

論文の内容の要旨

論文題目 Neuroprotective effects of tacrolimus (FK506) on ischemic brain damage following focal cerebral ischemia in the rat

(ラット局所大脳虚血モデルにおけるタクロリムス (FK506) の神経保護作用)

氏 名 能登 貴久

脳血管障害は癌、心臓病と並ぶ日本人の三大死亡原因の1つである。中でも脳の血管が閉塞することで発症する脳梗塞の発症率が高まっている。脳梗塞は致死性であるのみならず、死に至らない場合も言語行動障害などの重篤な後遺症が残り、発症後の生活に大きな影響を与える疾患である。しかしながら、現在有効性が確認されている治療法は、血栓溶解を目的とした発症後 3 時間以内の tissue plasminogen activator (tPA) 投与のみで、その有効性も十分なものではなく、脳出血の危険を伴う。

タクロリムス (FK506) は 1984 年に筑波山の放線菌から分離されたマクロライド系化合物で、強力な免疫抑制作用を有するため臓器移植の際に免疫抑制剤として広く利用されている。タクロリムスは細胞内の FK506 binding protein (FKBP) と特異的に結合して複合体を形成し、カルシニューリンによる nuclear factor of activated T cell (NFAT) の脱リン酸化反応を阻害することを介して interleukin-2 などのサイトカインの産生を抑制することにより免疫抑制作用を発揮する。その一方で、タクロリムスは免疫反応を伴わない虚血/再灌流傷害にも有効であり、各種の脳梗塞モデルにおいても神経細胞を保護する作用を示すことが見出されてきているが、その作用機序には不明な点が多い。

本研究は、タクロリムスの神経保護作用とその作用機序を明らかにする目的で、ラット大脳局所虚血モデルにおける神経細胞の細胞死 (アポトーシス) シ

グナルカスケードに対する作用と、脳内微小循環に対する作用について精査したものである。

第1章では、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルを用いて、神経細胞に対するタクロリムスのアポトーシス抑制作用を検討した。本モデルは、中大脳動脈を電気凝固により永久閉塞するもので、虚血に伴う細胞死の研究に適したモデルである。ラット中大脳動脈の閉塞直後、タクロリムス(1 mg/kg)を静脈内投与し、1、3、6、15 および 24 時間後の神経変性領域の拡がりを経時的に病理組織学的に解析した。溶媒対照群では 1 時間後から神経変性が認められ、大脳皮質においては虚血中心部から虚血周辺部への経時的な拡大が観察された。タクロリムス投与群では大脳皮質の神経変性が抑制され、閉塞 24 時間後においても虚血周辺部の神経変性が認められなかった。一方、線条体では皮質に比べて神経変性の進行が早く、6 時間後にはほぼ全領域が梗塞に陥り、タクロリムス投与による梗塞抑制作用は認められなかった。タクロリムス投与 24 時間後の標本に TUNEL 染色を施してアポトーシスが誘導された細胞の局在を調べたところ、タクロリムス投与によって線条体、皮質虚血中心部ならびに皮質虚血周辺部のいずれの領域においても死細胞が減少し、とくに皮質周辺部で明瞭であった。以上から、タクロリムスが虚血に伴う大脳皮質の神経細胞におけるアポトーシスを抑制する作用を有することが明らかになった。

第2章では、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルで認められたタクロリムスの神経細胞におけるアポトーシス抑制作用の機序解明の一環として、ミトコンドリアからのチトクローム C 遊離を抑制する作用の有無を調べた。ミトコンドリアにおける電子伝達蛋白であるチトクローム C は虚血ストレスによって細胞質内へ遊離し、deoxy-ATP 存在下で結合部サブユニットである apoptotic protease-activating factor (Apaf)-1 と結合して蛋白分解酵素であるカスパーゼ 9 を活性化する。これが下流のカスパーゼカスケードを活性化させてアポトーシスが実行される。はじめにラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて細胞質内へのチトクローム C 遊離の有無を確認するためにチトクローム C の局在の推移を免疫組織学的に調べた。溶媒対照群では動脈閉塞 1 時間後の時点ですでに大脳神経細胞の細胞質内に陽性反応が認められ、24 時間後まで継続的に認められた。タクロリムス投与によって皮質、線条体ともに陽性細胞数が減少し、とくに皮質において顕著であった。ついで閉塞 1 および 3 時間後の皮質虚血周辺部

