

—総説—

## 脳虚血後神経細胞障害における小胞体ストレスの役割

種田靖久<sup>a), b)</sup>, 原英彰<sup>a) \*</sup>

**要約:** 近年、細胞死の原因として、従来知られていたミトコンドリア障害やDNA障害によるものとは異なる、小胞体機能の破綻(小胞体ストレス)が関与することが明らかになってきた。小胞体ストレスは、アルツハイマー病などの神経変性疾患の神経細胞死メカニズムに関与していることが示唆され、アポトーシスシグナルの新たな発信地として注目を集めている。そこで、脳虚血後神経細胞障害の病態・機序を解明するための一環として、動物脳虚血モデルにおける小胞体ストレスの役割について検討した。砂ネズミ前脳虚血モデルにおける一過性脳虚血誘発海馬CA1野選択的神経細胞死およびマウス中大脳動脈閉塞モデルにおける永久閉塞誘発神経細胞死において小胞体ストレスの関与が認められた。そこで、新規脳卒中治療薬探索のため、小胞体ストレスにより誘導される分子シャペロンBiPの選択的誘導薬(BiP inducer X: BIX)の脳保護作用について検討した。BIXは、砂ネズミ前脳虚血誘発海馬CA1野選択的神経細胞死およびマウス中大脳動脈永久閉塞誘発神経細胞死を抑制した。以上より、脳虚血後神経細胞障害の機序に小胞体ストレス誘導性アポトーシスの関与が示唆され、BiP選択的誘導薬は神経細胞保護作用を有する新規な脳卒中治療薬の候補となる可能性が示唆された。

**索引用語:** アポトーシス、BiP、小胞体ストレス、脳虚血、神経細胞死

## Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in the Neuronal Death Induced by Ischemia

Yasuhisa OIDA<sup>a), b)</sup>, Hideaki HARA<sup>a) \*</sup>

**Abstract:** Recent studies have revealed that perturbation of endoplasmic reticulum (ER) functions, which is called ER stress, induces apoptosis. ER stress, which is caused by an accumulation of unfolded proteins in the ER lumen, is associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease. The purpose of this study was to provide new insights into the pathogenesis of brain ischemia for development of new therapeutic approaches to ischemic brain diseases. We suggest that ER stress is involved in the CA1-selective neuronal cell death and permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) induced cell death. Furthermore, to investigate a possible role of a selective inducer of BiP (BIX), we evaluated the neuroprotective effects of BIX against acute ischemic neuronal damage. BIX provided significant protection against CA1-selective neuronal cell death and permanent MCAO-induced cell death. In conclusion, ER stress plays an important causal role both in transient and permanent ischemic damage, and drugs which selectively induce BiP may exert a neuroprotective effect and may be a candidate of new therapeutic treatments of stroke.

**Keyphrases:** apoptosis, BiP, ER stress, ischemia, neuronal cell death

### 1. 緒言

脳血管障害(脳卒中)は、主として出血性脳血管障害と虚血性脳血管障害とに分類することができる。出血性脳

血管障害には頭蓋内出血(脳出血、くも膜下出血)があり、虚血性脳血管障害は脳梗塞(脳血栓、脳塞栓)、一過性脳虚血(transient ischemic attack: TIA)、可逆性脳虚血性神経症状発作(reversible ischemic neurological deficit: RIND)に

<sup>a)</sup> 岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西 1-25-4)

Department of Biofunctional Evaluation, Molecular Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University  
(1-25-4 Daigakumishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

<sup>b)</sup> 大垣市民病院薬剤部 (〒503-8502 大垣市南瀬町 4-86)

Department of Pharmacy, Ogaki Municipal Hospital (4-86 Minaminokawa-cho, Gifu 503-8502, JAPAN)

分類することができる。従来、我が国は出血性脳血管障害による死亡が虚血性脳血管障害によるそれよりも多いとされてきたが、1975年頃から、脳血管閉塞に起因する虚血性脳梗塞死が脳出血死よりも多発するようになり、現在の日本の死亡原因の第3位を占めている。脳卒中による死亡のうち、脳梗塞が約60%、脳出血が約25%、クモ膜下出血が10%を占めている。虚血性脳血管障害は、片麻痺、運動性失語、感覚性失語、同名半盲などの脳局所性症状、さらには総合的な機能である知的障害を伴って発症し、かつ、それらの脱落症状が後遺症として残存するとされている。これらは血栓症、塞栓症を原因とする脳梗塞の臨床像であり、突然に脳梗塞として発症するものもあるが、その臨床経過中には、いくつかの段階、すなわち、TIAあるいはRINDを経て、最終的に脳梗塞に至る場合が多い。

脳血管障害は虚血領域によって全脳虚血 (global ischemia) および局所性脳虚血 (focal ischemia) に分類することができる。虚血性脳血管障害のうちで、治療の必要性が最も求められるものは神経脱落症状が可逆性であるTIAあるいはRINDなどの発症予防である。また、TIAは脳の虚血性疾患のみならず、狭心症などの虚血性心疾患をはじめとする全身の動脈硬化症病態への警告発作でもある。そこで、脳虚血による神経細胞死のメカニズムを解明し、神経保護や虚血耐性効果のある薬剤の開発や、梗塞巣拡大を予防する治療が期待されている。

