イメージングによる脳蘇生・神経細胞死の病態解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 清二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2404

特別講演 2

イメージングによる脳蘇生・神経細胞死の病態解析

[1]浜松医科大学光量子医学研究センター
山本 清二[1]

脳は重さが体重の 2.5%しかないにも関わらず、全身の 15%の血液が流れ、全身の酸素の 20%を消費する。しかも脳にはエネルギー源の蓄えがなく、脳血流の途絶すなわち脳虚血は、たとえ短時間であっても脳に致命的な障害をもたらす。脳浮腫による頭蓋内圧亢進も結果的に脳虚血をもたらし、心停止や脳血管閉塞だけでなく、脳は直接損傷を受ける場合を除いて虚血で死滅すると言っても過言ではない。さらに、脳血管障害は日本人の死因の第 3 位に下がってはいるものの、高齢化にともなって患者は増え続け、2020 年に 287 万 7000 人でピークとなり、介護が必要となる患者は 2025 年に 177 万 5000 人（2005 年比 17 万人増）となると試算されている。すなわち、虚血性脳損傷は治療上極めて重要な疾患である。

脳には、神経細胞、神経膠細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などいくつかの細胞があるが、神経細胞は最も虚血に対して脆弱で、その障害は神経脱落症状となって現れる。我々は“なぜ神経細胞は虚血に対して弱いのか”という問いに対する答えを求めて、live Cell Imaging という手法により研究を行ってきた。今回はその研究を紹介し、蘇生学を専門とする先生方のご批判・ご意見をいただきたい。

1．培養細胞による検討

脳虚血に対して最も脆弱な海馬の神経細胞を生後 1 日齢のラットから初代培養し、微分干渉顕微鏡および共焦点蛍光顕微鏡によりその病態を解析した。脳虚血時に細胞外濃度が上昇し毒性を発揮すると考えられているグルタミン酸を投与し神経細胞死を誘発した。生きている神経細胞を微分干渉顕微鏡で観察しつつグルタミン酸（100 μM－1 mM）を投与すると、容量依存的に約 20 分以内に核内に顆粒構造が出現した。これは早期にグルタミン酸を除去すると可逆的であるが、顆粒が著明となり細胞腫脹が始まると不可逆的でネクローシスに陥った。また、グルタミン酸の一過性投与でも後にアポトーシスに陥り、核内顆粒の出現は神経細胞死の初期変化と考えられた。核内顆粒が出現した細胞を顕微鏡下にマイクロピペットで採取し DNA を抽出、核酸染色後に全反射型（1 分子イメージングが可能な高分解能を持つ照明法）蛍光顕微鏡で観察すると、DNA の断片化が確認できた。すなわち、虚血に脆弱な海馬神経細胞では、高濃度のグルタミン酸投与により極めて早い段階で核 DNA が断片化していることが明らかとなった。

DNA 断片化を来たす分子生物学的メカニズムを明らかにするために、共焦点蛍光顕微鏡により細胞内 Ca^{2+}濃度変化とイノシトール三燐酸（IP_3）のシグナルを検討した。細胞内 Ca^{2+}濃度の変化は蛍光色素により、IP_3はその濃度をモニターできる緑色蛍光蛋白（GFP; Green Fluorescent Protein）をプラスミド導入により発現させて検討した。その結果、IP_3を介して核内 Ca^{2+}濃度が持続的に上昇することによって、核内顆粒が出現、すなわち核 DNA が断片化することが明らかとなった。

2．個体レベルでの検討

細胞内 Ca^{2+}の上昇がグルタミン酸による神経細胞死に重要な役割を果たすことは、培養神経細胞では良く知られたことである。しかし、脳には神経細胞のみならず神経膠細胞や血管および脳血流が存在し、これらが脳循環代謝に大きく影響するため、個体レベルでの検討が必要であり、脳虚血時に果たして本当に細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇しているかは不明である。そこで生体内イメージング法により、心停止モデルに相当するラット一過性前脳虚血時の脳内カルシウム反応を検討した。