から細胞質内可溶画分を調製して Western blot および ELISA 法にてチトクローム C を定量した結果、タクロリムス投与によってチトクローム C の細胞質内への遊離が低下していた。これらから、タクロリムスは虚血によるミトコンドリアからのチトクローム C 遊離を抑制する作用を有することが分かった。

第 3 章では、タクロリムスの微小循環保護作用の精査をすすめるにあたり、虚血再灌流後の微小循環障害のモデルとしてラット一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いることの妥当性を検討した。タクロリムスはリンパ球のみならず、顆粒球や単球などの種々の血球系細胞の浸潤を抑制することが知られている。炎症に起因して組織に集簇したこれらの細胞が、活性酸素の産生などによる直接的な組織傷害だけでなく、血管内皮へ接着することによって微小循環を障害し、組織の低酸素状態を惹起することで間接的に組織傷害を増悪させる。虚血再灌流後の神経傷害には、この低酸素状態が関連すると考えられる。そこで、ラットの中大脳動脈に栓子を挿入して閉塞させ、その 1 時間後に栓子を抜いて血流を再開させた。血流閉塞 1、3、9 および 24 時間後（血流再開 0、2、8 および 23 時間後）に大脳を摘出し、神経細胞の傷害の進展、微小循環障害に関与すると考えられる顆粒球と血小板の浸潤および低酸素領域の変化を調べた。神経細胞マーカーである microtubule associated protein-2 (MAP2) の陽性領域の減少が線条体では 1 時間後から、大脳皮質では表層で 9 時間後から認められ 24 時間後には深部にまで及んだ。微小循環障害の引き金となる顆粒球と血小板の血管への接着に関しては、顆粒球は 3 時間後から、血小板は 1 時間後から始まり、24 時間後に至るまで認められた。2-nitroimidazole hypoxia marker (hypoxyprobe-1 法) を用いて組織の低酸素領域を検出した結果、再灌流直後では中大脳動脈支配領域全体が低酸素に陥っていたが、3 時間後の時点では皮質の表層に局限して低酸素領域が認められ、9 時間後には深層でも認められた。24 時間後では神経傷害が進行している皮質周辺部に一致して低酸素領域が認められた。3、9 および 24 時間後の低酸素領域は顆粒球および血小板の血管への接着が認められる領域と一致していた。以上から、皮質においては顆粒球および血小板の血管内膜への接着による微小循環障害が組織中の低酸素状態を惹起し、このことが神経細胞の傷害に結びつくと考えられた。これらから本モデルが血管閉塞に基づく微小循環障害を検討するために有用であると考えられた。

第 4 章では、ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いて虚血再灌流後の微小循環障害に及ぼすタクロリムスの影響を調べた。中大脳動脈に栓子を挿入し

た直後にタクロリムス(1 mg/kg)を静脈内投与し、1 時間後に栓子を抜いて血流を再開させ、閉塞 9 および 24 時間後に病理組織学的に解析した。タクロリムスは虚血再灌流による大脳皮質における MAP2 の陽性領域の減少を抑制したことから、神経細胞の傷害を抑制することがわかった。さらにタクロリムスは閉塞 9 および 24 時間後の皮質において顆粒球と血小板の浸潤を抑制し、hypoxyprobe-1 法によって可視化される低酸素領域の面積を縮小させることがわかった。顆粒球と血小板の浸潤を抑制する作用機序を調べるために血管内皮に発現する接着因子 intercellular adhesion molecule-1、E-selectin および P-selectin の局在を免疫組織学的に調べたところ、いずれの接着因子においてもタクロリムス投与によって陽性血管数が減少した。これらの知見から、タクロリムスは再灌流後の顆粒球と血小板の局所的遊走に起因する微小循環障害を抑制して一過性脳虚血による神経変性を軽減すると考えられた。

本研究によって、タクロリムスは (1) 大脳の神経細胞内においては、虚血ストレスに起因するミトコンドリアからのチトクローム C の遊離を抑制することによって抗アポトーシス作用を発現すること、(2) 細胞外においては、再灌流後の顆粒球、血小板などの血球系細胞の血管への接着を抑制することによって血流を維持して神経細胞を保護することがわかった。すなわち、タクロリムスは虚血に起因する神経細胞死に対して細胞内および細胞外の両面から細胞傷害を抑制する作用を有することが示された。