小胞体はすべての真核細胞に存在する細胞内小器官である<sup>1)</sup>。小胞体は、分泌タンパク質並びに膜貫通タンパク質が規則正しく折り畳まれ、糖鎖修飾やジスルフィド (S-S) 結合によってその立体構造を整える場であるとともに、細胞内カルシウムの主要な貯蔵庫として、またリン脂質、コレステロール、さらにはセラミドの合成など、脂質代謝の主要器官として、きわめて多岐にわたる生理機能を有している。小胞体内腔には、immunoglobulin heavy chain binding protein/ glucose-regulated protein 78 (BiP/ GRP78; 以下 BiP)、GRP94、GRP170/ oxygen-regulated protein 150 (GRP170/ ORP150) などの多種類の分子シャペロンが存在し、それらの介添えによって、タンパク質の折り畳みが行われている。特に BiP は小胞体内腔タンパク質の5-10%を占めるといわれるほど豊富に存在している。一方、低酸素、アミノ酸飢餓および遺伝子変異など、タンパク質および脂質の品質管理に影響を及ぼす刺激により小胞体の機能は低下し、異常タンパク質が小胞体内に蓄積する。この状態が小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress; ER stress) と呼ばれる状態である。このような危機的状況に陥ると、細胞は小胞体ストレス応答と呼ばれる生体防御機構を作動させる (Fig. 1)。

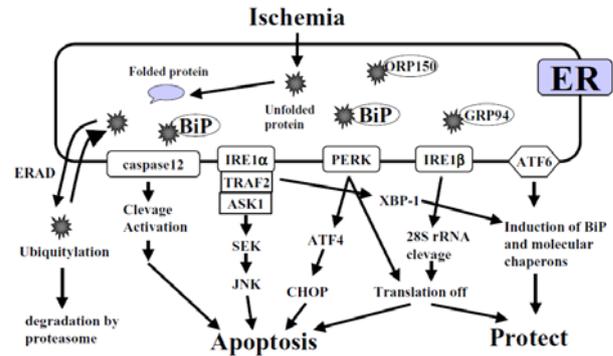


Fig. 1 ER-stress response signal pathway

ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; ATF, activating transcription factor; CHOP, C/EBP homology protein; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; IRE, inositol-requiring enzyme; JNK, c-Jun N-terminal kinase; GRP, glucose-regulated protein; PERK, doublestranded RNA-activated protein kinase-like ER resident kinase; SEK, stress-activated protein kinase; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor; XBP1, X-box binding protein 1.

小胞体ストレスに対するストレス応答としては、以前から unfolded protein response (UPR) や小胞体膜に局在する転写因子 sterol regulatory element-binding protein (SREBP) によるコレステロール代謝調節機構の存在が知られていたが、最近では、このストレス応答がアルツハイマー病、パーキンソン病およびポリグルタミン病などの神経変性疾患および脳卒中中の神経細胞死メカニズムに関与していることが示唆され、アポトーシスシグナルの新たな発信地としての小胞体の役割が注目を集めている<sup>2)</sup>。特に神経細胞は神経栄養因子などの分泌タンパク質を盛んに合成しており、発達した小胞体が豊富に存在するため<sup>3)</sup>、小胞体を起源とするアポトーシスが起りやすいと考えられる。

そこで本総説では、砂ネズミ前脳虚血モデルおよびマウス中大脳動脈永久閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) モデルを用いて、脳虚血による神経細胞死のメカニズムと小胞体ストレス誘導性アポトーシスの関連を検討した。さらに、これらのモデルに対して、小胞体ストレスの代表的なマーカーであり分子シャペロン BiP の選択的誘導薬 BiP inducer X (BIX)<sup>4)</sup>の薬理的保護作用を検討した。

## 2. 動物脳虚血モデルと小胞体ストレスの関与

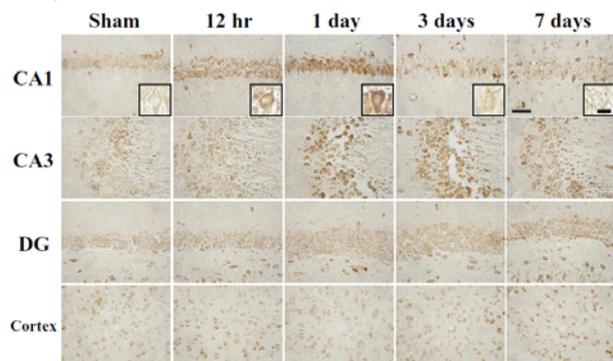
### 砂ネズミ前脳虚血誘発選択的神経細胞障害における小胞体ストレスの関与

神経細胞は虚血に対して弱い、すべての神経細胞が一律に虚血に対して弱いのではなく、ほぼ一律な虚血を一過性に負荷すると、特に弱い細胞、または神経細胞群が存在することが明らかにされている<sup>5,6)</sup>。これを選択的脆弱性 (selective vulnerability) と呼び海馬の CA1 野は、選択的

脆弱性を示す代表的部位の一つである。そこで、脳卒中に対して選択的脆弱性を示す細胞群の神経細胞障害機構における小胞体ストレスの役割を解明することを目的として、砂ネズミ前脳虚血モデルを用いて、一過性脳虚血後の海馬 CA1 野錐体細胞の選択的神経細胞死に対する小胞体ストレスの関与を検討した。

