

虚血性神経細胞アポトーシスにいたる細胞内カスケード

奈良県立医科大学脳神経外科学教室

奥野修三, 榎 壽右

APOPTOTIC CASCADE OF ISCHEMIC NEURONS

SHUZO OKUNO and TOSHISUKE SAKAKI

Department of Neurosurgery, Nara Medical University

Received October 29, 2004

はじめに

脳虚血下にある神経細胞では、十分な好気性解糖が保てなくなり、ATP産生が低下してくる。この結果、細胞はポンプ機能不全に陥り、膜電位を維持できなくなって、細胞膜は脱分極を引き起こす。これに続いて、シナプス終末より多量に分泌されたグルタミン酸に代表される興奮性アミノ酸が、シナプス後膜からのカルシウムの細胞内流入を促進する。この過剰に増加した細胞内カルシウムは、通常のカルシウム濃度では活性化されないプロテアーゼ、フォスホリパーゼ、キナーゼといった酵素群を活性化し、細胞膜や細胞骨格を破壊していく、いわゆる、ネクローシスを引き起こす¹⁾。このグルタミン酸-カルシウム仮説に基づいて、細胞膜に存在するグルタミン酸受容体をブロックして虚血性神経細胞死を抑制しようとする試みが行われてきた²⁾。そして、動物実験で有効であったグルタミン酸受容体阻害薬(MK 801など)の一部は、ヒトでの臨床試験において検討されるに至ったが、ついに、その有効性が確認されなかった³⁾。近年、神経細胞死に関する生化学的シグナル伝達の研究が進むなかで、多くの関心はネクローシスからアポトーシスに移行してきた。これは、言うまでもなく、アポトーシスの過程がネクローシスに比べて、より緩徐に進行する特徴を持つからで、この種の神経細胞死を救済する余地があるのではないかと期待が寄せられている⁴⁾。そして、虚血性神経細胞死においてもアポトーシスの側面があることが知られるに至り、その分子生物学的カスケードの解明は、大きく進歩した。

そもそも、アポトーシスは、その特徴的な形態学的変化をもって診断されるものであり、核クロマチンの凝集、細胞質の縮小化が観察され、細胞膜の構造は比較的保持

されている。さらに、アポトーシスが進行すると細胞質や核に切れ込みが入り、細胞は、アポトーシス小体と呼ばれる小片に分断され、マクロファージにより貪食されることになる。脳虚血時には、時間的・空間的に多様な神経細胞死の形態が認められるが、一般に、虚血性アポトーシスは前脳虚血の海馬領域や局所脳虚血の虚血周辺部といった、脳虚血が一過性で比較的軽度な脳組織に生じる⁵⁾。前述のごとく、アポトーシスの診断が電子顕微鏡下の形態変化によりもたらされるとの見地からは、虚血性神経細胞死の形態は、アポトーシスでないとする報告もある⁶⁾。一方、典型的なアポトーシスの形態をとるプログラム細胞死(programmed cell death)で活性化される分子生物学的カスケードの実行が、虚血性神経細胞においても観察されている。すなわち、虚血後ミトコンドリアから放出されるcytochrome cによりcaspasesの活性化されたり、caspase-3が基質であるpoly(ADP-ribose)polymerase (PARP)を分解活性化したり、caspase-activated DNase (CAD)の核内移行を促進することが明らかとなった^{6,7)}。さらに、アポトーシス抑制因子であるBcl-2の発現増加が神経保護作用を発揮することも明白な事実となっている⁸⁾。このように、アポトーシスの概念と一連の細胞死に関わる生化学的シグナルカスケードとは、常に一致するものではないが、脳虚血治療を考える上での要点は、脳虚血において神経細胞死のメカニズムが、どのように関与しているのかを究明し、救済可能な細胞に対する治療法の開発を推進することである。こうした観点から、本稿では、主にin vivo虚血性神経細胞アポトーシスに注目し、ここ数年で解明された主要な細胞内シグナルカスケードについて概説する。

ミトコンドリア経路 (Fig. 1)

この経路は、ミトコンドリアの電子伝達系の構成成分である cytochrome c が細胞質に放出されることから開始され、アポトーシスカスケードのなかで最も研究が進んでいる分野である。Cytochrome c の放出は、Bcl-2 ファミリータンパクのうちアポトーシス促進因子と抑制因子が複雑に関連し合って調節されるので、それら代表的な因子を取り上げてミトコンドリア経路を概説する。まず、促進因子としては BH1~BH3 ドメインを共有する Bax や Bak、そして BH3 ドメインのみを共有する、いわゆる BH3-only タンパク群 (Bid, bad, Bim, Bik など) が、その代表である。一方、抑制因子としては、Bcl-2、Bcl-xL、そして近年発見された Bcl-w などがあげられる。詳述は避けるが、個々の因子は、それぞれに局在が異なっており、また、ストレス負荷時にその局在を変えるものもある。さらに、各因子は、ストレスの種類に応じて、異なった動態を見せることもよく知られている。これらの因子は、単独で機能することもあるが、多くの場合は、ヘテロダイマーを形成して、互いの活性を調節し合っている。そして、アポトーシス促進因子と抑制因子のバランスが崩れると cytochrome c の放出が始まる。そもそも

cytochrome c は、ミトコンドリア内外膜間腔に存在しており、ストレス負荷時に生じる外膜の pore を通じて細胞質に放出される。この外膜に生じる pore の形成機序については諸説があり、現在も重要な研究課題となっている (9)。最初に提唱された機序は、ミトコンドリア外膜の VDAC (voltage-dependent anion channel) と内膜に存在する ANT (adenine nucleotide translocator) からなる permeability transition pore (PTP) が開口して (Fig. 6)、ミトコンドリア膜電位が消失した結果、マトリクスが腫脹するというもので、ミトコンドリア外膜が物理的に破壊されて cytochrome c の遊離が起こるという説である。また、この外膜に形成された PTP それ自体が、cytochrome c の通路になるというモデルも想定されている。現在のところ、Bcl-2 ファミリータンパクによる PTP 開口制御についての詳細なメカニズムは不明である。近年、Bax などのアポトーシス促進因子が構造変化を来した結果¹⁰、ミトコンドリア外膜に移行して 4 量体を形成し、その中心部を cytochrome c が通過するモデルが報告された。そして、この Bax による cytochrome c 遊離のメカニズムは、PTP とも関連しているようで、まず PTP を通じてミトコンドリア内に流入した proton による脱

