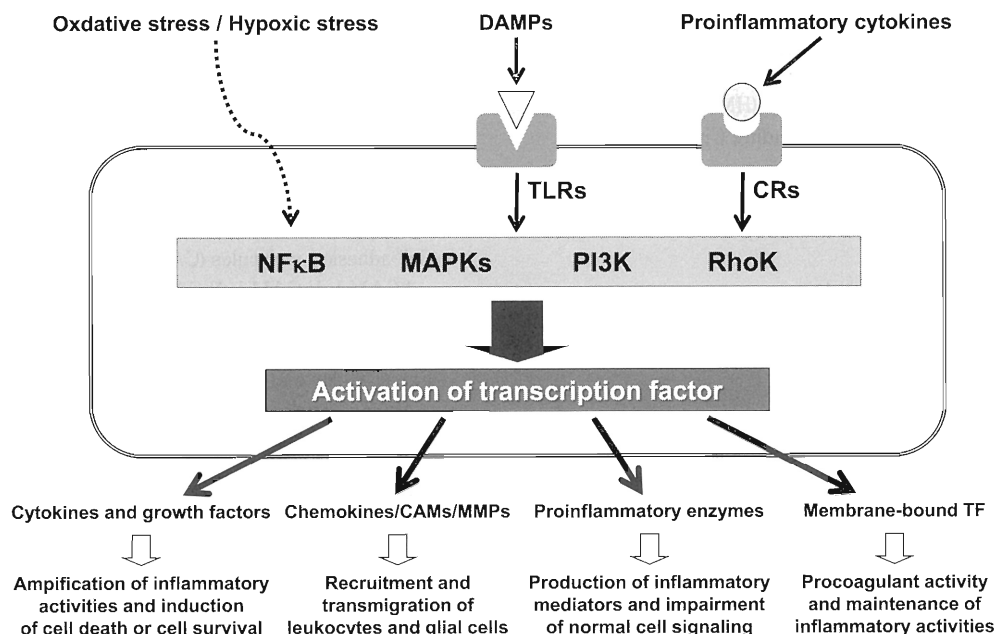


Fig. 2 Schematic of proinflammatory cell signaling in neurons and glia involved in the ischemic penumbra

DAMPs, damage-associated molecular patterns; TLRs, Toll-like receptors; CRs, cytokine receptors; NF- κ B, nuclear factor-kappaB; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; RhoK, Rho kinase; CAMs, cell adhesion molecules; MMP, matrix metalloproteinase; TF, tissue factor.

ロサイトである。ただしペナンプラでは経時的変化がみられ次第に血管内の単球が脳実質内に浸潤してくるので、その時には一部の血液脳関門の破綻が起きていると考えられる。炎症促進性遺伝子産物は、サイトカイン、増殖因子、ケモカイン、細胞接着分子、細胞外基質分解酵素、炎症性メディエーター産生酵素、膜結合型組織因子などに大別される^{11)~13)} (Table 2)。サイトカインは受容体を介して、ペナンプラ相当領域に存在する細胞群に対し、上述の酸化ストレス、低酸素ストレスおよび danger signal と同様、強力な炎症促進作用を発揮する^{11)~13)}。増殖因子は受容体を介して、細胞の生存や増殖を促す。サイトカイン刺激で活性化したグリアは、ケモカインを放出すると同時に CAM を細胞表面に発現し、近隣のグリアを呼び寄せる。このからくりは、前述した血管内皮細胞が循環白血球を病巣にリクルートするメカニズムと類似している。活性化したグリアはまた、細胞外基質分解酵素を分泌して組織内部を遊走するとともに、炎症性メディエーター産生酵素を発現する^{11)~13)}。代表的な炎症性メディエーター産生酵素は、シクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2: COX)、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase: 5-LOX) および誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible

nitric oxide synthase: iNOS) であり、それぞれ、プロスタグランジン類 (PGE₂)、ロイコトリエン類 (LTB₄) および RNS (\cdot NO, ONOO $^-$) を産生する。炎症性メディエーターは、炎症活動を増強するばかりでなく、ROS (\cdot O₂ $^-$, H₂O₂, HClO) と協働して組織を荒廃させる。膜結合型組織因子は、細胞外第 VII 凝固因子との結合により、外因系凝固カスケードを活性化するとともに、非受容体型チロシンキナーゼ cSrc を介して細胞内炎症シグナルを発生し、炎症活動の維持に与る (Fig. 2)。

