分子生物学からみた therapeutic window

桐野 高明

Therapeutic Window: From the Standpoint of Molecular Biology

Takaaki KIRINO, M.D.

Department of Neurosurgery, University of Tokyo, School of Medicine, Tokyo, Japan

Summary: Cerebral ischemia has a relatively simple cause: occlusion of supplying blood vessels. The best treatment, therefore, is to remove the cause. If cerebral blood flow is restored within a short time, the brain is not damaged. The recent advent of thrombolytic agents such as t-PA enabled us to attain this therapeutic goal. This mode of treatment, however, is not always possible, because there is a time window during which therapy must be administered. It is well established that ischemic brain damage depends to a great extent on the duration and degree of flow reduction. If flow reduction is mild or ischemic period lasts only a few hours, patients are likely to recover. What happens when flow reduction is not mild or the duration of ischemia is longer? Ischemia, then, causes irreversible brain damage. To counter this problem, the mechanisms of ischemic brain damage have been investigated for many years, yet they still remain unknown. Glutamate has been postulated as one of the major causes of neuronal vulnerability to ischemia. Indeed, extensive evidence has been accumulated that supports this hypothesis, but anti-glutamatergic drugs have been largely unsuccessful. Recent experiments in this field have been done on the hypothesis that at least a part of ischemic brain damage progresses through apoptosis. When apoptosis is used to mean a cell death process that requires gene expression, it is quite possible that this is the case. Downstream to the main cascade of apoptosis, mitochondria are now believed to play a pivotal role. Loss of mitochondrial membrane potential and leakage of pro-apoptotic substances from the mitochondria are essential steps in apoptosis. On the other hand, loss of ATP and breakdown of mitochondrial energy metabolism are well-known characteristics of classic ischemic necrosis. Investigation of mitochondrial alteration will be the most important goal in elucidating ischemic brain damage in the next several years.

Key words:

- therapeutic window
- from the standpoint of molecular biology

Surg Cereb Stroke
(Jpn) 27: 81-84, 1999

はじめに

脳虚血は脳を流れる血流が不足するために発生する疾患であって、原因そのものを除去することが直接的で最も有効な治療法である。脳組織は虚血に対して脆弱ではあるが、虚血がきわめて短時間に終結するならば、脳はびくと

もしないのである。近年、分子生物学の進歩により、リコンビナントの t-PA が使えるようになり、欧米での臨床試験によって有効性が証明されたこと¹⁾、血管内外科の技術の発展により直接閉塞部を再開通する方法が開発されたことなどにより、虚血を短時間のうちに終わらせる治療法が現実のものとなってきた。脳虚血治療の悲観論の時代は終

東京大学医学部 脳神経外科(受稿日 1998. 10. 6) [連絡先: 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部 脳神経外科 桐野高明] [Mailing address: Takaaki KIRINO, M.D., Department of Neurosurgery, University of Tokyo, School of Medicine, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan]

わりつつある。そこで問題となるのは、ではどの程度短時間のうちであれば脳組織は治療可能な状態を保っているかである。脳虚血は本質的に破壊性であるので、一定の治療可能時間を越えると組織傷害は非可逆性となる。この治療可能時間のことを therapeutic window と呼ぶ。脳組織がなぜ虚血に対して脆弱であり、虚血がなぜ神経細胞を殺すかという問題については、特に 1980 年代からの研究が大きく寄与してしてきた。1990 年代に入るところから、最新の分子生物学的手法を用いてこの問題に取り組もうとする動きもさかんになってきている。残念ながら、このような研究成果が問題の全容を解明するところまでには至っていないが、therapeutic window をどのようにとらえられるかについてはわかってきたことも少なくない。