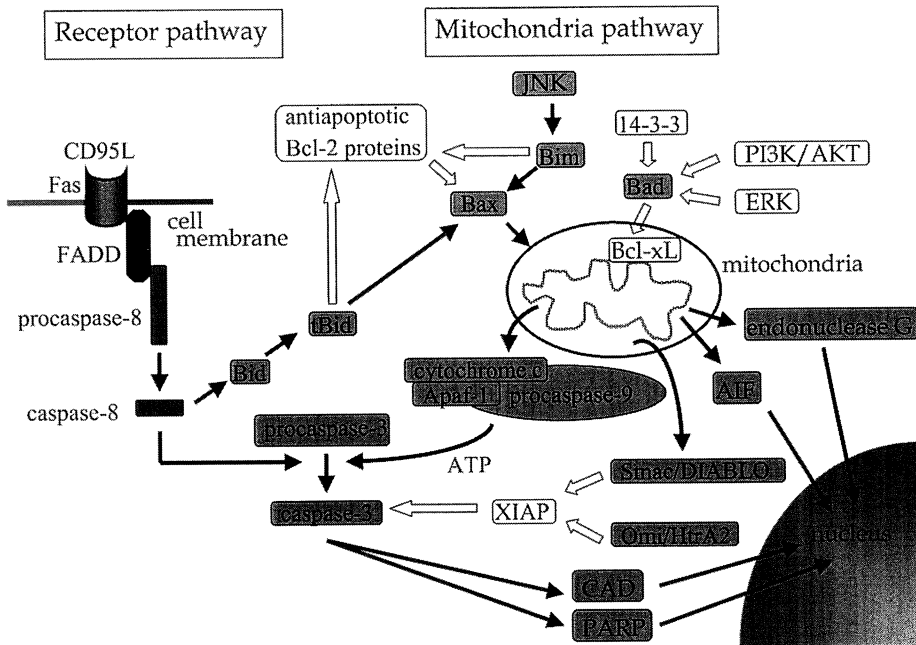


Fig. 1. Schematic diagram represents a possible cascade of neuronal apoptosis induced by ischemic events.

分極のシグナルが, Bax の構造変化をもたらすと意見もある¹¹⁾. 我々の, ラット一過性局所脳虚血モデルを用いた実験からも (Fig. 2A), Bax が細胞質からミトコンドリアへ移行することが示されており, Bax や Bak のミトコンドリアへの移行が, cytochrome c の遊離に不可欠なステップであることは間違いないようである⁹⁾.

BH3-only タンパクは, 少なくとも 10 種類の異なった因子から構成される. なかでも, Bid, Bad, Bim については, 虚血性神経細胞アポトーシスに関わる重要な知見が得られつつある¹²⁾. これら BH3-only タンパクにはほぼ共通した生物学的特徴とは, アポトーシスの実行において Bax や Bak の存在が不可欠なこと, および各因子間に機能的な重複が認められることである. こうしたことから, BH3-only タンパクは, 主に細胞内のアポトーシスシグナルの強度を感知して, 全体として統合し, ミトコンドリア経路に伝達するセンサーのような役割を果たしているものと思われる¹²⁾. なお, Bid は次章の受容体経路との関連が深いため, ここでは Bad と Bim について, 現時点までの知見と我々の実験結果を踏まえて概説する.

まず, Bad は, 定常時に分子シャペロンである 14-3-3 と複合体を形成した状態にあり, 4 つのセリン基がリン酸化されることで不活化されている. アポトーシス刺激により, Bad は 14-3-3 から解離して脱リン酸化されることで活性を得ることが判明した⁹⁾. 活性型 Bad は, その後ミトコンドリアへ移動して Bcl-xL と 2 量体を形成し, そのアポトーシス抑制作用を阻害するものと考えられている. Bad は上流のキナーゼによっても, その活性の制御を受けている. よく知られているのは, ERK と AKT (protein kinase A) である. いずれのキナーゼも Bad をリン酸化することで, その活性を抑えるものと思われる. 我々は, マウスの一過性局所脳虚血モデルにおいて, これら *in vitro* の実験結果と同様に, 虚血後の Bad が 14-3-3 から解離して Bcl-xL に結合すること, および AKT 阻害剤の投与により, このメカニズムが抑制されて, アポトーシスが減少することを解明した¹³⁾.

Bim は, バクテリオファージλ の cDNA expression をスクリーニングすることで, Bcl-2 に結合するタンパクとして発見された. 現在, Bim の isoform として BimEL, BimL, BimS, BimAD などが同定されているが, ここでは神経細胞と関連の深い BimEL および BimL について概説する. 両タンパクは神経細胞において transcriptional と post-translational の機序による発現制御が行われている (14). *In vitro* の実験結果からは, 通常, BimEL と BimL は, 細胞骨格である dynein motor complex

と結合することで不活化されている. 何らかのアポトーシス刺激の結果, Bim タンパクが細胞質中に遊離されて, アポトーシス関連カスケードを賦活化すると考えられる¹⁵⁾. 現時点までの実験的知見から, Bim によるアポトーシス促進機構には, 以下にあげる 4 つのメカニズムが提唱されている^{15, 16)}.

- 1) Bim が直接ミトコンドリア外膜に作用して cytochrome c を放出させる.
- 2) Bcl-2 や Bcl-xL などのアポトーシス抑制因子と 2 量体を形成して, それらの生物学的活性を抑制する.
- 3) Bax や Bak と結合して, それらに構造変化をもたらすことで, ミトコンドリアへの移行を促進する.
- 4) ミトコンドリアの PTP を構成する VDAC に直接結合することで, ミトコンドリアの膜電位を消失させる.