サイトカインのうち、TNF α 、Fas ligand (FasL) および IL-1 β はニューロンに細胞死を誘導する¹²⁾。興味深いことに、TNF α に曝露されたミクログリアは、グルタミンを脱アミノ化してグルタミン酸に転換する酵素グルタミナーゼの誘導とグルタミン酸エキスポーターの細胞膜上への移動を介して、グルタミン酸を細胞外に放出するという実験的事実が報告されている³³⁾。また、酸化ストレスに曝露されたアストロサイトは、最大のグルタミン酸取り込み能を誇る GLT-1 の発現レベルを低下させる²⁰⁾。これらに、前述の虚血ニューロンにおけるトランスポーターを介したグルタミン酸の逆行性細胞外放出が重畳して、ペナンプラ相当領域のニューロンは高濃度の細

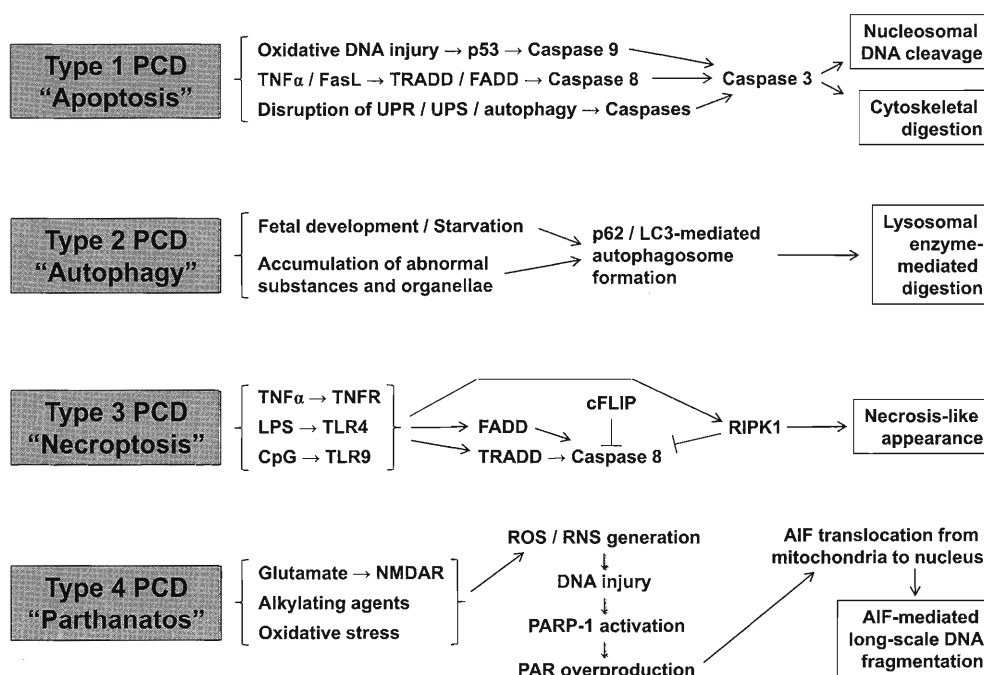


Fig. 3 Schematic of the major four types of programmed cell death

PCD, programmed cell death; TNF α , tumor necrosis factor- α ; TRADD, tumor necrosis factor receptor-associated death domain; FADD, Fas-associated death domain; UPR, unfolded protein response; UPS, ubiquitin-proteasome system; LPS, lipopolysaccharide; TLR, Toll-like receptor; CpG, cytosine-phosphodiester-guanosine; cFLIP, cellular FLICE inhibitory protein; RIPK1, receptor-interacting serine/threonine kinase 1; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; PAR, poly (ADP-ribose); PARP-1, PAR polymerase-1; AIF, apoptosis-inducing factor.

