

脳を守る：虚血性ニューロン死

三 谷 章

Protecting the Brain: Ischemia-Induced Neuronal Death

Akira MITANI

Key words: Ischemia, Glutamate toxicity, Calcium ion, Hypothermia

はじめに

脳卒中などの虚血性脳血管障害によって中枢ニューロンが死に陥って脱落すると、そのニューロンの担当する機能が障害され、言語・記憶・思考などの高次脳機能が喪失する。このことは「寝たきり」や痴呆症をはじめその後遺症で悩む患者の発生につながり、わが国のような高齢化社会では深刻な社会問題となっている。このニューロン死の発生過程は多様で、これまでニューロンを死に導く要因として ATP などのエネルギー源の枯渇、興奮性アミノ酸の神経毒性、カルシウムイオンの細胞内濃度上昇、フリーラジカルの産生、アポトーシス関連蛋白質の合成などのさまざまな要因が報告されており、虚血性ニューロン死はこれらの要因が複雑にからみ合って発生しているものと考えられる。このように多様な要因から発生していると考えられる虚血性ニューロン死ではあるが、その起因は血液の途絶という1つの出来事であり、虚血最初期過程においては比較的単純な機構から細胞死が発動しているかもしれない。本稿の前半では、この一連の虚血性ニューロン死連鎖の最初期過程を概説し、後半では最近マスコミなどでも取りあげられている脳低温療法の虚血性ニューロン死に対する強力な防御作用について紹介する。

虚血性ニューロン死

虚血性ニューロン死は、虚血中のニューロンの損傷の程度の違いから2つに大別される。ひとつは虚血状態が重篤であるため細胞がエネルギー枯渇によりもたらされる浮腫によって直ちに構造的破壊に至る急性ニューロン死で、もう1つは虚血状態が比較的軽度であるため細胞は直ちに崩壊せず数日間の時間経過のち死に至る遅発性ニューロン死である。

遅発性ニューロン死は、その進行が緩徐であるため治療の対象となり得るのではないかと考えられている。この細胞死は、齧歯類では短時間の脳虚血解除後に遅発性に発生するという特徴のほかに、虚血に対して脆弱なニューロン群においてのみ発生するという選択性を示す。特に海馬 CA1 野と呼ばれる脳領域の選択的脆弱性は顕著であり、ヒトにおいても観察されることから、これまで短時間脳虚血後海馬 CA1 野において発生する遅発性ニューロン死を虚血性ニューロン死の発生機構解明の糸口として多くの研究がなされた。このような研究によって明らかにされた遅発性ニューロン死の重要な発生因子にグルタミン酸の神経毒作用がある。

グルタミン酸神経毒性

旨味調味料であるグルタミン酸を脳にふりか

けるとニューロンは死んでしまう。このグルタミン酸がニューロンに対して毒性をもつことは、1957年に網膜において、ついで1969年に中枢神経系においてそれぞれ発見された^{1,2)}。その後、1984年に細胞外グルタミン酸が虚血脳領域において濃度上昇しているという報告がなされるに至り³⁾、虚血性ニューロン死の発生因子としてグルタミン酸の神経毒作用が注目されるようになった。

本来、グルタミン酸は情報伝達を行う際の伝達物質として用いられ、細胞内物質代謝に使用されるために、ニューロン内には豊富に存在する。虚血中に細胞外で濃度上昇するグルタミン酸の起源は、以前はグルタミン酸作動性神経終末から放出される伝達物質としてのグルタミン酸がその起源として考えられていた。しかしながら、その後の研究によって、脳虚血時には神経終末部のシナプス小胞に入っている伝達物質としてのグルタミン酸は放出されず、細胞質に細胞内代謝物質として存在するグルタミン酸が、細胞膜に組み込まれているグルタミン酸トランスポーターを介して、流出しているのであると考えられるようになった。すなわち、通常細胞内外の Na^+ の濃度勾配（細胞外濃度の方が高い）を利用して細胞外のグルタミン酸を Na^+ と共輸送して細胞内に取り込み、その毒性作用を除去しているグルタミン酸トランスポーターが、虚血時には細胞内エネルギーの低下がもたらす Na^+ 濃度勾配の低下のために逆輸送を起し、細胞外にグルタミン酸を排出するようになると考えられている^{4,5)}。