我々の動物実験の結果を合わせて, 現在のところ 3) が最も有力なモデルと考えられる. すなわち, ラットの過性脳虚血後, BimL-Bax 間の結合に呼応して Bax のミトコンドリアへの移動が観察された (Fig. 2). これは, Bax が BimL との結合に際して, 何らかの生物学的活性の修飾を受けた可能性を示唆している⁹⁾.

一旦, 細胞質に放出された cytochrome c は, pro-caspase-9 や Apaf-1 と, ATP の存在下に複合体 (apoptosome) を形成し, 活性型の caspase-9 が生成されることになる. この caspase-9 は, 続いて pro-caspase-3 と反応して caspase-3 を活性化するのである. なお, caspase-9 活性は, phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-AKT 系や ERK によるリン酸化によって失活すると考えられる. 以下, 前述したように caspase-3 は, 基質である PARP や CAD を活性化し, 核での DNA の fragmentation を実行することになる. このように, 一連の生化学反応には, 十分な ATP が必要であるため, 著しい虚血時には cytochrome c が放出されても ATP の供給が不十分となり神経細胞はネクローシスに陥る. 神経細胞には caspase-3 を鎮静化する機構も備わっており, XIAP などは直接 caspase-3 活性に拮抗する. 重要なことは, caspase 活性の阻害により虚血性神経細胞死が抑制されるかどうかという点であるが, 最近, caspase-3 inhibitor である z-DEVD-FMK の脳室内投与により, 一過性局所脳虚血モデルでの神経保護効果が確認されている¹⁷⁾. しかしながら, その効果は十分とは言えず, また *in vivo* 脳虚血モデルにおいて caspase 活性を認めないとする報告もあるため, 神経細胞アポトーシス制御の新たなカスケードの解明が待たれる.

アポトーシスの重要な形態変化に DNA の断片化があるが, caspase 活性に引き続く CAD の核への移行により

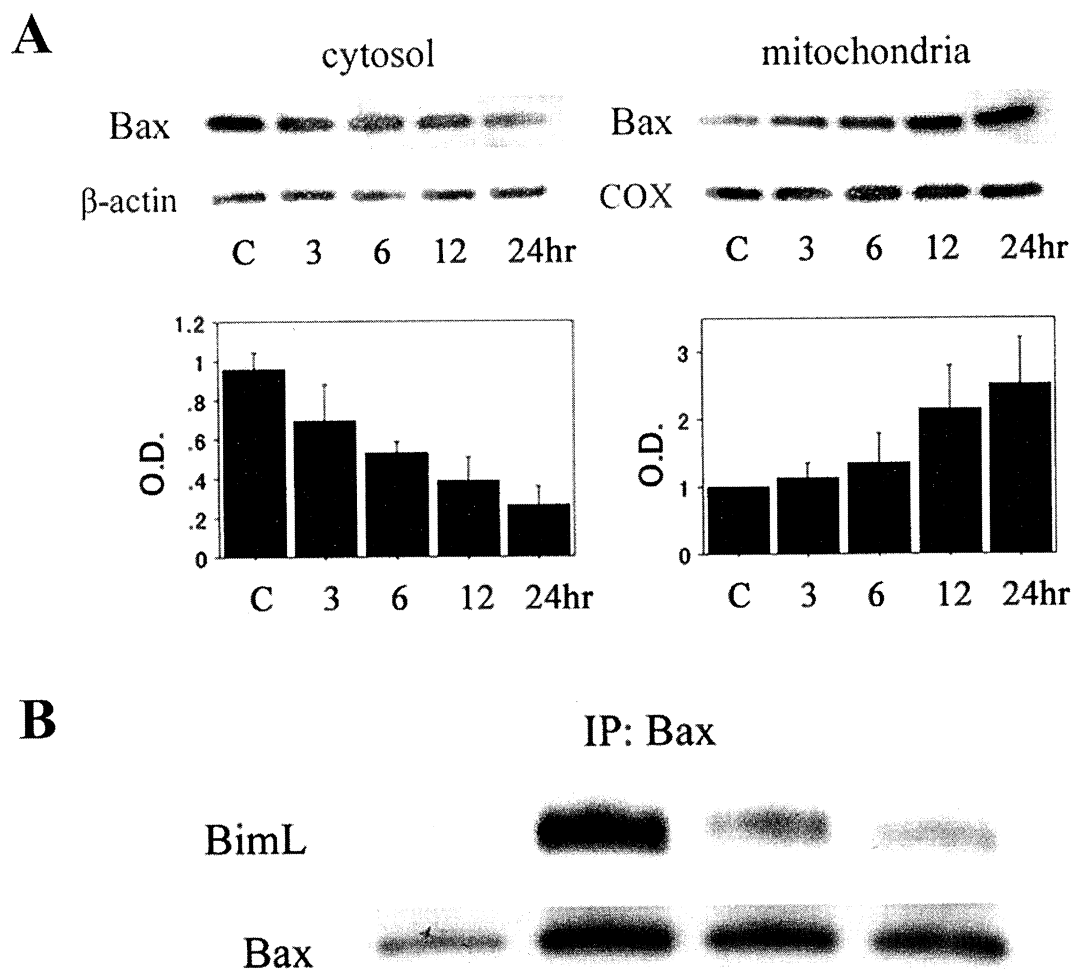


Fig. 2. A: Bax was predominantly expressed in the cytosol of the nonischemic control brains (lane C). After the onset of ischemia/reperfusion, Bax was successively translocated to the mitochondria during the experiment on Western blot analysis (upper). Quantitative analysis ($n = 4$) clearly showed a reciprocal expression of Bax between the cytosolic and mitochondrial fractions 24 hr after reperfusion (lower). COX, Cytochrome oxidase.

B: Six hours after transient focal cerebral ischemia (tFCI), BimL expression in the whole cell fraction immunoprecipitated by an antibody for Bax proteins significantly increased in the vehicle-treated animals (lane 6hr) compared with the nonischemic control brains (lane C), and was significantly inhibited by SP600125 treatment (lane SP). IP, Immunoprecipitation.