脳虚血の血流・時間依存性

脳の血流低下の程度とその持続時間が及ぼす組織傷害の程度に関しては、すでに 1980 年代のはじめにはよく理解されるようになっていた。脳の血流値が 20 ml/100 g/min 以下に下がると正常の電気的活動が停止し (electric failure)、大脳皮質の誘発電位が測定不能となる。さらに血流が低下して 15 ml/100 g/min より低くなると、膜内外のイオン平衡が保持できなくなって (membrane failure) 脱分極が起き、神経細胞は不可逆的に障害される。もし上記の二つの閾値の間に血流量が保たれれば、その領域の神経活動は停止するものの組織破壊は起きない状態におかれる (血流の具体的な値は一応の目安である)。このような領域 (penumbra) はごくわずかな血流の改善により神経機能を回復できる³⁾。脳の組織傷害は虚血の持続時間にも強く依存する。いかに血流が低下しても、虚血が短時間のうちに終われば脳は壊されない。虚血による組織破壊は時間とともに進行し、3 時間を過ぎたところですべての運命が決定される。すなわち membrane failure に陥った組織は梗塞となり、penumbra の組織は梗塞とはならないが機能は喪失したままである¹¹⁾。以上が脳血流値と脳の組織学的破壊を関連させた動物実験の結果である。実験はサルを用いて行われたものであり、十分信頼できるものであるが、後に少し修正された。それは penumbra の運命についてである。penumbra にある脳組織はけっして長時間そのままにとどまることはなく、比較的すみやかに梗塞に陥っていく⁸⁾。この時間経過がどの程度であるのかは不明であるが、3+ 数時間程度であるとみなされる。

われわれの体を構成する細胞はすべて好氣的代謝を営んでおり、虚血にさらされると早晩機能障害を呈する。脳は機能障害を呈する時期から間もなく構造破壊 (つまり梗塞) に至るきわめて脆弱な組織である点が重要である。脳の血流値の測定による研究からは、虚血によって梗塞に陥る組

織を治療することのできる therapeutic window は 3 時間であるといえる。もちろん、penumbra 領域はさらに長い間虚血に耐える可能性はあるが、実は penumbra は単に電気的活動を停止した static な状態ではなく、脱分極 (spreading depression) を繰り返す進行性の病態であり、長時間その状態にとどまることはできないことが明らかになってきている¹⁰⁾。

グルタミン酸・カルシウム説

虚血による脳の破壊が血流値と持続時間に強く依存する現象は、脳 (特に神経細胞) の虚血に対する脆弱性に起因している。したがって、もしこの脆弱性の機構が解明されて有効な保護療法が開発できれば、治療可能な時間は延長できる。なぜ神経細胞が虚血に対して驚くほど脆弱なのかという疑問を巡って、現在支持されている仮説はグルタミン酸・カルシウム説である⁵⁾。脳は正常の状態では細胞内外のイオン濃度や神経伝達物質の濃度の勾配を支えている。脳の全エネルギー消費の 70-80% はこの膜内外の物質勾配を維持するために用いられているともいわれる。ひとたび脳虚血になり、細胞内の ATP が枯渇すると、すみやかに膜内外のイオン平衡は失われ始め、膜の脱分極が起きて、各種の神経伝達物質は細胞外に放出される。この中で特にグルタミン酸は重要である。大脳の興奮性神経伝達の 80% はグルタミン酸によって担われ、ほとんどの神経細胞の膜表面には多数のグルタミン酸受容体があり、その中でも NMDA 型の受容体は Ca^{2+} 透過性のイオンチャンネルを持っている。グルタミン酸が細胞外に増加し、NMDA 型受容体を介して細胞内に Ca^{2+} が流入すると、これが神経細胞死の引き金になる。神経細胞の Ca^{2+} を流入させやすい性質が虚血に対する脆弱性の原因である。以上がグルタミン酸・カルシウム説の要約である。確かに Rasmussen 症候群²²⁾ や glutamate transporter のノックアウト動物²⁵⁾ などでは、虚血の場合と類似した神経細胞の脱落が発生する。このことも、グルタミン酸神経伝達に異常をきたした場合に神経細胞がそれに耐えられないことを示唆している。以上の仮説に立って、グルタミン酸受容体の拮抗剤など、薬剤の脳保護効果が試されてきた^{16) 17) 23)}。しかし、副作用の問題が大きく、臨床応用の段階までには達していない。動物実験のレベルでは、いくつかの薬剤は確実に脳保護作用がある。ただし、どの薬剤も虚血の直後に投与しなければ効果を示すことはできない。例外的に 1 日後の投与で効果ありと報告されたものもあるが、その後の追試では再現されていないものがほとんどである。薬剤効果でみる限り、血流再開後に有効性を発揮できるのは 1 時間が限度ではないかと思われる。しかし、虚血後の長時間の mild hypothermia が有効であるとする報告もあ