胞外グルタミン酸に曝されることになる。

4. ペナンブラ相当領域におけるニューロン死

細胞生物学の発展は、現代医学研究の基礎を形づくってきた。とくに、培養細胞を用いた実験系は、優れた病態モデルを提供しており、医科学研究者の多くはその恩恵に浴している。ここで我々が強調すべき点は、培養ニューロンがカスパーゼ経路を介する古典的アポトーシスによって死に至る観察結果をもって、動物やヒトの成体脳におけるニューロンもアポトーシスで死ぬと結論づけることへの懸念である。有史以来、成体脳(in vivo)においてニューロンにアポトーシス小体を見出し、明確な記録を残した研究者は誰一人いない。細胞生物学を全能の研究手法とばかりに信奉するのは危険なことである。

人体や動物の急性期脳梗塞巣辺縁部(ペナンブラ相当領域)から作製した組織切片に、アポトーシス経路が実行された証拠とされる切断型(活性型)カスパーゼ3に対する抗体を反応させると、確かにニューロンやグリアに免疫活性が検出される³⁴⁾。そればかりか、カスパーゼ3を活性化させる上流の三

大経路も作動している。すなわち、①DNAの酸化的損傷に始まる経路³⁵⁾(p53活性化→Bax活性上昇/Bcl-2活性低下→ミトコンドリア外膜の小孔開大→ミトコンドリア内外膜間に局在するチトクロームCの細胞質遊離→カスパーゼ9活性化→カスパーゼ3活性化)、②TNF α /FasLの曝露に始まる経路³⁶⁾(TRADD/FADD会合→カスパーゼ8活性化→カスパーゼ3活性化)、および③酸化ストレスを背景とした蛋白品質管理機構の破綻に始まる経路³⁷⁾(小胞体ストレス・プロテアソーム阻害・オートファジー不全→複数カスパーゼ活性化→カスパーゼ3活性化)の状況証拠が得られている。しかしながら、ペナンブラ相当領域のニューロンは、アポトーシス小体を形成することなく、むしろ壊死(ネクロシス)の初期段階を彷彿とさせる核濃縮と細胞体の縮小を経て細胞死に至る⁷⁸⁾。したがって、古典的アポトーシスが起こっていると言い難く、カスパーゼ3が活性化した段階でシグナル伝達が停止していると思えないのである。当該領域のニューロンは、症例毎に異なる状況に左右され、生き残ることも死に至