180~200 の塩基ペアー毎による DNA の切断 (DNA laddering) が起こる。しかしながら、虚血神経細胞に共通の組織変化である核の濃縮やクロマチンの凝集は、CAD のみでは生じないという意見もある⁹⁾。こうした事実から、CAD 以外の caspase 基質の存在や cytochrome c-caspase 系に依存しないミトコンドリア経路の存在が、模索されている。特に後者の caspase 非依存性経路を制

御する有力なタンパクとして AIF (apoptosis-inducing factor, 57 kDa) と endonuclease G (30 kDa) が、近年注目されている⁹⁾。両タンパクともに cytochrome c 同様に、ミトコンドリア膜間腔に存在し、アポトーシス刺激により核に移動すると考えられる。In vitro の結果から、AIF には核を凝集する機能が証明されており、50 kbp の比較的高分子からなる DNA fragmentation への関与が指摘

されている。また、PARPがAIFのミトコンドリアからの遊離を制御している可能性がある¹⁹⁾。最近、*in vivo* 脳虚血モデルにおいてもAIFが、caspase非依存性にミトコンドリアから核に移行することや、このようなAIFの細胞内移動が、アポトーシス抑制性Bcl-2ファミリータンパクによって阻害されることが、報告された¹⁹⁾。ただし、AIF自体にendonuclease活性はなく、さらにミトコンドリア内ではフリーラジカル消去剤として機能しているなどの問題点もあり、AIFによる神経細胞アポトーシス制御機構への関与の解明には、さらなる研究が必要と思われる²⁰⁾。

Endonuclease Gは、AIFと同様にcaspase非依存性に活性化されると考えられるが、主に次章で述べる受容体経路による活性制御を受けているらしい(次章参照)。そもそも、アポトーシスにおけるDNAの変性においては、まずAIFなどで観察される約50 kbpという比較的高分子毎での切断が起こり、それに引き続いてnucleosome毎での切断が生じる。endonuclease Gは後者の、いわゆるDNA ladderingに関与していると考えられる。現時点でendonuclease Gと虚血性神経細胞死の関連についての報告はないが、endonuclease Gが、AIFとの相互作用によりDNA変性を遂行するのではないかという意見や、フリーラジカルなどによるcaspase活性を伴わないアポトーシスに関与しているのではないかという意見もあり、今後の研究の発展が期待される^{9, 18, 20)}。

その他、Smac/DIABLOやOmi/HtrA2などもアポトーシスに際して、ミトコンドリアから遊離してXIAPの作用を阻害することで、間接的にcaspase-3の活性化に関与すると考えられている。我々の実験結果からも、Smac/DIABLOやOmi/HtrA2が*in vivo* 虚血性神経細胞アポトーシスに関与していることが確認された^{6, 21)}。

TNF受容体経路 (Fig. 1)

細胞表面にあるいくつかの受容体は、サイトカインと反応してアポトーシスを誘導することが知られている。虚血後の神経細胞でも、ある種の受容体による細胞内アポトーシスカスケードが開始されるが、その時の代表的な受容体が、TNF受容体スーパーファミリーに属するFas (CD95)である。事実、Fasの内因性リガンドであるCD95Lは一過性前脳虚血や局所脳虚血モデルにおいて増加しており、逆にFas受容体をブロックすることにより、アポトーシスやネクロシスの抑制が観察されている²²⁾。ただし、虚血性神経細胞アポトーシスでのFas受容体経路の報告は限られているため、これら断片的な知見に*in vitro*の実験結果を合わせて本経路を要約する。

まずCD95LなどのリガンドがFasに結合すると、Fasは集合して3量体を形成する。ここに、細胞内からFADD (Fas-associated protein with death domain)を介してprocaspase-8が結合する。

このようにしてできた複合体は、death-inducing signaling complex (DISC)と呼ばれており、caspase-8の活性化を促すことになる²³⁾。この活性型caspase-8の下流のカスケードには2つの経路が想定されている。ひとつは、caspase-8によりcaspase-3が切断される経路であり、もうひとつは、caspase-8が、BH-3 onlyタンパクのBidと反応して、これを活性化する経路である。前者はミトコンドリア経路と重複するため、後者について述べることにする。Bidは22 kDaの細胞質タンパクであり、caspase-8により15 kDaの活性型tBid (truncated Bid)に分断される。tBidは、その後、ミトコンドリアに移動するが、アポトーシス抑制因子であるBcl-2と結合して、その機能を阻害したり、BaxやBakの構造変化を来たすことが報告されている²³⁾。以下、cytochrome cの遊離を来たすミトコンドリア経路に合流することになる。また、tBidの生成にはSer/Thr phosphatase (PP2A)などによる脱リン酸化作用が、促進性に働くことが知られているし、caspase-8以外のcaspaseによる制御も報告されている^{12, 23)}。

MAPK (Fig. 3)

MAPK (mitogen-activated protein kinase)は、本来、外的ストレスに対する細胞表面受容体からの刺激を伝達する細胞内カスケードの構成因子として認識された。現在、ERK, p38, およびJNKの3つがMAPKに属すると考えられる。増殖因子やサイトカインの刺激によるシグナル伝達では、MAPKの上流の規定因子としてMAPKK (MAPK kinase)やMAPKKK (MAPKK kinase)などの存在が知られているが、神経細胞虚血におけるMAPKの規定因子は、現在のところ明らかでない^{24, 25)}。これまで、MAPKの各因子には虚血性神経細胞死について相反する実験結果が報告されており、その分子生物学的機能は、十分に解明されていなかった²⁶⁾。近年、MAPK各因子に対するknock out animalの導入や特異性の高い阻害剤が開発されるに至り、脳虚血におけるMAPKの役割が、明らかになりつつある。ERKは、当初、虚血後に活性化(リン酸化)し、主に神経保護作用を有すると考えられてきたが、近年では、神経細胞障害にも関与するとの報告がある²⁷⁾。しかしながら、ERKに対する選択的な阻害剤は、いまだ未開発であり、その生理機能についても不明な部分が多い²⁴⁾。p38は、次に述べ