り⁷⁾²⁰⁾ 確定的ではない。

脳虚血とアポトーシス

しかし、事実は単純ではない。一過性の虚血により細胞外のグルタミン酸は増加し、確かに細胞内に Ca^{2+} が流入するが、すみやかに細胞の構造破壊(細胞死)が起きるわけではない。この後の細胞死のカスケードは十分解明されていない。単純で受動的な細胞の死すなわち壊死(necrosis)ではない細胞死が虚血に引き続いて発生することは確実である⁶⁾。ごく短時間の脳虚血を加えると脳は一時的に耐久性(ischemic tolerance)を獲得する¹³⁾¹⁴⁾。耐久性となった脳に虚血を加えると、虚血自体には差がなくとも神経細胞の死は防護される。このような現象は虚血性神経細胞死が虚血の強度と持続時間のみで決定されるものではないことを示している。虚血の後神経細胞には耐性誘導の原因と想定される種々の遺伝子が発現する¹⁵⁾。このことも虚血後に神経細胞の生死をめぐる細胞応答が進行し、その結果の一部として細胞死が起きている可能性を強く示している。

グルタミン酸・カルシウムによる初期の神経細胞障害に引き続いて細胞の死に至る機構もよくわかっていない。最近比較的注目されている仮説は虚血性神経細胞死のアポトーシス説である⁶⁾¹⁸⁾。アポトーシスは本来正常の発生、形態形成、免疫系の成熟の過程で発揮される細胞の自殺機構であり、多細胞生物が個体を維持するためには必須の機能であるとされている。しかし、アポトーシスが最初に肝臓の循環障害においてみつけたように、病的な状態においても少なからず起きており、肝・腎・心虚血ではアポトーシスが組織破壊の一部を担っていることはほぼ確定している¹²⁾²⁶⁾。

神経細胞のアポトーシスのカスケードの一部についてはこの数年かなり解明されてきた²¹⁾。細胞が細胞死のシグナルを受けると、ミトコンドリア膜に存在するBaxなどの膜蛋白が透過性を増し、ミトコンドリア内からcytochrome Cが細胞質に流出するとともに、ミトコンドリアの膜電位が消失し、多量のラジカルが発生し始める。この段階に達すると細胞内のICE familyの蛋白分解酵素(caspase)が次々に活性化され、最終的にDNAを切断する酵素が活性化されて細胞は死に至る。以上がアポトーシスの機構の現時点における概略である。ひるがえって脳虚血の場合に以上の機構が実際に動いているかという疑問が検証の対象となる。これまで、アポトーシスに関連するp53, bcl-2 family, ICE(caspase), NAIP, PARPなどの解析では、確かに脳虚血の際の神経細胞においても、他の細胞のアポトーシスと同様の挙動を示すことが多数報告されている。ただし、ではこのアポトーシスのどのステップ

に到達すると細胞は可逆性(治療可能性)を失うのかは明らかにされていない。

ミトコンドリアとラジカル障害

アポトーシスの機構が次々に解明されるにつれ、ミトコンドリアがその主要な舞台であることが明らかになってきた²¹⁾²⁹⁾。ここで興味深いのはcyclosporin A²⁷⁾、FK506⁴⁾²⁴⁾などの免疫抑制剤が脳保護効果を示したとする報告である。これらの薬剤は蛋白脱リン酸化酵素 calcineurin を抑制することにより効果を発揮すると考えられているが、別の見解もある。ミトコンドリアがアポトーシスの主要な舞台であり、ミトコンドリアの膜電位が消失することがアポトーシスの引き金になると理解されるようになったことは前述のとおりである。免疫抑制剤はミトコンドリア膜の permeability transition pore を塞ぐ作用があり、このことが脳保護作用を示す主因ではないかという仮説が提唱されているのである¹⁹⁾。

脳虚血の伴う酸素分圧の低下と血流再開に伴う急激な再上昇がラジカル産生の格好の条件となる。しかし、ラジカル障害が役割を果たすと考えられるステップは虚血中や血流再開直後より、やや後方にずれてきているように思われる。第一には細胞内に Ca^{2+} が流入することにより活性化されるNO産生酵素(NOS)の役割である。結果として大量に生み出されるNOはperoxynitrite となってラジカル障害を加速する⁹⁾。さらに、ミトコンドリア膜の電位が消失するとミトコンドリアの電子伝達系からは大量のラジカルが発生して、細胞を破壊に導く可能性がある。このように理解されるようになったラジカル説であるが、それがどこに細胞を不可逆的に壊すポイントを持っているのかは解明されていない。しかし、少なくともミトコンドリアの膜電位が失われる時点以降には治療可能性は少ないものと考えられ、やはり治療可能域は比較的短いものと考えなければならぬであろう。