砂ネズミの両側総頸動脈を杉田式クリップ (No.51) で 10 分間結紮して選択的神経細胞死を誘発した。砂ネズミを虚血 12 時間、1、3 および 7 日後に pentobarbital 麻酔し、4% paraformaldehyde 含有 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) を左心室内に注入して灌流固定 (灌流圧 130 cm H<sub>2</sub>O) し免疫染色に用いた。BiP は分子シャペロンであるが、同時に小胞体ストレスの代表的なマーカーでもある。また、C 末端に特徴的な Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 配列を持つ小胞体常在性のタンパク質であるため、anti-KDEL monoclonal antibody を用いて免疫組織学的検討を行うことにより、その局在を検討した。Anti-KDEL monoclonal antibody により、BiP 以外に GRP 94 も一部認識されるが、主に BiP が認識されることがこれまでのウェスタンブロット解析による検討で明らかとなっている。

BiP の海馬および大脳皮質における発現は、海馬 CA1 野錐体細胞において虚血 12 時間および 1 日後で、また、海馬 CA3 野においては虚血 1 日および 3 日後に上昇していた。歯状回および大脳皮質には変化は認められなかった (Fig. 2)。

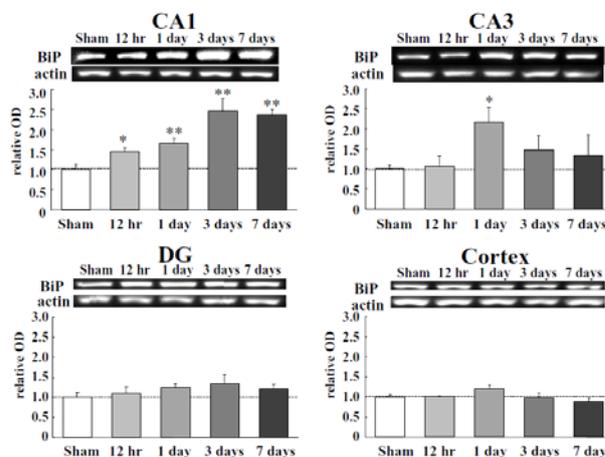


**Fig. 2 Change in levels of BiP in gerbil hippocampus and cortex**

Immunohistochemistry for BiP showed very weak immunoreactivity in the sham-operated brains. In the hippocampal CA1, immunoreactivity was slightly elevated at 12 h, and peaked at 1 day after ischemia. In the hippocampal CA3, immunoreactivity was strong at 1 and 3 days after the ischemia. In the DG and cortex, immunoreactivity was unchanged by ischemia. Scale bar = 50  $\mu$ m. Boxed areas are shown at higher magnification view of CA1. Scale bar = 10  $\mu$ m. DG, dentate gyrus. The result was cited from ref 7.

また、ウェスタンブロット解析のため、同様の方法で虚血 12 時間、1、3 および 7 日後に断頭し、脳を摘出後、顕微鏡下で海馬 CA1 野、CA3 野、歯状回および大脳皮質をそれぞれ単離して用いた。ウェスタンブロット解析では、

BiP の発現は海馬 CA1 野において、虚血 12 時間から早期に有意な上昇が認められ、虚血 3 日後で最大となった。海馬 CA3 野においては、虚血 1 日後でのみ有意に上昇した。歯状回および大脳皮質においては、BiP 発現に変化は認められなかった (Fig. 3)。



**Fig. 3 Change in levels of BiP in gerbil hippocampus and cortex**

By Western blot analysis, BiP was apparently detectable in sham-operated gerbils. In the hippocampal CA1, BiP was significantly increased at 12 h, then increased progressively to peak at 3 days after the ischemia. In the hippocampal CA3, BiP was increased only at 1 day after the ischemia. In the DG and cortex, no increases were detected. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 4 - 9). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 vs. sham. The result was cited from ref 7.

ウェスタンブロット解析で海馬 CA1 野において神経細胞死が認められる虚血 3 日後で最大となったことは、免疫染色の結果とは異なるものであった。一般に、虚血に対しグリア細胞は耐性を示すことが知られている。これらの知見より、虚血後期における BiP の発現にはグリア細胞の関与が高いと考えられる。BiP 発現の局在を検討した結果、神経細胞死が起こった後では、アストロサイトにおいて一部その発現が認められた (データ未提示)。このことは、虚血後期では、虚血に耐性を示すアストロサイトなどでも小胞体ストレス応答が認められ、小胞体ストレスに対して防御機構を働かせていることが示唆された。

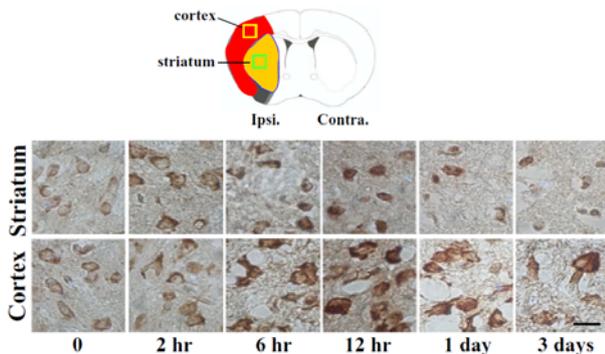
さらに、選択的神経細胞死への関与として、小胞体由来アポトーシスシグナル経路のうち、CHOP/GADD153 を介する経路に注目し、CHOP および CHOP の上流に位置する ATF-4 をそれぞれ免疫組織学的検討およびウェスタンブロット解析にて検討を行った。その結果、海馬 CA1 野における ATF-4 および CHOP の発現の時間経過は、虚血による形態学的変化と一致した (データ未提示)。