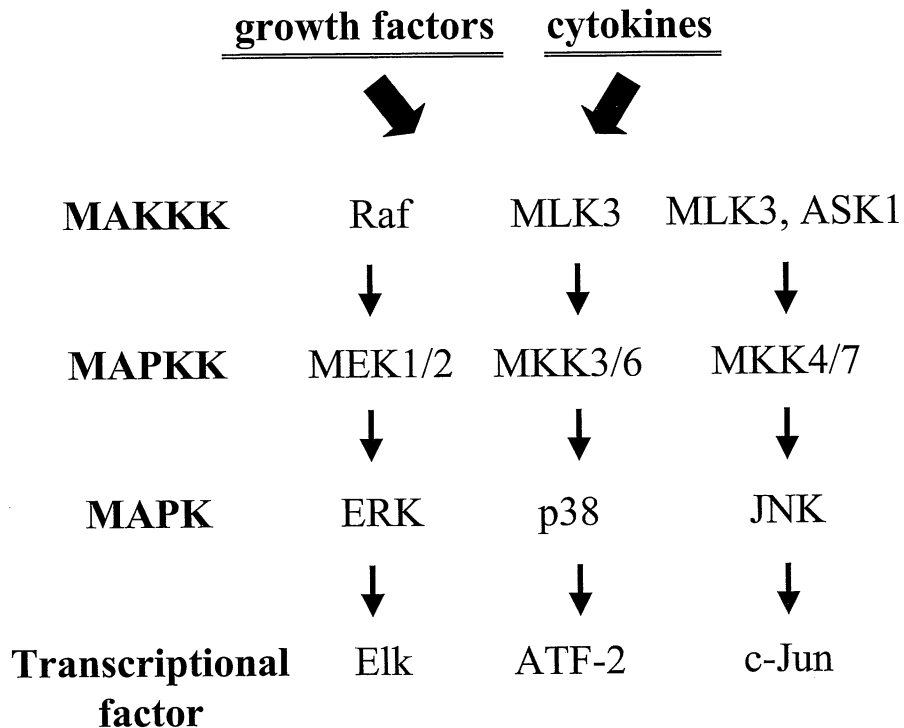


Fig. 3. A simplified schematic representation of MAPK pathways discussed in this article.

Fig. 4. A: JNK activity (upper) was significantly increased at 6 hr after tFCI compared with the nonischemic control brains (lane C). The phospho-JNK bands were observed at 46 and 54 kDa and increased parallel to JNK activity (middle). JNK expression was not increased or decreased after reperfusion (lower).
 B: Representative photomicrographs show the immunohistochemistry for phospho-JNK in the caudate putamen of the MCA territory after tFCI (upper). After 6 hr of reperfusion, phospho-JNK expression was intensely increased compared with the same region in the nonischemic rat brains. Scale bar, 50 μ m. Representative photomicrographs show double immunofluorescent staining for phospho-JNK (p-JNK) and NeuN (lower). Overlapped image of p-JNK and NeuN immunoreactivity demonstrated p-JNK-positive cells colocalized mainly with neurons. Scale bar, 8 μ m.
 C: Apoptotic-related DNA fragmentation after tFCI was analyzed with a commercial cell death detection kit (n = 4). DNA fragmentation increased significantly in the entire MCA territory lesion 24 hr after reperfusion. In the SP600125-treated animals, DNA fragmentation significantly decreased at a dose of 1.0 mg/kg compared with the vehicle-treated (lane V) animals 24 hr after tFCI (*p < 0.05).
 D: Representative photomicrographs show TUNEL-positive cells in the caudate putamen of the vehicle-treated and SP600125-treated groups 24 hr after tFCI. TUNEL-positive cells were strongly expressed in the vehicle-treated animals (left), whereas in the animals treated with SP600125 (1.0 mg/kg), TUNEL reactivity decreased (right). Scale bar, 30 μ m.