虚血脳においてはこの細胞外グルタミン酸濃度上昇は虚血に対して脆弱な脳領域においてのみ発生するのではなく、虚血に対して脆弱性を示さない脳領域においてもほぼ同程度の細胞外グルタミン酸濃度上昇が観察される^{6,7)}。それゆえ、短時間脳虚血の後発生する海馬 CA1 野の遅発性ニューロン死の領域選択性は、虚血中の高濃度細胞外グルタミン酸だけでは説明できない。高濃度細胞外グルタミン酸に呼応して濃度上昇する細胞内カルシウムイオンの領域選択

性によって説明される。

細胞内カルシウムイオン濃度上昇

脳を薄く切り、その脳切片を金魚を飼うように人工脳脊髄液の水槽に入れ酸素をバブリングしてやると、脳切片中のニューロンは10時間ぐらひは生存する。先ほどの海馬 CA1 野を含む脳切片を作製し、その海馬切片にカルシウムイオン蛍光指示薬を取り込ませると、生きた海馬ニューロンの細胞内カルシウムイオンの濃度変化を蛍光顕微鏡で観察することができる。そこで細胞外液中から酸素とグルコースを除去することにより *in vitro* の系での虚血条件を負荷すると、細胞死が発生しない海馬 CA3 野においては著明な細胞内カルシウムイオン濃度上昇は観察されないが、選択的細胞死を起こす海馬 CA1 野においては領域選択的細胞内カルシウムイオン濃度上昇が観察される（図1）⁸⁾。この海馬 CA1 野において濃度上昇する細胞内カルシウムイオンは、細胞外からの流入成分と細胞内貯蔵部（小胞体）からの動員成分によって構成されている。特に、海馬 CA1 野の錐体細胞には細胞外からのカルシウムイオン流入を導く NMDA 型グルタミン酸受容体が高密度に分布していることから、虚血時に濃度上昇した細胞外グルタミン酸により活性化された NMDA 型グルタミン酸受容体を介するカルシウムイオン流入が海馬 CA1 野領域選択的細胞内カルシウムイオン濃度上昇の主因と考えられる。おそらく、他の虚血に対して選択的脆弱性を示す脳領域のニューロンにおいても、脆弱性を示さない脳領域のニューロンと比較して、特別に発達した何らかの細胞内カルシウムイオン濃度上昇機構が存在するものと考えられる。

細胞内において濃度上昇したカルシウムイオンはカルシウムイオンを細胞外へ汲み出す ATP 依存性カルシウムイオンポンプの活性化を促し、より一層のエネルギー消費を起させ、それによってもたらされるエネルギー枯渇はより高濃度のカルシウムイオン細胞内濃度上昇を導く。そして、虚血中濃度上昇した細胞内

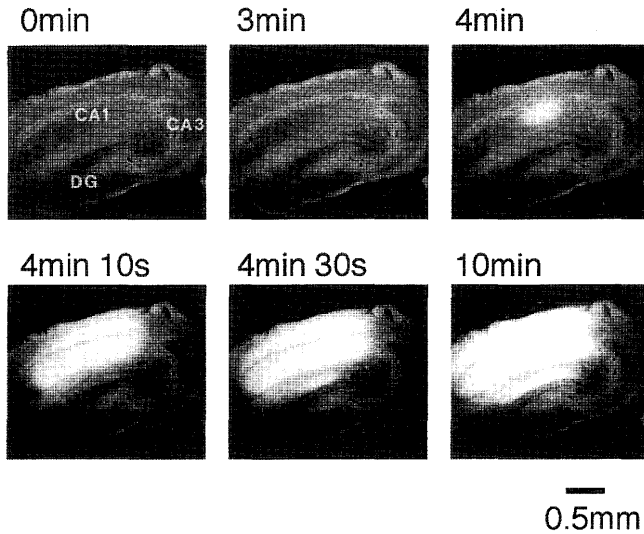


図1 海馬切片標本による細胞内 Ca^{2+} の変化。海馬切片標本に虚血を加えた（酸素とグルコース除去）場合に観察される海馬 CA1 野の選択的な細胞内 Ca^{2+} の上昇。虚血開始4分後に細胞内 Ca^{2+} の上昇を示す蛍光が CA1 野に観察され、速やかに CA1 野全域に広がった。しかしながら、隣接の海馬 CA3 野では顕著な細胞内 Ca^{2+} の上昇は観察されなかった。DG は歯状回。