#### マウス中大脳動脈閉塞脳虚血後神経細胞障害における小胞体ストレスの関与

虚血による障害は、虚血の範囲 (中心部と辺縁部)・時間および再灌流の有無などによって、そのストレスの種類

および程度はかなり異なってくる。脳虚血（脳梗塞）の場合、虚血中心部（コア領域）の神経細胞では、直ちに血流低下と代謝の低下が起こり、細胞死が引き起こされるが、虚血周辺部（ペナンプラ領域）の神経細胞では、血流低下後もしばらく細胞死は起こらず、この間にさまざまな種類の細胞内ストレス応答が認められる。この間に、いかにして神経細胞を保護し、細胞死を食い止めるかが、脳梗塞治療を行う上で、重要なポイントの一つとなっている。また、臨床上、永久脳虚血は一過性脳虚血よりも高頻度に発症することから、マウス中大脳動脈閉塞（MCAO）誘発神経細胞死における小胞体ストレスの関与を検討した。

左脳側中大脳動脈の閉塞はフィラメント栓子を挿入することにより行った<sup>8,9)</sup>。すなわち、実体顕微鏡下、左脳側中大脳動脈を頸動脈から silicone resin 混合物（Xantopren+ Activator Liquid）で先端を覆った 8-0 ナイロンモノフィラメント（Ethicon, Somerville, NJ, USA）を挿入し閉塞した。マウスを MCAO 2、6、12 時間、1 および 3 日後に pentobarbital 麻酔し、4% paraformaldehyde 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を左心室内に注入して灌流固定（灌流圧 130 cm H<sub>2</sub>O）し免疫染色に用いた。BiP は線条体、大脳皮質ともに MCAO 2 時間後から徐々に上昇し始め、12 時間後に最大に達した。MCAO 1 日および 3 日後の線条体においてほとんどの神経細胞は消失していたが、残った神経細胞では強い免疫反応性が認められた（Fig. 4）。

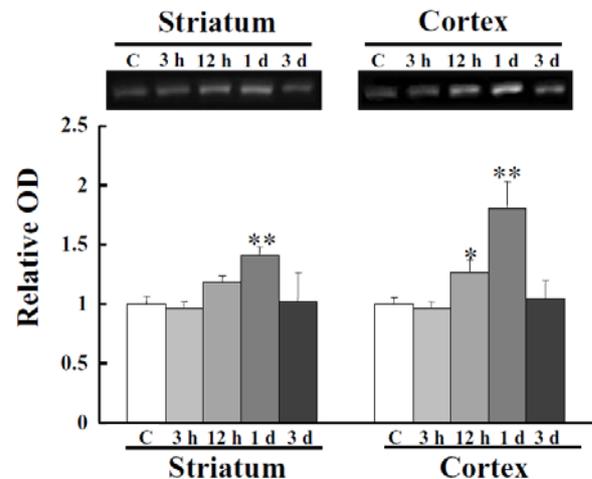


**Fig. 4 Change in levels of BiP expression in the striatum and cortex after MCAO**

Immunostaining for BiP in the striatum and cortex at 0 h, 2 h, 6 h, 12 h, 1 day, and 3 days after MCAO. Expression of BiP increased gradually from 2 h onwards both striatum and cortex. Scale bar = 20  $\mu$ m. Contra, Contralateral; Ipsi, Ipsilateral; MCAO, middle cerebral artery occlusion. The result was cited from ref 10.

また、ウェスタンブロット解析のため、同様の方法で MCAO 6、12 時間、1 および 3 日後に断頭し、脳を摘出後、顕微鏡下で線条体および大脳皮質をそれぞれ単離して用いた。ウェスタンブロット解析では、線条体において BiP は MCAO 12 時間後に上昇傾向を示し、1 日後に有意に上昇し、3 日後には元の状態に戻った。大脳皮質において BiP は、MCAO 12 時間および 1 日後に有意に上昇し、3 日後には元の状態に戻った。BiP の発現上昇は線条体より

も大脳皮質において強く現れた（Fig. 5）。



**Fig. 5 Change in levels of BiP expression in the striatum and cortex after MCAO**

Western blot analysis showed that BiP was detectable. Quantitative analysis for Western blotting showed that the expression level of BiP was significantly increased in the striatum at 1 day and in the cortex at both 12 h and 1 day. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3 - 7). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 vs. Control. C, Control; The result was cited from ref 10.

ATF-4 の発現レベルは、線条体では MCAO 12 時間後に上昇したが、1 日後には元に戻った。大脳皮質では 12 時間から 1 日後にかけて上昇した。CHOP の発現は、線条体では MCAO 6 時間後より上昇し、神経細胞が消失した後も残存神経細胞では強い免疫反応性が認められた。大脳皮質では 12 時間から 1 日後にかけて発現上昇が認められた。ATF-4 および CHOP は共に MCAO 後の早期に梗塞領域下（特に梗塞周辺領域である大脳皮質）で上昇したが、明らかな形態学的変化は見られなかった（データ未提示）。