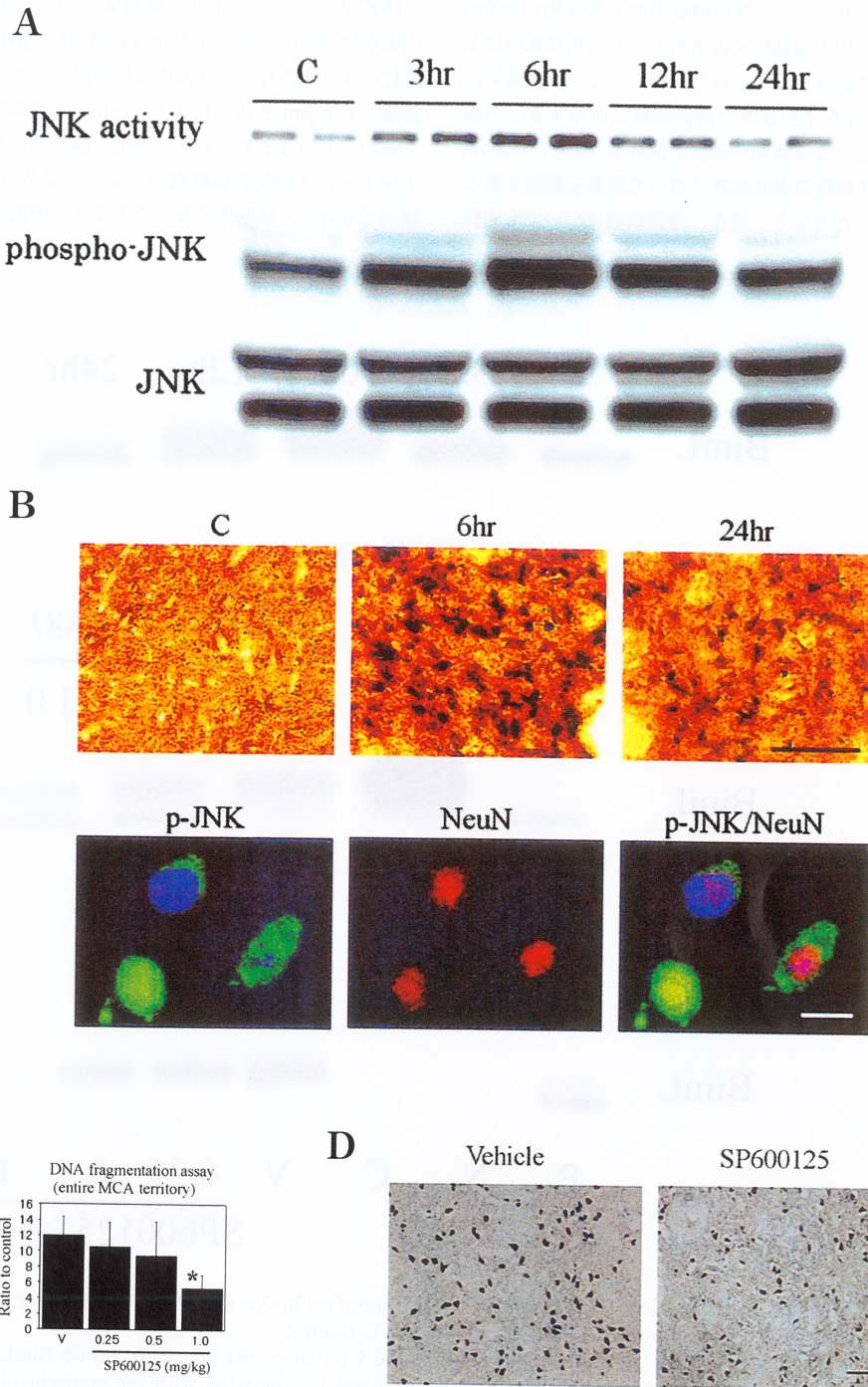


Fig. 4.

る JNK とともに神経細胞アポトーシスに強く関与していると考えられてきた。選択的阻害剤である SB-239063 の投与により中大脳動脈永久閉塞モデルで梗塞巣の減少と機能予後の改善が認められた。また、この保護効果が、astrocyte に存在する p38 の機能抑制に由来するとの報告があり、さらなる研究の発展が期待される²⁰。さらに、p38 が、心筋細胞の虚血耐性において重要な機能を果たすことが明らかとなり、現在、神経細胞においても同様

の実験結果が、散見され始めている。

JNK は、おそらく 3 つの MAPK のうち最も脳虚血との関連性が高いと思われる (8, 24, 25, 27)。JNK は、リン酸化により活性化し、代表的な転写因子である AP-1 を構成する c-Jun を活性化する。c-Jun は、細胞障害に広く関わっていると考えられ、事実、脳虚血においては、アポトーシスの受容体経路のリガンドである CD95L を増加させたり、細胞内カルシウムイオンの増加によるネ

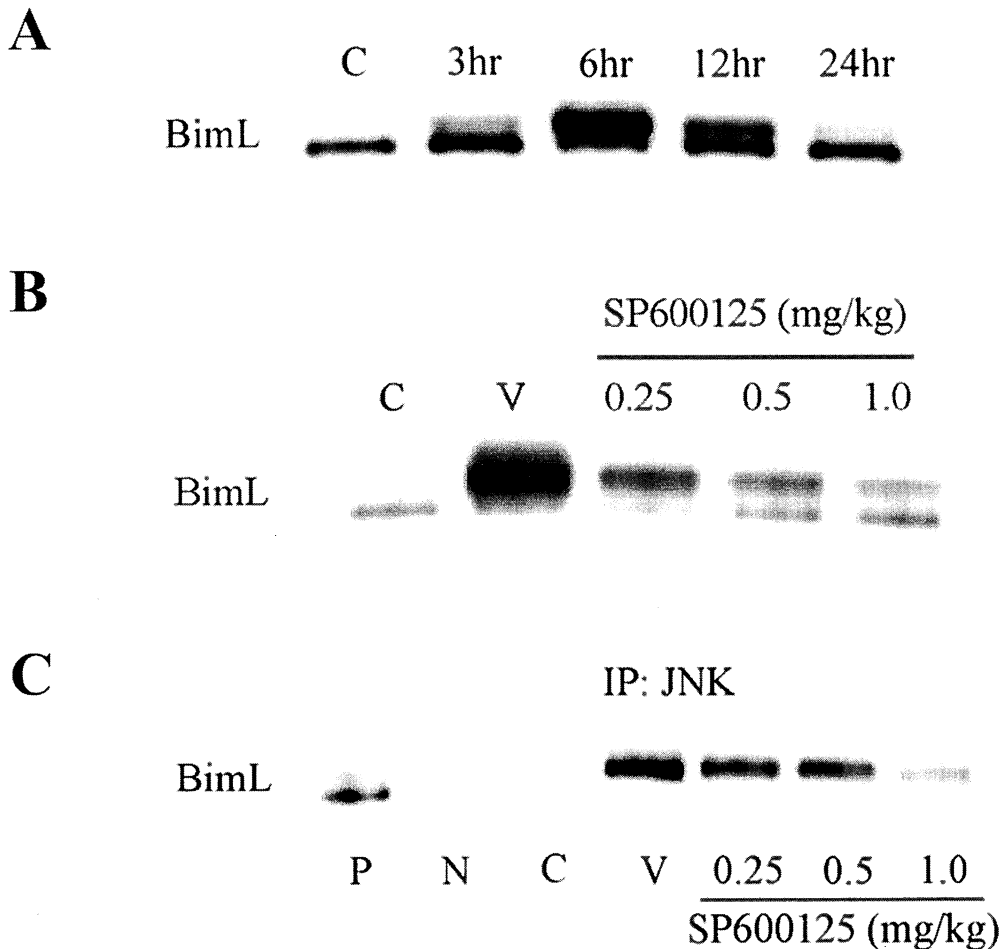


Fig. 5. A: Western blot analysis of BimL in the MCA territory of rat brains after tFCI. The band of BimL was evident at 24 kDa and peaked 6 hr after reperfusion. C, Control.

B: Western blot analysis of BimL in the ischemic MCA territory. Six hours after tFCI, BimL was significantly increased in the vehicle-treated animals (lane V) compared with the nonischemic control brains (C), but was inhibited by treatment with SP600125 in a dose-dependent manner.

C: Coimmunoprecipitation analysis demonstrated that JNK-BimL interaction was significantly increased 6 hr after tFCI in the vehicle-treated (lane V) animals compared with the nonischemic control brains (lane C), but was inhibited by treatment with SP600125 in a dose-dependent manner. P, positive control. N, negative control.