カルシウムイオンが細胞内セカンドメッセンジャーとして働き、ニューロンを死に導く多くの細胞内反応を活性化すると考えられている。カルシウムイオン依存性キナーゼの活性化による膜受容体の機能変化、カルシウムイオン依存性プロテアーゼの活性化による細胞骨格タンパク質の構造変化、NO 合成酵素などの活性化によるフリーラジカルの産生、アポトーシス関連蛋白質の合成などをはじめとして多種多様な反

応が活性化されていることが報告されている（図2）。このようなカタストロフィックな反応が遅発性ニューロン死発生の最初期過程において発生していると考えられている。

虚血性ニューロン死の防御法の探索

上述のような虚血性ニューロン死の発生過程が明らかにされるにともない、数多くのグルタミン酸受容体のアンタゴニストやグルタミン酸

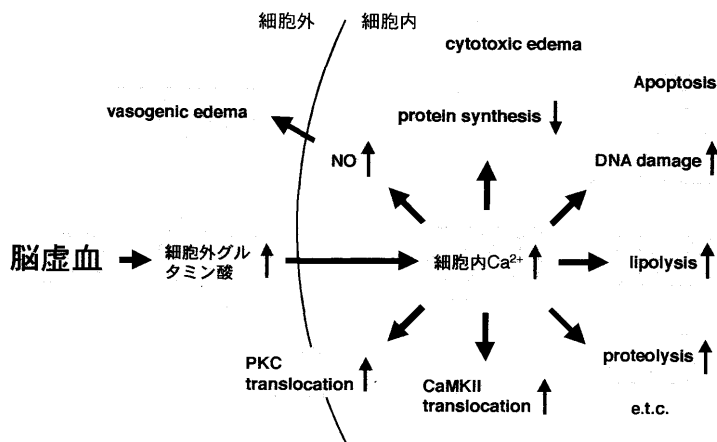


図2 虚血性ニューロン死の発生機序（仮説）

トランスポーターのブロッカー、あるいはカルシウムイオンチャネルの拮抗薬などが薬理的防御法として開発され試行された。しかしながら、そのどれもがうまくいかなかった。その原因としては、①細胞外グルタミン酸流出に関与するトランスポーターにしても細胞内カルシウムイオン濃度上昇を導くチャネルにしてもそれぞれ複数のタイプが存在し、単一の薬物では抑え難いこと、②たとえ薬物が効いたとしても、グルタミン酸トランスポーターやカルシウムイオンチャネルは脳細胞に普遍的に存在し、細胞機能維持に不可欠であり、これらの機能を止めてしまうことは重度の副作用を発生させたり、生命活動自体を脅かしたりするものであること、などが考えられる。このような状況の中で動物実験で副作用をほとんど発生させずに虚血性ニューロン死を大幅に軽減させる脳低温法が

報告された。

脳低温療法

低体温が虚血障害から脳を保護することは、すでに半世紀以上も前から知られていた。しかしながら全身管理技術の未熟さなどのために良好な結果が得られず次第に廃れていった経緯がある。1987年に動物実験で脳温を僅か2°C下げただけで一過性脳虚血後に発生するニューロン死を大幅に軽減できたという報告がなされ⁹⁾、それ以来、脳低温法の虚血性ニューロン死に対する有効性及び防御効果の発生機構について数多くの研究がなされている。また、臨床の現場でも全身管理技術の飛躍的な進歩にともない脳低温療法の新たなチャレンジがなされ有効例の報告が蓄積されている。