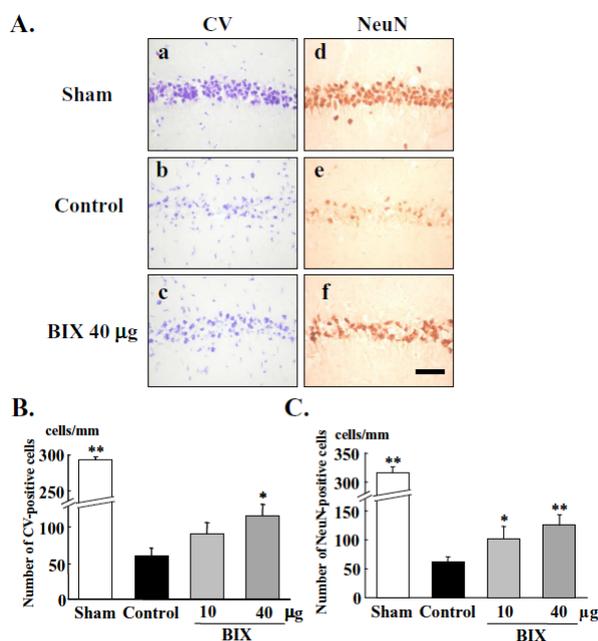
### 3. 脳虚血後神経細胞障害に対する分子シャペロン選択的誘導薬の保護作用

砂ネズミ前脳虚血誘発海馬 CA1 野選択的神経細胞障害に対する BIX の保護作用

脳虚血時には多くのアポトーシス関連遺伝子の発現や誘導を認めることが報告されており、これらの遺伝子を制御することにより、神経細胞を虚血から保護することも可能と考えられ、今後の新たな脳保護療法として開発されることが期待される。小胞体ストレスに対し防御機構を高める薬剤が新しい治療薬となり得ると考えられたことから、BiP の選択的誘導薬である BIX の神経細胞保護作用を検討した。

砂ネズミの両側総頸動脈を杉田式クリップで 5 分間結紮して選択的神経細胞死を誘発した。BIX は 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、脳定位固定装置（Narishige）を用いて、虚血 30 分前に 10  $\mu$ g/5  $\mu$ l および 40  $\mu$ g/5  $\mu$ l 宛投

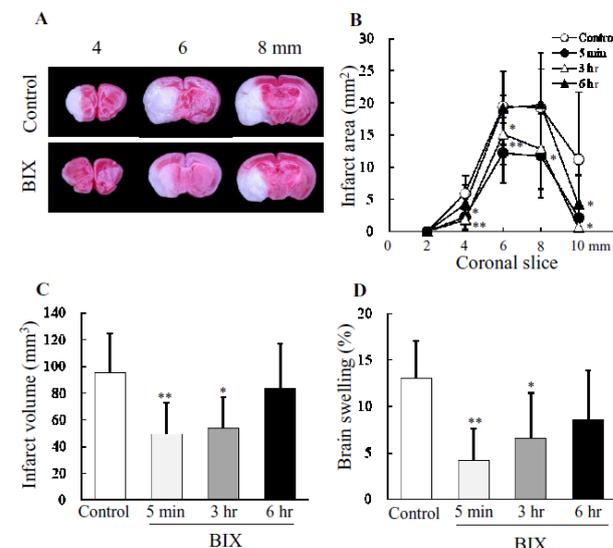
与した。Control 群には 10% DMSO のみを投与した。投与部位は、Paxinos and Franklin (Elsevier Science) の脳図譜に従って右側脳室内 (posterior to bregma: 0.6 mm; lateral to midline: 1.2 mm; into the dural surface: 2.0 mm) にカニューレを介して 2 分間かけて投与した。カニューレは投与後、そのままの状態です 3 分間保持した。砂ネズミを虚血 7 日後に pentobarbital 麻酔し、4% paraformaldehyde 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を左心室内に注入して灌流固定 (灌流圧 130 cm H<sub>2</sub>O) し免疫染色に用いた。その結果、溶媒投与群において虚血 7 日後にほとんどの海馬 CA1 野錐体細胞が細胞死を起こした。BIX 40 μg 脳室内投与により、虚血後の神経細胞死を抑制した (Fig. 6)。



**Fig. 6 Histological analysis of hippocampus after ischemia in gerbil**  
 (A) Representative photomicrographs of CV-positive and NeuN-positive cells in the hippocampal CA1. Scale bar = 50 μm. (B) Quantitative analysis of CV-positive cells in hippocampal CA1. (C) Quantitative analysis of NeuN-positive cells in hippocampal CA1. Values are expressed as the mean ± S.E. (n = 5 - 8). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 vs. control. CV, cresyl violet; NeuN, neuronal nuclei. The result was cited from ref 11.

マウス中大脳動脈永久閉塞誘発神経細胞障害に対する **BIX の therapeutic time window**: これまでの臨床試験成績から、虚血性脳血管障害の血栓溶解療法の therapeutic time window は側副血行の発達具合にもよるが、虚血発症後 3 時間以内と考えられている。そこで、永久閉塞における虚血周辺 (ペナンプラ) 領域の保護とその therapeutic time window を見出すことを目的として、BIX の虚血後投与における検討を MCAO モデルを用いて行った。  
 左脳側中大脳動脈の閉塞はフィラメント栓子を挿入することにより行った<sup>8,9)</sup>。すなわち、実体顕微鏡下、左脳側中大脳動脈を頸動脈から silicone resin 混合物