クローシスを促進するとされる^{8,29)}。JNK 自体は、アポトーシスのミトコンドリア経路との関連性が強く、JNK の遺伝子を破壊することで cytochrome c や Smac/DIABLO などのミトコンドリアからの放出、および Bax や Bak のミトコンドリアへの移動が阻止される^{29,30)}。また、JNK の選択的阻害剤を用いた局所脳虚血の実験結果から、JNK 活性の抑制が、c-Jun の活性化を効果的に抑えることで神経細胞死に強い拮抗作用を示すことが報告された³⁰⁾。

我々は、JNK の活性化からミトコンドリア経路に至るカスケードを中心に実験を重ねた結果、BH3-only タンパクの Bim が JNK を介する虚血性アポトーシスシグナルを受け取って、ミトコンドリアに伝達することを、ラットの一過性脳虚血モデルを用いて解明した⁹⁾。すなわち、虚血後、一過性に JNK 活性が上昇し、これに呼応して Bim の増加・リン酸化と JNK-Bim 間の結合増加がみられる。そして、JNK 選択的阻害剤である SP600125 を虚血前に投与すると、Bim の発現と JNK-Bim 間の結合は抑制され、同時に虚血性アポトーシスも減少するのである。さらに、SP600125 により Bim-Bax 間の結合および

Bax のミトコンドリアへの移動が、阻害されることが確認された (Fig. 2, 4, and 5)。以上のことから、Bim が JNK 活性に依存してアポトーシスシグナルをミトコンドリアに伝達することが判明した。このように、JNK には、ミトコンドリア経路と受容体経路の両者を賦活する作用があると考えられている。

フリーラジカル (Fig. 6)

フリーラジカルとは、不対電子が存在する化学種を総称するが、虚血性神経細胞死との観点から問題になるのは、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、および一酸化窒素 (NO) などである。まず、脳内の酸素はミトコンドリアの電子伝達系において酸化的リン酸化を受けて H_2O になるが、何らかのストレスによりミトコンドリア機能が傷害されると、スーパーオキシドが、多量に生成される。特に、脳虚血再還流モデルにおいて、より著しいスーパーオキシドの産生と漏出が認められる³⁰⁾。その後、金属イオンの存在下に Fenton 反応および Harber-Weiss 反応によって毒性の高いヒドロキシラジカルが生成される³³⁾。さらに、ス

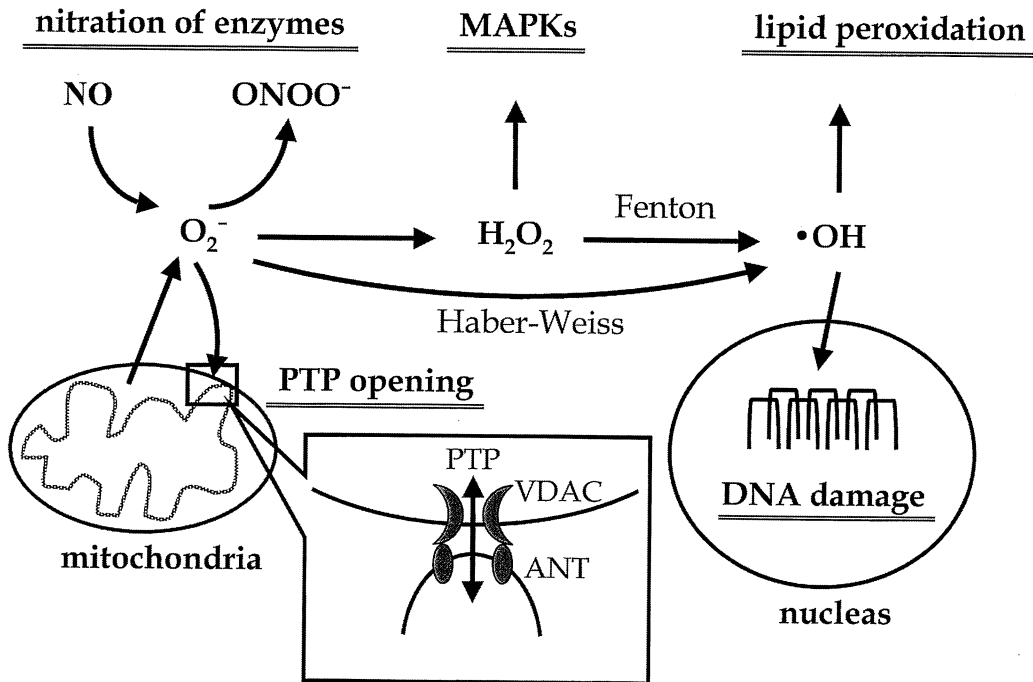


Fig. 6. Representative mechanisms of free radicals-induced neuronal injury in ischemic events. Inset indicates a possible model of PTP consisting of VDAC in the outer mitochondrial membrane and ANT in the inner mitochondrial membrane.

スーパーオキシドは、容易に一酸化窒素と反応して反応性の高いペルオキシナイトライト (ONOO-) を生じる。一酸化窒素は一酸化窒素合成酵素 (NOS) により、生体調節物質として正常でも産生されている。これらフリーラジカルは、低分子量であるために、即座に細胞膜を越えて周辺組織に拡散し、かつ様々な生体構成成分を標的にするのであるが、ここでは、神経細胞障害に関わる代表的な機構についてのみ述べる。

スーパーオキシドは、フリーラジカルの供給源となるばかりでなく、それ自体もミトコンドリアのPTPの開口を促し cytochrome c を放出させる機能がある^{33,34}。過酸化水素は、それ自体の細胞障害性は弱いとされるが、前述のMAPKや転写因子を活性化する特徴があり、結果としてミトコンドリア経路と受容体経路の両者が促進されることになる³⁵。ヒドロキシラジカルは、強力な酸化ストレス作用を有し、特に、核に対しては直接DNAを分断することが知られている³⁶。また、膜成分に含まれる高度不飽和脂肪酸は、ヒドロキシラジカルの絶好の標的となり、各種の細胞内膜構造を破壊する。我々も脳虚血再還流モデルを用いて、フリーラジカルによる膜への酸化的ストレスの発現および虚血性アポトーシスへの関与を報告した³⁷。さらに、一酸化窒素やペルオキシナイトライトなどの窒素酸化物は、活性酵素をニトロ化することにより、その生物活性を阻害することが知られており、実験的脳虚血モデルにおいても同様の所見が得られている³⁸。