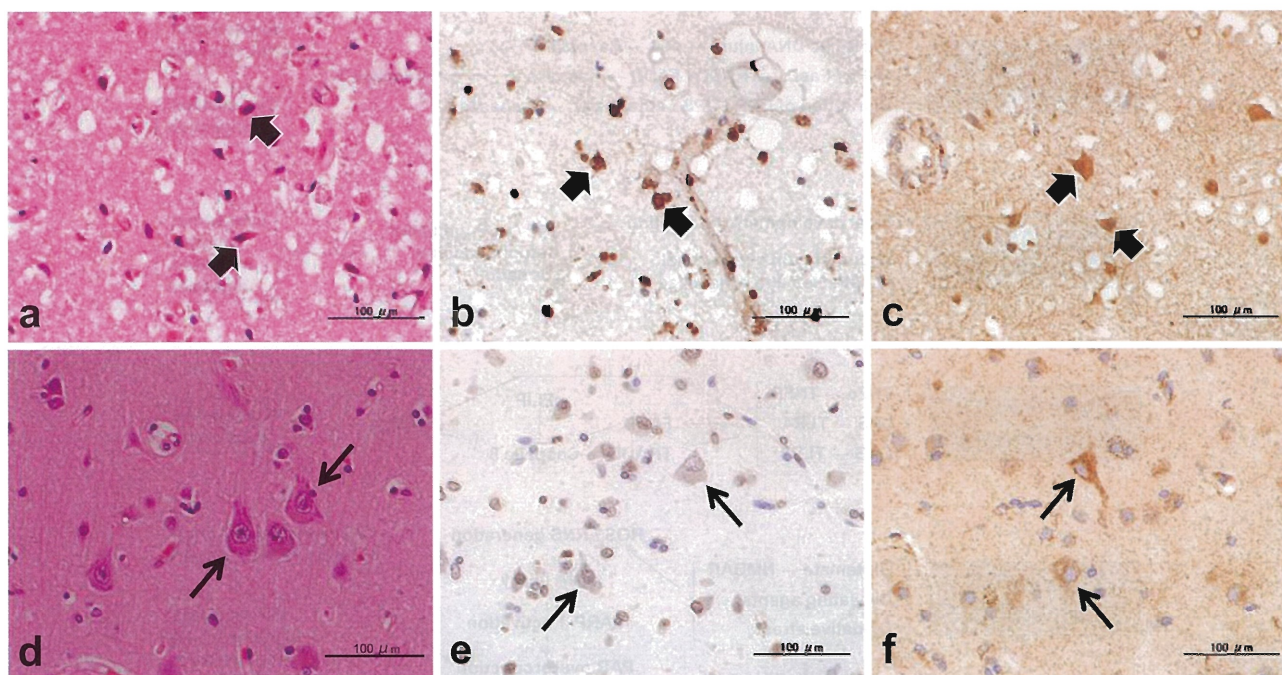


Fig. 4 Microphotographs of sections processed histologically (a, d) and immunohistochemically for poly (ADP-ribose) (PAR) (b, e) and apoptosis-inducing factor (AIF) (c, f) in the penumbra-corresponding zone (PCZ) (a-c), and the surrounding intact area (SIA) (d-f) of a fresh cerebral infarct obtained at autopsy from a patient who suffered acute-stage cerebral infarction. Large and small arrows indicate ischemic neurons in the PCZ and normal neurons in the SIA, respectively. Histologically, ischemic neurons in the PCZ comprise a pyknotic nucleus and eosinophilic cytoplasm, surrounded by spongiform neuropil indicative of hypoxia-induced swelling of astrocytic processes (a), in contrast to the normal neurons in the SIA (d). Immunohistochemically, ischemic neurons in the PCZ demonstrate intensive immunoreactivities for PAR and AIF in the nucleus and cytoplasm, with more intensive staining in the former substance (b, c). Intact neurons in the SIA display no significant PAR immunoreactivity throughout the entire soma (e), but significant dot-like AIF immunoreactivity restricted to the cytoplasm, suggestive of mitochondrial localization (f). Staining was achieved using hematoxylin and eosin (a, d) or the polymer-immunocomplex method using 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen and hematoxylin as the counterstain (b, c, e, f).

ることある。したがって、この細胞死は壊死ではなく、何らかのプログラム細胞死 (PCD) であろうと予想される。

PCD は現在、4 種類の型に大別されている。1 型はアポトーシス、2 型はオートファジー、3 型はネクロトーシス (necroptosis)、4 型はパートナトス (part-hanatos) と呼ばれる (Fig. 3)。これらのうち、アポトーシスはカスパーゼ依存性であるが、その他のプログラム細胞死はカスパーゼ非依存性である。オートファジーは、細胞質に存在する分子や細胞内小器官をリン脂質性の二重膜構造で包み込み、オートファゴソームを形成した後、融合させたライソソームから遊離してくる水解酵素群によりオートファゴソームの内容物を消化する現象である³⁸⁾。通常、発生

過程、飢餓状態あるいは細胞質に変性劣化した分子や細胞内小器官が蓄積する病態に際して起こり、消化した成分を再利用するなどして生き残りを図るためのシステムとして作動する。しかし、行き過ぎたオートファジーは、細胞全体を呑みこんで PCD に繋がるという。ネクロトーシスは、ネクローシスに酷似した形態学的変化を示すにもかかわらず、シグナル伝達阻害物質の一種 necrostatin-1 の処理により細胞死を回避できることから命名された PCD である³⁹⁾。通常、TNF α 、リポ多糖、CpG などの生理活性物質と対応する TNFR、TLR4、TLR9 などの受容体が結合して発生する筈のカスパーゼ 8 介在性アポトーシスシグナルが、cellular FLICE inhibitory protein (cFLIP) や receptor-interacting serine/