(Xantopren+ Activator Liquid) で先端を覆った 8-0 ナイロンモノフィラメント (Ethicon, Somerville, NJ, USA) を挿入し閉塞した。BIX は 10% DMSO に溶解し、MCAO 5 分、3 時間および 6 時間後に 20 μg/2 μl 宛投与した。Control 群には 10% DMSO のみを投与した。投与部位は、Paxinos and Franklin (Elsevier Science) の脳図譜に従って右側脳室内 (posterior to bregma: 0.1 mm; lateral to midline: 0.9 mm; into the dural surface: 2.0 mm) に 2 分間かけて投与した。MCAO 1 日後に断頭し、mouse brain matrix (RBM-2000C, Activational Systems, Warren, MI, USA) を用いて前脳を 2 mm の厚さで 5 切片作成し、その断片を 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) で 10-15 分間染色した。梗塞部位はデジタルカメラ (Nikon Cool PIX4500) を用いて記録し、Image J を用いて梗塞面積を測定し梗塞体積を計算した。脳浮腫は次の公式 (infarct volume + ipsilateral undamaged volume - contra lateral volume) × 100/contralateral volume (%) によって算出した<sup>9)</sup>。MCAO 1 日後において、BIX は MCAO 5 分および 3 時間後投与で梗塞体積および脳浮腫を抑制した。MCAO 6 時間後投与では抑制する傾向が認められたが、有意ではなかった (Fig. 7)。



**Fig. 7 Effects of BIX administered after ischemia on a therapeutic window after MCAO in mice**  
 (A) TTC staining of coronal brain sections (2 mm thick) at 1 day after permanent MCAO in representative mice. Upper panels, vehicle-injected (control) mice. Lower panels, BIX (intracerebroventricular injection at 20 μg)-treated mice. (B) Brain infarct area measured at 1 day after MCAO. Brains were removed and the forebrains sliced into five coronal 2 mm sections. \* P < 0.05; \*\* P < 0.01 vs. control (n = 7 - 11). (C and D) Effects of BIX on infarct volume and brain swelling (measured at 1 day after MCAO). Values are expressed as the mean ± S.D. (n = 7 - 11). \* P < 0.05; \*\* P < 0.01 vs. control. MCAO, middle cerebral artery occlusion. The result was cited from ref 12.

#### 4. 考 察

砂ネズミ前脳虚血誘発選択的神経細胞障害における小胞体ストレスの関与について検討を行った。その結果、砂ネズミ前脳虚血による海馬 CA1 野の選択的神経細胞死の機序において、小胞体ストレスの関与が示唆された。砂ネズミ前脳虚血モデルにおいて、分子シャペロン BiP の発現は、正常状態においてはいずれも低レベルであったのに対し、海馬 CA1 野錐体細胞において虚血 12 時間および 1 日後で、海馬 CA3 野では虚血 1 日および 3 日後で上昇していた。一方、歯状回および大脳皮質においては、脳虚血後 BiP の明らかな発現上昇は認められなかった (Fig. 2)。また、BiP の発現はウェスタンブロット解析を用いても検討を行ったが、免疫染色と同様に、海馬 CA1 野において虚血 12 時間後から発現が上昇し始め、虚血 3 日後で最大となった。海馬 CA3 野においては、虚血 1 日後のみ発現が上昇した。歯状回および大脳皮質においては、脳虚血後発現上昇は認められなかった (Fig. 3)。虚血による神経細胞死が起こらない早期に BiP の上昇が海馬 CA1 野において選択的に認められたことは免疫染色およびウェスタンブロットにおいても同様であったが、神経細胞死が起こった後の発現に違いが認められた。虚血後期では、アストロサイトにおいて一部その発現が認められた (データ未提示) ことから、虚血に耐性を示すアストロサイトなどでも小胞体ストレス応答が認められ、小胞体ストレスに対して防御機構を働かせていることが示唆された。

CHOP は通常の状態では発現しておらず、小胞体ストレスによって著明に誘導される。CHOP を欠損した細胞では小胞体ストレス誘導性アポトーシスが抑制される<sup>13, 14, 15)</sup>。本検討では、選択的神経細胞死への関与として、ATF-4 および CHOP をそれぞれ免疫組織学的検討およびウェスタンブロット解析にて検討を行った。海馬 CA1 野における ATF-4 および CHOP 発現の時間経過は、虚血による形態学的変化と一致したことから、虚血早期からの著明な小胞体ストレスの負荷による防御機構の破綻によりアポトーシスシグナルが虚血 1 日後を境界として活性化されたと考えられる。

临床上、一過性脳虚血よりも永久脳虚血の方が高頻度に発症する。さらに、脳卒中周辺領域における小胞体ストレスの役割については未だ十分に解明されていない。また、これまでの研究においてもその多くが脳虚血再灌流モデルで検討されている。そこで、次にマウス中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて、永久閉塞誘発神経細胞死における小胞体ストレスの関与について検討を行った。その結果、BiP 発現は MCAO 12 時間後から 1 日後で最大に達し、3 日後には正常値にまで戻ること、並びに小胞体ストレス

の発現は中心領域 (主に線条体) よりも周辺領域 (主に大脳皮質) で強いことを明らかにした (Figs. 4, 5)。

これまでの脳虚血再灌流後の小胞体ストレスの関与は、1) BiP mRNA は 30 分間虚血再灌流 6 時間後から 24 時間後にかけて上昇した<sup>16)</sup>、2) 1 時間虚血再灌流後 MCA 領域下において BiP タンパク質は虚血 5 時間後から 23 時間後にかけて上昇し、47 時間後には減少した<sup>17)</sup>、そして 3) 30 分間虚血再灌流 4 時間後から 24 時間後にかけて線条体において ATF-4 および CHOP タンパク質の上昇がみられた<sup>18)</sup>、などの報告がある。今回の検討ではこれらの先行研究の報告と比較すると、BiP および CHOP タンパク質発現においては同様の発現変化を示すが、ATF-4 タンパク質発現は異なる変化を示した。この実験結果の一部の矛盾は、おそらく虚血モデル (再灌流モデル vs. 永久閉塞モデル) の違いによると考えられる。再灌流モデルと比較して、永久閉塞モデルでは特に線条体において血流の極端な低下が続く。中心領域における上記小胞体ストレスマーカーの発現レベルは再灌流モデルよりも永久閉塞モデルにおいて少ないと考えられる。以上、小胞体ストレスは永久脳虚血障害に重要な役割を果たしており、その関与は虚血中心 (コア) 領域よりも周辺 (ペナンプラ) 領域において強いと考えられる。