おわりに

以上、神経細胞アポトーシスの細胞内カスケードについて主要な経路を中心に概説したが、正常細胞内では、個々のカスケードが互いに促進と抑制のバランス下に統合されている。そして、虚血性ストレスが、このバランスを崩してカスケードの全体または一部を賦活化することで神経細胞死に至ると考えられる。実際の虚血性神経細胞死では、ネクローシスからアポトーシスまで連続した多様な形態変化が認められる。この事実は、虚血の程度や持続時間に依存して神経細胞毎に賦活されるカスケードの部位や程度が異なることを意味しており、こうした細胞死に関わる機構の多様性が、脳虚血治療を困難にしている。今後は、どの系を制御すれば効率的に神経細胞死を抑制できるかが、重要な研究課題となるであろう。

文 献

- 1) Siesjo, B.K., Bengtsson, F. : Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **9** : 127-140, 1989.
- 2) Morikawa, E., Mori H., Kiyama Y., et al : Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J. Neurosci.* **18** : 9727-9732, 1998.
- 3) Buchan, A, and Pulsinelli, W. A. : Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J. Neurosci* **10** : 311-316, 1990.
- 4) Fink, K., Zhu, J., Namura, S., Shimizu, Sasamata, M., et al : Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J. Cereb. Blood Flow/Metab* **18** : 1071-1076, 1998.
- 5) Graham, S.H., and Chen, J. : Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **21** : 99-109, 2001.
- 6) Sugawara. T., Noshita, N., Lewen, A., et al : Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J. Neurosci.* **22** : 209-217, 2002.
- 7) Cao, G., Pei, W., Lan, J., et al : Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci.* **21** : 4678-4690, 2001.
- 8) Okuno, S., Saito, A., Hayashi, T., et al : The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with bim after transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **24** : 7879-7887, 2004.
- 9) van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., et al : The role of mitochondrial factors in apoptosis : a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* **9** : 1031-1042, 2002.
- 10) Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., Lemoine, N.R. : Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim

- which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* **22** : 3577-3589, 2002.
- 11) **De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M.K., et al** : The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* **16** : 607-609, 2002.
 - 12) **Puthalakath H, Strasser A** : Keeping killers on a tight leash : transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* **9** : 505-512, 2002.
 - 13) **Saito, A., Hayashi, T., Okuno, S., et al** : Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the Bad cell death signaling pathway. *J. Neurosci.* **23** : 1710-1718, 2003.
 - 14) **Putcha GV, Le S, Frank S, et al** : JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* **38** : 899-914, 2003.
 - 15) **Lei K, Davis RJ** : JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100** : 2432-2437, 2003.
 - 16) **Harris, C.A., Johnson, E.M. Jr** : BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J. Biol. Chem.* **276** : 37754-37760, 2001.
 - 17) **Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., et al** : Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **18** : 4914-4928, 1998.
 - 18) **Cregan, S.P., Dawson, V.L., Slack, R.S.** : Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* **23** : 2785-2796, 2004.
 - 19) **Zhao, H., Yenari, M.A., Cheng, D., et al** : Bcl-2 transfection via herpes simplex virus blocks apoptosis-inducing factor translocation after focal ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **24** : 681-692, 2004.
 - 20) **van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., et al** : Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys Res Commun.* **304** : 487-497, 2003.
 - 21) **Saito, A., Hayashi, T., Okuno, S., et al** : Modulation of the Omi/HtrA2 signaling pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse brains that overexpress SOD1. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **127** : 89-95, 2004.
 - 22) **Martin_Villalba, A., Herr, I., Jeremias, J., et al** : CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.* **19** : 3809-3817, 1999.
 - 23) **Plesnila, N., Zinkel, S., Le, D.A., et al** : BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98** : 15318-15323, 2001.
 - 24) **Irving, E.A., Bamford, M.** : Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J. Cereb Blood Flow Metab* **22** : 631-647, 2002.
 - 25) **Mielke, K., Herdegen, T.** : JNK and p38 stresskinases—degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61** : 45-60, 2000.
 - 26) **Zablocka, B., Duzniewska, J., Zajac, H., et al** : Opposite reaction of ERK and JNK in ischemia vulnerable and resistant regions of hippocampus : involvement of mitochondria. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **110** : 245-252, 2003.
 - 27) **Davis, R.J.** : Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103** : 239-252, 2000.
 - 28) **Herdegen, T., Claret, F_X, Kallunki, T., et al** : Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J. Neurosci.* **18** : 5124-5135, 1998.
 - 29) **Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., et al** : JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J. Biol. Chem.* **278** : 17593-17596, 2003.
 - 30) **Lei, K., Nimnual, A., Zong, W_X., et al** : The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH2-terminal kinase. *Mol. Cell Biol.* **22** : 4929-4942, 2002.

- 31) **Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., et al** : Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288** : 870-874, 2000.
- 32) **Borsello, T., Clarke, P.G., Hirt, L., et al** : A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat. Med.* **9** : 1180-1186, 2003.
- 33) **Chan, P.H., Kawase, M., Murakami, K., et al** : Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J. Neurosci.* **18** : 8292-8299, 1998.
- 34) **Berman, S.B., Hastings, T.G.** : Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria : implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **73** : 1127-1137, 1999.
- 35) **Tamagno, E., Robino, G., Obbili, A., et al** : H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp. Neurol.* **180** : 144-55, 2003.
- 36) **Halliwell, B., Aruoma, O.I.** : DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281** : 9-19, 1991.
- 37) **Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., et al** : Oxidative injury to the endoplasmic reticulum in mouse brains after transient focal ischemia. *Neurobiol. Dis.* **15** : 229-239, 2004.
- 38) **Keller, J.N., Kindy, M.S., Holtsberg, F.W., et al** : Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury : suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* **18** : 687-697, 1998.