Table 3 New preclinical and clinical trials for ischemic stroke

Ion channel blocker	SUN-N8075, E-2051
NMDA receptor blocker	Magnesium
TLR4 inhibitor	TAK-242
T cell-based approach	$\gamma\delta$ T cell suppressor, T _{reg} cell expander
Apoptosis inhibitor	Cyclosporine, miR-499 activator, miR-24 activator
Autophagy activation	Chloramphenicol
HIF stabilizer	PHD inhibitor
Adenosine generator	Apyrase, Nucleotidase
Adenosine receptor agonist	Regadenoson, ATL146e, Bay 60-6583
Angiogenesis promotor	miR-92a
Membrane stabilizer	DP-b99
Free radical scavenger	Edaravone, NXY-059
Other neuroprotectives	ONO-2506, SUN-N4057, TS-011, ONO-2231, AX-200
Anti-apoptotic agent	PTD-FNK, FK506
Stem cell therapy	BMMC, MSC, CD34+ BMC, NSC, OEC, CD34+ PBC

SUN-N8075, T-type Ca^{2+} channel/ Na^{+} channel blocker and anti-oxidative agent; E-2051, L-type Ca^{2+} channel blocker and glutamate uptake blocker; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; TLR4, Toll-like receptor 4; HIF, hypoxia-inducible factor; PHD, prolyl hydroxylase domain; DP-b99, membrane $\text{Ca}^{2+}/\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ chelator; NXY-059, nitron derivative; ONO-2506, astrocytic S-100 β /NGF β downregulator and GABA_A receptor/glutamate transporter upregulator (Proglia); SUN-N4057, benzoxazepine derivative and 5-HT_{1A} receptor agonist; TS-011, arachidonate metabolite 20-HETE downregulator; AX-200, STAT3 activator and PARP-1 inhibitor (G-CSF); PTD-FNK, anti-apoptotic Bcl-xL derivative; FK506, calcineurin inhibitor (tacrolimus); BMMC, bone marrow mononuclear cells; MSC, mesenchymal stem cells; CD34+BMC, CD34-positive bone marrow cells; NSC, neural stem cells; OEC, olfactory ensheathing cells; CD34+PBC, CD34-positive peripheral blood cells.

threonine kinase 1 (RIPK1) といった下流シグナル干渉因子の作用で、ネクロトーシスのシグナルに転換されると説明されている。ちなみに上述の necrostatin-1 は、RIPK1 の酵素活性を阻害する物質である。パータナトスは、核内における poly(ADP-ribose) (PAR) の過剰産生に端を発する PCD である⁴⁰⁾。高濃度の細胞外グルタミン酸が NMDAR に結合して細胞質 Ca^{2+} 濃度が異常に上昇した場合、活性化した XO/NOX/nNOS によって産生される ROS および RNS が、DNA を広範囲に亘って損傷する。その結果、DNA 損傷に対する生体反応として DNA 修復酵素 PAR polymerase-1 (PARP-1) が過剰に活性化する。PARP-1 は細胞内の NAD^{+} を総動員して核内で大量に PAR を産生するため、細胞質に溢れ出す。この PAR は、本来ミトコンドリアの内膜外膜間腔で酸化還元反応の調節にあたる apoptosis-inducing factor (AIF) と結合した後、細胞質に遊離させ、さらに核内へ移行させる。核内に移行した AIF は、損傷した DNA をヌクレオソーム単位よりもはるかに長い距離で切断するため、アポトーシス小体を形成することなく、核濃縮を伴って細胞死に至る⁴¹⁾。AIF はアポトーシスを誘導する訳ではない