これまでの基礎的研究成果を総括すると、脳

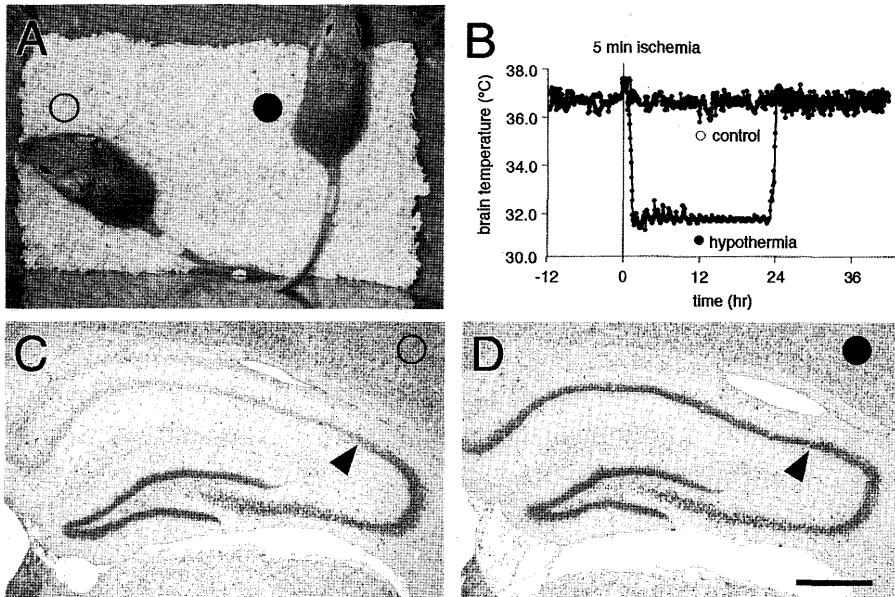


図3 脳低温の虚血ニューロン保護効果。A: 2匹のスナネズミ (○は対照群, ●は脳低温処置群) を用意する。B: 両方の動物に5分間の一過性脳虚血を負荷した後、ネズミ●には血流再開1時間後から24時間に亘って脳温32°Cの低温処置を施した。一方、対照ネズミ○では血流再開後の脳温を37°Cに維持した。1週間の生存後に動物を灌流固定し、脳を採取した。C: 対照ネズミ○では海馬CA1野に選択的ニューロン死が発生した(矢頭は海馬CA1野とCA3野の境界を示し、矢頭より左側がCA1野)。D: 脳低温処置ネズミ●では海馬CA1野の虚血性選択的ニューロン死は防御された。Scale bar=0.5 mm。

温を数°C 下げる脳低温処置を虚血中に行えば極めて強力に、そして虚血後の処置であっても効果的に虚血性ニューロン死を抑制する（図3）。虚血中の脳低温処置に関しては、図2で示したグルタミン酸の細胞外流出をはじめ虚血性ニューロン死の発生に関わると考えられるほとんど全ての因子が脳低温処置により抑えられることが知られている。これらのことからその作用機序を考察すると、脳低温が、脳全体の神経活動や物質代謝を抑え虚血脳領域のエネルギー消費を減じることによって、虚血侵襲そのものを軽減したために、このように作用点の多い抑制効果を生じさせたと理解することが出来る。しかしながら、図3で示したような虚血後の脳低温処置による虚血性ニューロン死の防御効果はエネルギー消費の減少だけでは説明できない。放置しておけば死んでしまうニューロンを後から低温処置を施すことにより、その死の進行を停止させるだけでなく回復させてしまうという脳低温の効果を考えて、脳低温にはニューロンを積極的に防御・治療する作用があると言える。今後、この作用の分子論的な理解が進めば、確固たる作用理論に立脚したより効果的な虚血性脳血管障害の治療法の見通しが立てられるようになるのではないだろうか。

すでに国内のいくつかの救急医療施設において、実際に運び込まれた重症のくも膜下出血や頭部外傷の患者を脳低温療法によって救命できたという明るいニュースが示すように¹⁰⁾その治療的実用性が高いだけに、その作用機序の解明が急がれる。

文 献

- 1) Lucas DR, Newhouse JP: The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Amer Med Assoc Arch Ophthalmol*, 1957; 58, 193-201
- 2) Olney JW: Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 1969; 164, 719-721
- 3) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*, 1984; 43, 1369-1374
- 4) Sanchez-Prieto J, Gonzalez P: Occurrence of a large Ca^{2+} -independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptosomes). *J Neurochem*, 1988; 50, 1322-1324
- 5) Rossi DJ, Oshima T, Attwell D: Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 2000; 403, 316-321
- 6) Globus MY-T, Busto R, Martinez E, Valdes I, Dietrich WD, Ginsberg MD: Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and γ -aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *J Neurochem*, 1991; 57, 470-478
- 7) Mitani A, Andou Y, Kataoka K: Selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons cannot be explained in terms of an increase in glutamate concentration during ischemia in the gerbil: A brain microdialysis study. *Neuroscience*, 1992; 48, 307-313
- 8) Mitani A, Takeyasu S, Yanase H, Nakamura Y, Kataoka K: Changes in intracellular Ca^{2+} and energy levels during in vitro ischemia in the gerbil hippocampal slice. *J Neurochem*, 1994; 62, 626-634
- 9) Busto R, Globus MY-T, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD: Small differences in intrischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987; 7, 729-738
- 10) 柳田邦男：脳治療革命の朝。東京：文藝春秋，2000