UPR は PERK や IRE1 により調整され、BiP は小胞体内の不良タンパク質に結合し、小胞体トランスデューサーの活性化を調節する<sup>19)</sup>。正常時では、BiP は PERK や IRE1 の luminal domain に結合し、これらの活性化を抑制する。小胞体ストレス時には、BiP は不良タンパク質に結合するため PERK や IRE1 から解離し、その結果これらのトランスデューサーが活性化されやすくなる。BiP は小胞体ストレスにより誘導され、その上昇によって神経損傷を防ぐことが示唆されていることから<sup>20, 21, 22)</sup>、BiP の発現上昇は神経保護と相関して発現する可能性が示唆された。それ故、UPR を制御することが脳虚血による細胞保護に有効である可能性が考えられる。

現在、脳卒中患者に種々の薬物療法が試みられているが、十分に有効性が認められる薬物は見い出されていないのが現状である。そこで、本検討では、小胞体ストレスに対し防御機構を高める薬剤が新しい治療薬となり得ると考えられたことから、砂ネズミ前脳虚血モデルを用いて、BiP の選択的誘導薬である BIX の保護作用について検討した。その結果、BIX は形態学的検討および免疫組織学的検討において、一過性脳虚血による神経細胞死に対して虚血 30 分前に投与することで保護効果を示した (Fig. 6)。さらに、永久閉塞における虚血周辺領域の保護とその therapeutic time window を見出すことを目的として、BIX の虚血後投与における検討を MCAO モデルを用いて行った。その結果、BIX は永久閉塞による神経細胞死に対して、虚血 3 時間後投与まで梗塞体積および脳浮腫を抑制した

(Fig. 7)。我々の研究から、ヒト神経芽細胞腫である SK-N-SH 細胞において、BiP mRNA は BIX 5  $\mu$ M 添加後より徐々に上昇し、4 時間後に最大に達し、6 時間後までその発現レベルは維持されることが認められている<sup>4)</sup>。同様に、BiP タンパク質の発現レベルは BIX 5  $\mu$ M 添加後より 12 時間まで上昇することが認められている。MCAO モデルを用いた検討により、BiP タンパク質は MCAO 1 日後まで上昇することが明らかにされたことから、虚血後早期に BIX を投与することで小胞体ストレスに対し保護作用を示した可能性が考えられる。

これまでの研究から BIX は、1  $\mu$ M から 50  $\mu$ M にかけて濃度依存的に BiP mRNA を誘導することが認められ、また、BiP 以外のシグナル (XBP-1 のスプライシング、CHOP など) は誘導せず、小胞体ストレスを負荷しないことが知られている<sup>4)</sup>。また、SK-N-SH 細胞を用いた検討において、tunicamycin による細胞死を BIX は 5  $\mu$ M で抑制し、50  $\mu$ M の高用量を用いた検討においても ATF6 経路以外による BiP mRNA の誘導は認められていない<sup>4)</sup>。これらの結果から、BIX による BiP 誘導のメカニズムは他の小胞体ストレス誘導薬 (thapsigargin や tunicamycin など) によるそれとは異なるものであることが示唆される。また、小胞体ストレストランスデューサーの活性化は、PERK や IRE1 の luminal domain から BiP が解離することによって引き起こされることから、BIX による BiP の薬物的な誘導により、豊富な BiP が小胞体ストレストランスデューサーに結合することで、これらの活性化が抑制されると考えられる。

高等動物においては、少なくとも 4 種類の UPR が存在するが、Yoshida らは、これらの応答機構が時間的に規定されていると報告している<sup>23)</sup>。PERK による翻訳抑制機構の解除は、GADD34 と PP1c の働きによって行われる。また、ATF6 経路によるシャペロン遺伝子の転写誘導が IRE1-XBP1 経路による EDEM の転写誘導よりも早く起こる。さらに、小胞体ストレスによるアポトーシスは EDEM の転写誘導よりもかなり遅れて起こる。これらのことから、小胞体ストレスの初期には、1) 翻訳が一時的に抑制され、既存のシャペロン、ERAD 因子による処理が試みられる。それでも異常タンパク質を処理できない時には、2) 小胞体シャペロンが誘導されてフォールディングを促進する。また、3) ERAD 因子が誘導されてフォールディングだけでなく分解も促進される。これらの応答機構によっても処理できない場合には、4) アポトーシスが誘導されて細胞ごと処理を行う。このような多段階の防御機構が高等生物には備わっていると考えられている。また、小胞体膜上の複数のセンサータンパク質が、個別の応答機構を特異的に制御することによって、時系的な多段階応答を可能にしていると考えられている。