ので、 $\text{TNF}\alpha$ が壊死を誘導しないのと同様に、ミスネイミング (誤命名) といえる。

最近の研究では、ペナンプラ相当領域のニューロン死において、アポトーシスは論外としても、その他の PCD の関わりを支持する証拠が蓄積されつつある。まず、オートファジーの遂行に必須の蛋白をコードする遺伝子 *Atg7* を神経組織選択的にノックアウトしたマウスでは、ペナンプラ相当領域のニューロンに細胞死が起こりにくくなるという³⁸⁾。この実験結果は、オートファジーの関与を示唆している。次に、酸化コレステロールの一種 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) を培養ニューロンに添加すると、necrostatin-1 で阻害される細胞死が起こるという報告がある⁴²⁾。ペナンプラ相当領域では、酸化ストレスの亢進を背景に脂質過酸化が進んでおり²⁷⁾²⁸⁾、その一環としてニューロンの形質膜を構成するコレステロールが酸化されうる。したがって、ネクロトーシスの関与も考慮すべきであろう。さらに、我々が抗 PAR 抗体を用いて、急性期脳梗塞巣を免疫組織化学染色したところ、ペナンプラ相当領域のニューロンの細胞核と細胞質に高度の免疫活性が集積している観察結果が得られた (Fig. 4)。これは、

パータナトスの関与を支持する状況証拠であり、その原因を前述したニューロンやグリアが担う細胞内外グルタミン酸濃度調節機構の不具合にもとづく細胞外グルタミン酸濃度の異常な上昇に求めることができる。

おわりに

これまで述べてきたように、急性期脳梗塞巣辺縁部を構成するペナンプラ相当領域では、低酸素ストレス、酸化ストレス、danger signal、炎症反応、グルタミン酸毒性などの諸因子が、複合的な病態を繰り広げている。その主な担い手であるグリアは、ニューロンに対する攻撃性を先鋭化している。現在、国内外で治験が展開されている脳梗塞急性期新規治療薬の多くは、本稿で言及した事象を標的としたもの⁴³⁾⁴⁴⁾であるが、再生医療の流れの中で神経幹細胞や間葉系幹細胞を移植注入する試みも始まっている⁴⁵⁾(Table 3)。ペナンプラ相当領域で起こっている機能分子の動向に注目し、グリアの異常な活動を制御することは、たとえコアが形成されたとしても、病巣拡大の阻止を通じて患者の機能的予後を改善し、ひいては患者の生活の質(quality of life: QOL)の向上に繋がると期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、技術的な支援をいただいた刈田瑞穂、竹入英幸、坂寄紀子、村松文章および岩崎秀一の各氏に深謝申し上げます。

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Pham T-M, Fujino Y, Kubo T et al: Premature mortality due to stroke and trend in stroke mortality in Japan (1980–2005). *Eur J Public Health* **21**: 609–612, 2011
- 2) Urra X, Chamorro Á: Emerging issues in acute ischemic stroke. *J Neurol* **260**: 1687–1692, 2013
- 3) Shiemanck SK, Post MW, Witkamp TD et al: Relationship between ischemic lesion volume and functional status in the 2nd week after middle cerebral artery stroke. *Neurorehabil Neural Repair* **19**: 133–138, 2005
- 4) Shiemanck SK, Post MW, Kwakkel G et al: Ischemic lesion volume correlates with long-term functional outcome and quality of life of middle cerebral artery stroke survivors. *Restor Neurol Neurosci* **23**: 257–263, 2005
- 5) Heiss W-D: The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann NY Acad Sci* **1268**: 26–34, 2012
- 6) Paciaroni M, Caso V, Agnelli G: The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol* **61**: 321–330, 2009
- 7) グレイ F, デ・ジロラーミ U, ポワリエ J: 動脈由来の血管病変: 脳梗塞. 「エスクロール 基本神経病理学」, (村山繁雄監訳), pp88–101, 東京出版編集部, 東京 (2009)
- 8) Auer RN, Sutherland GR: Cerebral ischaemia. In *Greenfield's Neuropathology*, Vol. 1, (7th ed). (Graham DI, Lantos PL eds), pp321, Arnold, London (2002)
- 9) Schabits WR, Fisher M: Diffusion weighted imaging for acute cerebral infarction. *Neurol Res* **17**: 270–274, 1995
- 10) Mitchell RN: Mechanisms of cell injury. In *Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, (8th ed). (Kumar R, Abbas A, DeLancy A et al eds), pp17–25, Saunders & Elsevier, Philadelphia (2010)
- 11) Amantea D, Nappi G, Bernardi G et al: Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role for inflammatory mediators. *FEBS Lett* **276**: 13–26, 2009
- 12) Castillo J, Leira R: Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* **11** (Suppl 1): 40–48, 2001
- 13) Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M et al: Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* **3**: [Epub PMID: 22833743] doi: 10.3389/fimmu.2012.00132, 2012
- 14) Prinz M, Mildner A: Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* **59**: 177–187, 2011
- 15) Guillemin GJ, Brew BJ: Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* **75**: 388–397, 2004
- 16) Fuller GN, Burger PC: Central Nervous System. In *Histology for Pathologist*, (3rd ed). (Mills SE ed), pp273–319, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2007)
- 17) Kimelberg HK: The problem of astrocyte identify. *Neurochem Int* **45**: 191–202, 2004
- 18) Eng LF, Ghirnikar RS: GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* **4**: 229–237, 1994
- 19) Cooper AJL: The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in cerebral ammonia homeostasis. *Neurochem Res* **37**: 2439–2455, 2012
- 20) Miralles VJ, Martínez-López I, Zaragoza R et al: Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res* **922**: 21–29, 2001
- 21) Barnett MH, Sutton I: Neuromyelitis optica: not a multiple sclerosis variant. *Curr Opin Neurol* **25**: 215–220, 2012
- 22) Kostandy BB: The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci* **33**: 223–237, 2012
- 23) Grewer C, Gameiro A, Zhang Z et al: Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* **60**: 609–619, 2008