Therapeutic Window

以上の要約から推論すると、脳虚血による脳の組織破壊を多少なりとも血栓溶解などの血流再開療法によって治療できる時間域(recirculation window)は3時間程度と考えるのが妥当である。もちろん、血流低下がきわめて軽度であれば、それより長く治療可能域は存在すると考えられるが、大部分の局所脳虚血はこのように考えて治療する必要がある。また、脳保護療法が臨床応用可能になったとしても、血流再開後に進行する神経細胞死が長時間可逆性を保持しながら進行するとは考えられない。楽観的に考えることや、ごく一部の逸話的症例から判断することは避けるべきであろう。多数の動物実験の結果から判断すると、血流

再開後1時間程度が脳保護療法の治療可能域(protection window)であろうと考えられる。脳虚血はきわめて破壊的である。根拠のない楽観的な見通しは適切ではないと考える²⁾²⁸⁾。

文 献

- 1) Anonymous: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* **333**: 1581-1587, 1995
- 2) Anonymous: Neuroprotection as initial therapy in acute stroke. Third Report of an Ad Hoc Consensus Group Meeting. The European Ad Hoc Consensus Group. *Cerebrovasc Dis* **8**: 59-72, 1998
- 3) Astrup J, Siesjö B, Symon L: Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra. *Stroke* **12**: 723-725, 1981
- 4) Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, *et al*: Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *J Neurosci* **17**: 6939-6946, 1997
- 5) Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**: 623-634, 1988
- 6) Choi DW: Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Current Opinion in Neurobiology* **6**: 667-672, 1996
- 7) Colbourne F, Corbett D: Delayed postischemic hypothermia: A six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J Neurosci* **15**: 7250-7260, 1995
- 8) Hossmann KA: Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* **36**: 557-565, 1994
- 9) Iadecola C: Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* **20**: 132-139, 1997
- 10) Iijima T, Mies G, Hossmann K-A: Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **12**: 727-733, 1992
- 11) Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, *et al*: Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* **54**: 773-782, 1981
- 12) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257, 1972
- 13) Kirino T, Tsujita Y, Tamura A: Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**: 299-307, 1991
- 14) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, *et al*: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* **528**: 21-24, 1990
- 15) Koistinaho J, Hokfelt T: Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* **8**: i-viii, 1997
- 16) Koroshetz WJ, Moskowitz MA: Emerging treatments for stroke in humans. *Trends Pharmacol Sci* **17**: 227-233, 1996
- 17) Lipton SA, Rosenberg PA: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **330**: 613-622, 1994
- 18) MacManus JP, Linnik MD: Gene expression induced by cerebral ischemia: An apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 815-832, 1997
- 19) Nakai A, Kuroda S, Kristian T, *et al*: The immunosuppressant drug FK506 ameliorates secondary mitochondrial dysfunction following transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurobiol Dis* **4**: 288-300, 1997
- 20) Nurse S, Corbett D: Neuroprotection after several days of mild, durg-induced hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**: 474-480, 1996
- 21) Pettmann B, Henderson CE: Neuronal Cell Death. *Neuron* **20**: 633-647, 1998
- 22) Rogers SW, Andrews PI, Gahring LC, *et al*: Autoantibodies to glutamate receptor GluR3 in Rasmussen's encephalitis. *Science* **265**: 648-651, 1994
- 23) Schehr RS: New treatments for acute stroke. *Nature Biotechnol* **14**: 1549-1554, 1996
- 24) Sharkey J, Butcher P: Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischemia. *Nature* **371**: 336-339, 1994
- 25) Tanaka K, Watase K, Manabe T, *et al*: Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**: 1699-1702, 1997
- 26) Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462, 1995
- 27) Uchino H, Elmer E, Uchino K, *et al*: Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischaemia in the rat. *Acta Physiol Scand* **155**: 469-471, 1995
- 28) Wardlaw JM, Warlow CP, Counsell C: Systematic review of evidence on thrombolytic therapy for acute ischaemic stroke. *Lancet* **350**: 607-614, 1997
- 29) Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, *et al*: Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* **29**: 185-193, 1997