SD ラット（300 g）を全麻下に定位脳手術装置に固定し、Ca^{2+}指示薬である fluo-3/AM (440 μM、2.5 μl) を海馬 CA1、海馬 CA3、大脳皮質にそれぞれマイクロインジェクションし、ファイバー共焦点顕微鏡（Fiber-coupled confocal microscope）で蛍光像を観察した。ファイバー共焦点顕微鏡は、直径 4.5 μm のイメージングファイバーを 20,000 本束ね（外径 1.6 mm）、共焦点スキャナ（CSU21, 横河電機）とカップルさせたものでファイバー直下の共焦点像を観察できる（Sakurai T, Yamamoto S, Miyakawa A et al. Proc of SPIE 6088:608803-1-5, 2006）。両側椎骨動脈を閉塞後、顕微鏡下にマウントし両側総頚動脈をバルーンにより閉塞して 10 分間の一過性前脳虚血を負荷した。fluo-3/AM の蛍光強度変化を虚血前、10 分間の虚血中、血流再開後 20 分まで 30 秒ごとに撮影した画像から検討した。

laser-Doppler 血流計で測定した海馬の血流は、4 血管閉塞により約 28.9%まで低下。海馬 CA1 領域では 10 分間の前脳虚血により fluo-3 の蛍光強度は 116%まで上昇、血流再開後も持続的に上昇し、20 分間で 131%に達した。すなわち海馬では虚血中から血流再開後まで持続的に細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇していた。一方、海馬 CA3 と大脳皮質では、4 血管閉塞による脳血流の低下および血流再開後の値は海馬のそれと有意な差が認められなかったにもかかわらず、虚血中に細胞内 Ca^{2+}濃度は上昇するものの血流再開後は持続せず、虚血に脆弱な海馬 CA1 領域と明らかにパターンが異なっていた。この CA1 と CA3 のカルシウム反応の違いは、海馬の培養スライスにおけるグルタミン酸に対する反応でも確認できた。培養細胞の結果と合わせて、虚血後の細胞内 Ca^{2+}濃度の持続的上昇が神経細胞を死に至らしめる元凶であると考えられた。虚血に対して脆弱な海馬 CA1 領

特別講演2

域では、細胞外グルタミン酸濃度が高濃度に維持される可能性があり、ここに神経膠細胞の関与が考えられるが詳細は現時点で不明である。

3．病態解析の手法に関して

神経細胞死のメカニズムの解明を目的に培養細胞で多くの研究がなされ、それに基づいて有効な実験的治療や薬剤が数多く報告された。しかしながら、虚血性神経細胞死に対する治療は、t-PA（組織プラスミノーゲンアクティベータ）の早期投与に代表される血流改善以外に有効な方法がない。培養細胞は脳から取り出すという操作をする以上必ず虚血に暴露されており、それでもなおかつ生存するような環境で培養・維持し研究に用いている。それらの細胞を使った虚血性細胞死のメカニズムの研究は、それ自身無理があると言わざるを得ない。もちろん培養細胞による詳細な解析の重要性を否定するつもりはまったくないが、基礎医学での知見を臨床に生かす、いわゆるtranslational researchを発展させるためにも、個体レベルでの研究が必要であると考える。一方、個体レベルでの病態研究も、虚血によって引き起こされる変化（脳梗塞や細胞死）が軽減したか増悪したかにより、治療効果の判定や病態解析をしているのみで、その間に何が起こっているかが検討されていない。我々は、in situで細胞レベルの知見が得られるようになることを夢見て“Intravital Cell Imaging”による脳の研究法を開発してきた。生体内は光が散乱して鮮明な像が得られずイメージングには困難を極めるが、抄録に記載した以外にもいくつかの観察例を示し、その研究法の可能性について言及したい。（科研費　#16390407、#16047212、#18053010による）

【虚血・脳循環に関する最近の論文】

- Koide M, Nishizawa S, Yamamoto S, et al. Nicotine exposure, mimicked smoking, directly and indirectly enhanced protein kinase C activity in isolated canine basilar artery, resulting in enhancement of arterial contraction. J Cereb Blood Flow Metab, 25:292-301, 2005.
- Matsumoto Y, Yamamoto S, Suzuki Y, et al. Na^+/H^+ exchanger inhibitor, SM-20220, is protective against excitotoxicity in cultured cortical neurons. Stroke 35: 185-190, 2004.
- Ohkura K, Kazui T, Yamamoto S, et al. Comparison of pH management during antegrade selective cerebral perfusion in canine models with old cerebral infarction. J Thorac Cardiovasc Surg 128:378-385, 2004.
- Yamamoto S, Tsuboi T, Terakawa S: Single molecule analysis of DNA reveals that glutamate rapidly induces random DNA fragmentation in excitotoxicity. Stroke 34:304, 2003.
- Nagai N, Yamamoto S, Tsuboi T, et al. Tissue-type plasminogen activator is involved in the process of neuronal death induced by oxygen-glucose -deprivation in culture. J Cereb Blood Flow Metab 21:631-634, 2001.
- Yamamoto S, Teng W, Nishizawa S, et al. Improvement in cerebral blood flow and metabolism following subarachnoid hemorrhage in response to prophylactic administration of the hydroxyl radical scavenger, AVS, (+/-)-N,N'-propylenedinicotinamide: a positron emission tomography study in rats. J Neurosur 92:1009-1015, 2000.