- 24) **Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D et al:** Neuron protection as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Curr Top Med Chem* **9**: 1317–1334, 2009
- 25) **Hayashi T, Abe K:** Ischemic neuronal cell death and organellae damage. *Neurol Res* **26**: 827–834, 2004
- 26) **Halliwell B, Gutteridge JMC:** *Free Radicals in Biology and Medicine*, (3rd ed). Oxford, New York (1998)
- 27) **Allen CL, Bayraktutan U:** Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* **4**: 461–470, 2009
- 28) **Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R et al:** Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013 [Epub PMID 23469845]
- 29) **Newton K, Dixit VM:** Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Epub PMID: 22296764] doi: 10.1101/cshperspect.a006049, 2012
- 30) **Škoberne M, Beignon A-S, Bhardwa N:** Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med* **10**: 251–257, 2004
- 31) **Kawai T, Akira S:** TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**: 816–825, 2006
- 32) **Shin HK, Salomone S, Ayata C:** Targeting cerebrovascular Rho-kinase in stroke. *Expert Opin Ther Targets* **12**: 1547–1564, 2008
- 33) **Takeuchi H, Jin S, Wang J et al:** Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* **281**: 21362–21368, 2006
- 34) **Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG:** Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**: e331–e339 [Epub PMID: 19182083] doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531632, 2009
- 35) **Moll UM, Zaika A:** Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett* **493**: 65–69, 2001
- 36) **Rossi D, Gaidano G:** Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* **88**: 212–218, 2003
- 37) **Benbrook DM, Long A:** Integration of autophagy, proteasomal degradation, and unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol* **34**: 286–297, 2012
- 38) **Uchiyama Y, Shibata M, Koike M et al:** Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol* **129**: 407–420, 2008
- 39) **Vandenabeele P, Galluzzi L, Berghe TV et al:** Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 700–714, 2010
- 40) **Wang Y, Dawson VL, Dawson TM:** Poly (ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* **218**: 193–202, 2009
- 41) **Wang Y, Kim NS, Haince J-F et al:** Poly (ADP-ribose) (PAR) binding to aspartate-inducing factor is critical for PAR polymerase- δ -dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal* **4**: [Epub PMID: 21467298] doi: 10.1126/scisignal.2000902, 2011
- 42) **Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T et al:** 24(S)-Hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J Biol Chem* **286**: 24666–24673, 2011
- 43) **桂研一郎, 片山泰朗:** 2. 虚血性神経細胞死の分子機構と脳保護療法—新規脳保護薬への期待—. *脳循環代謝* **18**: 73–77, 2006
- 44) **Eltzschig H, Eckle T:** Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* **17**: 1391–1401, 2011
- 45) **Sahota P, Savitz SI:** Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics* **8**: 434–451, 2011