以上、BIX による虚血に対する保護作用は、BIX によ

って虚血前あるいは虚血後早期に BiP を誘導しておくことで、虚血によって引き起こされるストレスに対する防御機構が働いたことによると考えられる。

## 5. 結 論

砂ネズミ前脳虚血モデルにおいて、海馬 CA1 野錐体細胞において虚血早期より BiP の発現上昇が認められた。また、マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおいて、虚血中心領域である線条体および周辺領域の大脳皮質において BiP の発現上昇が認められ、周辺領域における発現レベルは中心領域におけるそれよりも高値であった。さらに、BiP の選択的誘導薬は、一過性虚血後の海馬 CA1 野錐体細胞の神経細胞死を抑制し、永久虚血後の therapeutic time window は 3 時間であった。以上より、砂ネズミ前脳虚血誘発海馬 CA1 野選択的神経細胞死およびマウス中大脳動脈永久閉塞誘発神経細胞死の機序には、小胞体ストレスの関与、すなわち小胞体ストレス誘導性アポトーシスの関与が示唆された。また、BiP の選択的誘導薬は神経細胞保護作用を有する新規な脳虚血治療薬の候補となる可能性が示唆された。

## 6. 謝 辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇切なるご助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤 雅光先生並びに同助教 鶴間 一寛先生に深謝致します。また、種々のご協力を頂きました薬効解析学研究室 守本 亘孝氏に心から感謝致します。最後に、BIX の御提供並びに貴重な御助言を賜りました大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室 工藤 喬臨床教授並びに広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子細胞情報学 今泉 和則教授に深謝致します。

## 7. 参考文献

- 1) Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *MOLCULAR BIOLOGY OF THE CELL* fourth edition. Garland Science, 689-710 (2002).
- 2) Ferri K.F., Kroemer G., *Nat. Cell Biol.*, **3**, E255-63 (2001).
- 3) Fawcett D.W., *The Cell*. W.B. Saunders Company, 318-319 (1981).
- 4) Kudo T., Kanemoto S., Hara H., Morimoto N., Morihara T., Kimura R., Tabira T., Imaizumi K., Takeda M., *Cell Death Differ.*, **15**, 364-375 (2008).
- 5) Kirino T., *Brain Res.*, **239**, 57-69 (1982).
- 6) Pulsinelli W.A., Brierley J.B., Plum F., *Ann Neurol.*, **11**, 491-498 (1982).
- 7) Oida Y., Shimazawa M., Imaizumi K., Hara H.,

- Neuroscience*, **151**, 111-119 (2008).
- 8) Hara H., Huang P.L., Panahian N., Fishman M.C., Moskowitz M.A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 605-611 (1996).
  - 9) Hara H., Friedlander R.M., Gagliardini V., Ayata C., Fink K., Huang Z., Shimizu-Sasamata M., Yuan J., Moskowitz M.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2007-2012 (1997).
  - 10) Morimoto N., Oida Y., Shimazawa M., Miura M., Kudo T., Imaizumi K., Hara H., *Neuroscience*, **147**, 957-967 (2007).
  - 11) Oida Y., Izuta H., Oyagi A., Shimazawa M., Kudo T., Imaizumi K., Hara H., *Brain Research*, **1208**, 217-224 (2008).
  - 12) Oida Y., Hamanaka J., Hyakkoku K., Shimazawa M., Kudo T., Imaizumi K., Yasuda T., Hara H., *Neuroscience Letters*, **484**, 43-46 (2010).
  - 13) Zinszner H., Kuroda M., Wang X., Batchvarova N., Lightfoot R.T., Remotti H., Stevens J.L., Ron D., *Genes Dev.*, **12**, 982-995 (1988).
  - 14) Oyadomari S., Takeda K., Takiguchi M., Gotoh T., Matsumoto M., Wada I., Akira S., Araki E., Mori M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10845-10850 (2001).
  - 15) Gotoh T., Oyadomari S., Mori K., Mori M., *J. Biol. Chem.*, **277**, 12343-12350 (2002).
  - 16) Qi X., Okuma Y., Hosoi T., Kaneko M., Nomura Y., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **130**, 30-38 (2004).
  - 17) Shibata M., Hattori H., Sasaki T., Gotoh J., Hamada J., Fukuuchi Y., *Neuroscience*, **118**, 491-499 (2003).
  - 18) Hayashi T., Saito A., Okuno S., Ferrand-Drake M., Dodd R.L., Chan P.H., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **25**, 41-53 (2005).
  - 19) Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L.M., Harding H.P., Ron D., *Nat. Cell Biol.*, **2**, 326-332 (2000).
  - 20) Wang X.Z., Lawson B., Brewer J.W., Zinszner H., Sanjay A., Mi L.J., Boorstein R., Kreibich G., Hendershot L.M., Ron D., *Mol. Cell Biol.*, **16**, 4273-42808 (1996).
  - 21) Rao R.V., Peel A., Logvinova A., del Rio G., Hermel E., Yokota T., Goldsmith P.C., Ellerby L.M., Ellerby H.M., Bredesen D.E., *FEBS Lett.*, **514**, 122-128 (2002).
  - 22) Reddy R.K., Mao C., Baumeister P., Austin R.C., Kaufman R.J., Lee A.S., *J. Biol. Chem.*, **278**, 20915-20924 (2003).
  - 23) Yoshida H., Matsui T., Hoshokawa N., Kaufman R.J., Nagata K., Mori K., *Dev. Cell*, **4**, 265-271 (2003).

## 8. 特記事項

本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第 337 号）の内容を中心にまとめたものである。